



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

POKROČILÉ FLUORESCENČNÍ TECHNIKY VE VÝZKUMU MICELÁRNÍCH SYSTÉMŮ A JEJICH INTERAKCÍ S BIOPOLYMERY

ADVANCED FLUORESCENCE TECHNIQUES IN RESEARCH ON MICELLAR SYSTEMS AND THEIR
INTERACTIONS WITH BIOPOLYMERS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Petra Holínková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2018

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Ing. Petra Holínková**
Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název dizertační práce:

Pokročilé fluorescenční techniky ve výzkumu micelárních systémů a jejich interakcí s biopolymery

Zadání dizertační práce:

Rešerše na téma fluorescenční techniky ve výzkumu micelárních systémů a jejich interakcí s polyelektrolyty.

Studium procesu micelizace septonexu pomocí vybraných fluorescenčních technik a sond, srovnat výsledky s tenzidem CTAB.

Studium interakcí septonexu, popř. CTAB, v micelární formě s hyaluronanem vybranými fluorescenčními technikami.

Vyhodnocení výsledků jak z hlediska využitelnosti použitých fluorescenčních technik a sond, tak z hlediska struktury agregátů septonex–hyaluronan.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2018

Ing. Petra Holínková
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato disertační práce je věnována studiu pokročilých stacionárních a časově rozlišených fluorescenčních technik určených pro výzkum vlastností micelárních systémů. Vybrané fluorescenční metody byly použity pro charakterizaci kationtových micelárních systémů septonexu a CTAB a následně pro studium jejich interakcí s hyaluronanem. Za pomoci pyrenu jako fluorescenční sondy bylo studováno agregační chování daných tenzidů, z emisního polaritního indexu pyrenu byla určena jejich kritická micelární koncentrace (CMC) a pomocí zhášení fluorescence pyrenu agregační číslo micel. Dále byly studovány změny základního fluorescenčního chování fluoresceinu a prodanu v koncentrační škále septonexu od velmi nízkých koncentrací pod CMC až po několikanásobně vyšší koncentrace než CMC. Velkou kapitolu tvoří studium Försterova přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem v micelárním prostředí daných tenzidů a vliv přídavku hyaluronanu do tohoto systému. Následující kapitola je věnována stacionárnímu a časově rozlišenému měření anizotropie fluorescence a jeho použití pro studium vlivu postupného přídavku hyaluronanu k micelárnímu roztoku septonexu a CTAB. Poslední kapitola pojednává o fotofyzikálním chování prodanu v různých prostředích (voda, septonex pod i nad CMC, roztok hyaluronanu, micelární roztok septonexu s hyaluronanem), které bylo diskutováno na základě měření časově rozlišených spekter.

KLÍČOVÁ SLOVA

Septonex, CTAB, hyaluronan, pyren, perylen, fluorescein, prodan, FRET, anizotropie fluorescence, TRES

ABSTRACT

The dissertation thesis deals with study of advanced steady-state and time-resolved fluorescence techniques, which can be used for study of micellar systems properties. Selected fluorescence techniques were used for characterization of Septonex and CTAB cationic micellar systems and their interactions with hyaluronan. Fluorescent probe pyrene was used for determination of critical micelle concentration (CMC) and micellar aggregation number of these surfactants. The changes of fluorescence behaviour of fluorescein and prodan were studied in wide concentration range of Septonex. Next chapter of thesis deals with study of Förster resonance energy transfer between perylene and fluorescein in Septonex and CTAB micellar solutions and the effect of hyaluronan addition to these systems. Also steady-state and time-resolved fluorescence anisotropy studies were used for research of the effect of hyaluronan addition to micellar solutions. The last chapter of this thesis is focused on photophysical behaviour of Prodan in different solutions (water, Septonex solutions below CMC, hyaluronan solution, Septonex micellar solution and Septonex micellar solution with hyaluronan), which was discussed on the basis of time-resolved emission spectra.

KEYWORDS

Septonex, CTAB, hyaluronan, pyrene, perylene, fluorescein, prodan, FRET, fluorescence anisotropy, TRES

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

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Ing. Petra Holínková

Dizertační práce byla podpořena projektem Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně – udržitelnost a rozvoj, r. č. LO1211, za finanční podpory Národního programu udržitelnosti I (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy).

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli, prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., za vedení, cenné připomínky, rady a čas, který mi během mého doktorského studia věnoval. Dále bych ráda poděkovala Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za hojné a podmětné diskuze při řešení rozličných experimentálních výsledků a problémů.

Speciální poděkování patří mému manželovi a mé rodině za jejich neustálou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Fluorescence	11
2.1.1	<i>Zákony a pravidla fluorescence</i>	12
2.1.2	<i>Charakteristiky fluorescence</i>	12
2.1.3	<i>Fluorescenční sondy</i>	14
2.2	Princip stacionární a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie	19
2.2.1	<i>Stacionární fluorescenční spektroskopie</i>	20
2.2.2	<i>Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie</i>	21
2.3	Zhášení fluorescence	23
2.3.1	<i>Zhášení fluorescence v homogenním prostředí</i>	23
2.3.2	<i>Zhášení fluorescence v micelárním prostředí</i>	24
2.4	Försterův rezonanční přenos energie	25
2.5	Polarizovaná fluorescence, anizotropie fluorescence	27
2.5.1	<i>Definice a základní vztahy</i>	28
2.5.2	<i>Měření anizotropie fluorescence</i>	30
2.6	Tenzidy, asociativní (micelární) koloidy	32
2.6.1	<i>Struktura tenzidů</i>	32
2.6.2	<i>Adsorpce tenzidů, vznik micel</i>	32
2.6.3	<i>Struktura micely</i>	33
2.6.4	<i>Klasifikace tenzidů</i>	34
2.7	Kyselina hyaluronová, hyaluronan	34
2.7.1	<i>Struktura</i>	35
2.7.2	<i>Biosyntéza</i>	36
2.7.3	<i>Výskyt, biologické funkce</i>	37
2.7.4	<i>Využití</i>	37
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	38
3.1	Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy	38
3.2	Fluorescenční techniky ve výzkumu micelárních systémů	41
4	CÍLE PRÁCE	46
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
5.1	Materiály	47

5.2	Přístrojové vybavení	48
5.3	Standardní příprava vzorků.....	48
5.3.1	<i>Zásobní roztoky</i>	48
5.3.2	<i>Vzorky s fluorescenční sondou</i>	49
5.4	Vyhodnocení dat	49
5.4.1	<i>Statistika vyhodnocení</i>	49
5.4.2	<i>Standardní vyhodnocení doby života (TCSPC měření)</i>	49
6	KRITICKÁ MICELÁRNÍ KONCENTRACE SEPTONEXU A CTAB.....	51
6.1	Experimentální část	51
6.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	51
6.1.2	<i>Měření</i>	51
6.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	51
6.2	Výsledky a diskuze	52
7	AGREGAČNÍ ČÍSLO SEPTONEXU A CTAB.....	55
7.1	Experimentální část	55
7.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	55
7.1.2	<i>Měření</i>	55
7.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	55
7.2	Výsledky a diskuze	57
8	PRODAN A FLUORESCEIN V ROZTOKU SEPTONEXU POD A NAD CMC.....	60
8.1	Experimentální část	60
8.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	60
8.1.2	<i>Měření</i>	60
8.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	60
8.2	Výsledky a diskuze	61
8.2.1	<i>Prodan</i>	61
8.2.2	<i>Fluorescein</i>	62
9	FRET V MICELÁRNÍM ROZTOKU SEPTONEXU A CTAB	64
9.1	Experimentální část	64
9.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	64
9.1.2	<i>Měření</i>	65
9.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	66
9.2	Výsledky a diskuze	67

9.2.1	<i>Försterův poloměr páru perylen-fluorescein</i>	67
9.2.2	<i>Metodika vyhodnocování efektivity FRET</i>	68
9.2.3	<i>Srovnání FRET v micelárním prostředí septonexu a CTAB</i>	69
9.2.4	<i>Vliv času po smíchání vzorku na výsledky FRET</i>	77
9.2.5	<i>Vliv postupného přidavku hyaluronanu</i>	78
10	ANIZOTROPIE V MICELÁRNÍM ROZTOKU SEPTONEXU A CTAB	82
10.1	Experimentální část	82
10.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	82
10.1.2	<i>Měření</i>	82
10.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	83
10.2	Výsledky a diskuze	84
10.2.1	<i>Emisní spektra, doba života</i>	84
10.2.2	<i>Stacionární anizotropie</i>	85
10.2.3	<i>Časově rozlišená anizotropie</i>	86
11	ČASOVĚ ROZLIŠENÁ SPEKTRA PRODANU V RŮZNÝCH PROSTŘEDÍCH	89
11.1	Experimentální část	89
11.1.1	<i>Příprava vzorků</i>	89
11.1.2	<i>Měření</i>	89
11.1.3	<i>Vyhodnocení dat</i>	90
11.2	Výsledky a diskuze	90
11.2.1	<i>Interakce prodanu s hyaluronanem a septonexem pod CMC</i>	90
11.2.2	<i>Prodan v micelárním roztoku septonexu</i>	92
11.2.3	<i>Prodan v micelárním roztoku septonexu s přidavkem hyaluronanu</i>	93
12	ZÁVĚR	94
13	POUŽITÁ LITERATURA	97
14	PŘEHLED ZKRATEK A SYMBOLŮ	107
14.1	Zkratky.....	107
14.2	Symboly	109
15	VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	112
15.1	Článek v impaktovaném časopise (Příloha 2)	112
15.2	Mezinárodní konference	112
15.2.1	<i>Příspěvek indexovaný v databázi Web of Science (Příloha 3)</i>	112
15.2.2	<i>Příspěvky</i>	112

15.2.3	<i>Abstrakty</i>	112
15.2.4	<i>Postery</i>	112
15.3	Studentské konference	113
15.3.1	<i>Příspěvky</i>	113
15.3.2	<i>Abstrakty</i>	113
15.3.3	<i>Přednášky</i>	113
15.3.4	<i>Postery</i>	113
16	PŘÍLOHY	114
16.1	Obsazenost micel fluorofory – Poissonova statistika (ke kapitole 9).....	114
16.2	Manuskript článku pro impaktovaný časopis Scientific Reports	116
16.3	Příspěvek ve sborníku indexovaný v databázi Web of Science	128

1 ÚVOD

V posledních desetiletích nacházejí fluorescenční techniky uplatnění v široké škále aplikací, v nichž se využívají pro studium vlastností fyzikálně-chemických i biologických systémů. Tyto metody, jež lze primárně rozdělit na stacionární (*steady-state*) a časově rozlišené, mohou také poskytovat cenné informace o koloidních systémech a jejich interakcích, týkajících se především struktury, dynamického chování a asociačních procesů.

V rámci této disertační práce jsou pomocí fluorescenčních technik studovány vlastnosti micelárních koloidů, jejichž struktury se v mnohém podobají biologickým membránám. Amfifilní molekuly tenzidů asociují nad kritickou koncentrací, známé jako kritická micelární koncentrace, za vzniku termodynamicky stabilních, nekovalentně vázaných agregátů s dynamickým charakterem, zvaných micely. Micely mohou být využívány jako membrány mimetických systémů pro charakterizaci membránových proteinů či peptidů, nebo jako prostředky pro podávání ve vodě nerozpustných léčiv. Oproti biologickým membránám nabízejí pro fluorescenční studium výhody v podobě přesně definované velikosti a optické transparentnosti.

Hlavním cílem této práce je rozšíření použití pokročilých fluorescenčních technik dostupných na školícím pracovišti a jejich využití pro studium vlastností kationtových micelárních systémů (Septonex, CTAB) a studium jejich interakcí s hyaluronanem, jakožto typického představitele biopolymerů používaných na této fakultě.

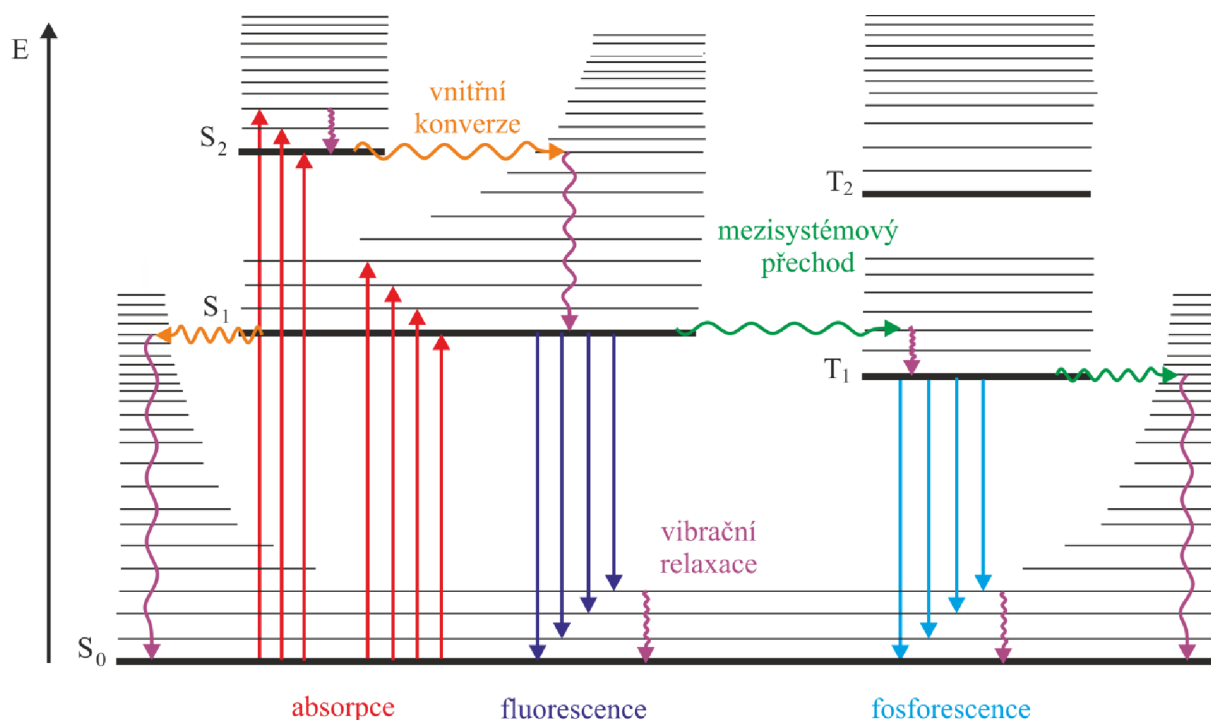
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

Obecně při fotoluminiscenci dochází vlivem absorpce primárního elektromagnetického záření k excitaci molekuly, po níž následuje deexcitace spojená s emisí sekundárního záření v ultrafialové či viditelné oblasti.

Po absorpci vhodného elektromagnetického záření molekulou v základním stavu S_0 dojde k přechodu valenčního elektronu do hladiny s vyšší energií, čímž dojde k vytvoření jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů. Prvním z nich je vyšší singletový stav (ozn. S), ve kterém jsou spiny dvojice elektronů antiparalelní, a je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější. Druhým je pak tripletový stav (ozn. T), ve kterém jsou spiny dvojice elektronů orientovány paralelně. Z vyššího energetického stavu se molekula deexcituje různými deaktivacími procesy, z nichž jsou ze spektroskopického hlediska důležité zářivé přechody. Dle uplatněného typu zářivého přechodu pak rozdělujeme fotoluminiscenci na fluorescenci a fosforescenci.

Jabloňského diagram na obr. 1 přehledně prezentuje možné zářivé a nezářivé procesy probíhající mezi elektronovými stavy. Základní schéma diagramu je tvořeno zobrazením relativních energetických hladin molekuly v základním stavu a stavech excitovaných. Zářivé přechody jsou znázorněny pomocí přímých šipek, nezářivé přechody vlnovkami.



Obr. 1: Jablonského diagram.

Dle Kashova pravidla nastávají zářivé přechody pouze z nejnižších vibračních hladin excitovaných stavů. Pokud se elektron nachází na vyšší vibrační hladině, dochází nejprve k relaxaci vibrační energie, případně vnitřní konverzi, které řadíme k velmi rychlým

nezářivým procesům. Při vnitřní konverzi přechází elektron mezi elektronovými stavy se stejnou spinovou multiplicitou (např. $S_2 \rightarrow S_1$). K nežářivým procesům patří i mezisystémový přechod, při kterém elektron vykoná zakázaný přechod mezi stavy s odlišnou multiplicitou (např. $S_1 \rightarrow T_1$). U nežářivých procesů, probíhajících mezi jednotlivými rotačně-vibračními hladinami různých elektronových stavů, se celková energie systému na rozdíl od zářivých procesů nemění.

Při fluorescenci dochází ke spinově povolenému zářivému přechodu elektronu obvykle z rovnovážné hladiny S_1 do některé z vibračních hladin stavu základního S_0 . Jedná se o velmi rychlý přechod s časem trvání v řádu nanosekund.

U fosforescence dochází ke spinově zakázanému přechodu elektronu z tripletové hladiny T_1 do stavu základního S_0 . Aby byl při tomto přechodu dodržen Pauliho vylučovací princip, musí dojít ke změně orientace elektronového spinu, což způsobí, že doba záření je daleko delší než u fluorescence. Typicky se jedná o čas v rozmezí milisekund až sekund.

2.1.1 Zákony a pravidla fluorescence

Fluorescence se řídí několika hlavními pravidly a zákony [1; 2]. Prvním z nich je Stokesův zákon, který říká, že vlnová délka emise je větší nebo rovna vlnové délce excitačního záření ($\lambda_{em} \geq \lambda_{exc}$). Emisní spektrum je tedy oproti absorpčnímu posunuto k vyšším vlnovým délkám vlivem ztráty energie při přechodu z vyšších vibračních hladin do nejnižší vibrační hladiny při vibrační relaxaci. Výsledný posuv spekter se nazývá Stokesův posuv.

Dalším je tzv. Kashovo pravidlo. Podle něj před emisí fluorescenčního kvanta dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, což má za následek, že k fluorescenčnímu přechodu dochází z nejnižší vibrační hladiny excitovaného singletového stavu S_1 do stavu základního S_0 , ačkoliv po absorpci záření může dojít k excitaci i do vyšších vibračních a energetických hladin. Tento jev je způsoben malým energetickým rozdílem mezi hladinou S_1 a vyššími energetickými hladinami, díky kterému mezi nimi přednostně probíhají velmi rychlé nežářivé procesy. Proti tomuto pravidlu existují ale i výjimky, a to v případě, že energetický rozdíl mezi hladinami S_2 a S_1 je srovnatelný s deaktivací do základního stavu.

Třetím je tzv. Vavilovo pravidlo, které vychází z Kashova pravidla a říká, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho tedy vyplývá, že emisní spektra fluorescence nejsou závislé na excitační vlnové délce.

2.1.2 Charakteristiky fluorescence

Doba života

Doba života excitovaného stavu spolu s kvantovým výtěžkem patří k nejdůležitějším vlastnostem fluoroforu [2]. Je určena průměrným časem, který molekula setrvá v excitovaném stavu, než přejde do stavu základního.

Na následujícím obr. 2 jsou schematicky shrnuty rychlostní konstanty možných procesů depopulace excitovaných stavů. Jednotlivé indexy znamenají:

r – zářivý přechod

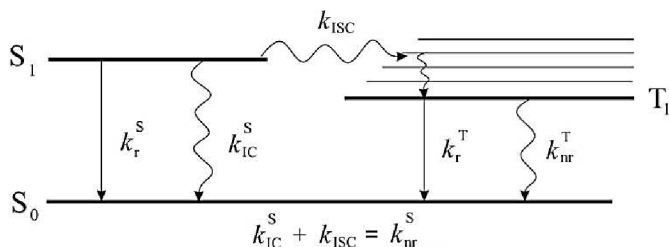
IC – vnitřní konverze

S – přechod $S_1 \rightarrow S_0$

nr – nezářivý přechod

ICS – mezisystémový přechod

T – přechod $T_1 \rightarrow S_0$



Obr. 2: Schématické znázornění depopulace excitovaných stavů [2].

V případě zředěného roztoku fluoroforu A přejde po excitaci velmi krátkým pulzem záření v čase $t = 0$ určitý počet molekul fluoroforu do vyššího energetického stavu S_1 . Posléze se navrátí do základního stavu S_0 zářivými či nezářivými přechody. Tento proces může být pro molekulu fluoroforu A popsán diferenciální rovnicí:

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

Po její integraci získáme vztah:

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

kde $[A^*]_0$ odpovídá koncentraci excitovaných molekul A pulzem v čase $t = 0$ a τ_s je doba života excitovaného stavu S_1 , kterou můžeme vyjádřit rovnicí:

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

Intenzita fluorescence i_F je definována jako množství emitovaných fotonů vztahované na jednotku času a objemu. Po excitaci velmi krátkým pulzem záření v čase $t = 0$ je intenzita fluorescence v každém okamžiku přímo úměrná koncentraci excitovaných molekul $[A^*]$ s faktorem úměrnosti odpovídajícím rychlostní konstantě zářivé deexcitace k_r^S :

$$i_F(t) = k_r^S [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right). \quad (4)$$

Doba života homogenní populace fluoroforů bývá velmi často nezávislá na vlnové délce excitačního záření stejně jako emisní spektrum.

Kvantový výtěžek

Za kvantový výtěžek Φ_F označujeme podíl excitovaných molekul, které se navracejí do základního stavu S_0 emisí fluorescenčních fotonů. Jeho hodnotu můžeme spočítat dle následující rovnice:

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_s. \quad (5)$$

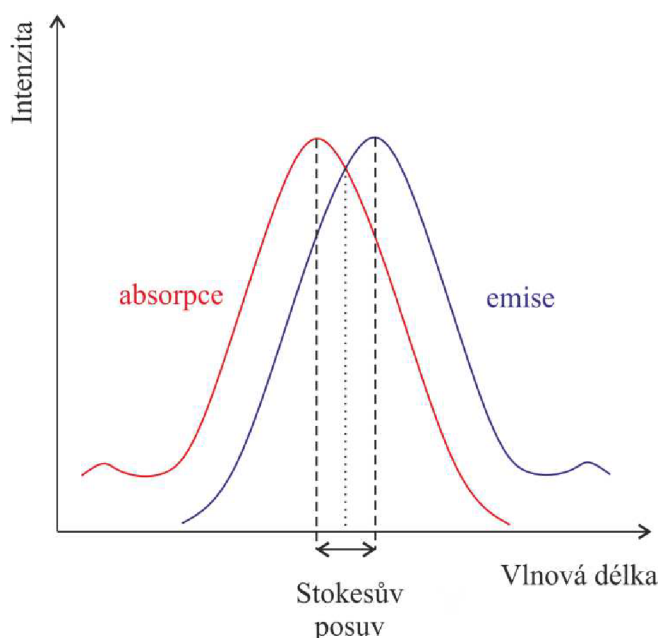
Jinými slovy, kvantový výtěžek lze vyjádřit jako poměr počtu emitovaných fotonů vzhledem k počtu fotonů absorbovaných. Pokud zavedeme zářivou dobu života τ_r jako $1/k_r^S$, pak můžeme kvantový výtěžek vyjádřit rovnicí:

$$\Phi_F = \frac{\tau_s}{\tau_r}. \quad (6)$$

Excitační a emisní spektrum

Pro fluoreskující molekulu jsou charakteristická dvě spektra – excitační a emisní. Excitačním spektrem je závislost intenzity fluorescence při jedné vlnové délce na měnící se vlnové délce excitačního záření. Vystihuje tedy relativní účinnost budícího záření různých vlnových délek na vyvolání fluorescence. Emisním spektrem je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího záření.

Pro velké množství organických molekul platí tzv. zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. Tato symetrie je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu má stejnou strukturu. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.



Obr. 3: Znárodnění Stokesova posuvu a zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem.

2.1.3 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou využívány v široké škále odvětví. Nejčastěji se využívají pro studium fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů. Obecně lze

fluorescenční sondy rozdělit do tří skupin: vnitřní sondy, kovalentně vázané sondy (fluorescenční značky) a fyzikálně vázané fluorescenční sondy.

Za vnitřní sondy označujeme molekuly nebo jejich části, které vykazují vlastní fluorescenci. Příkladem mohou být proteiny fluoreskující v ultrafialové oblasti, v nichž jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny, např. tryptofan, fenylalanin či tyrozin.

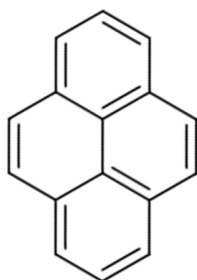
Fluorescenčními značkami jsou tzv. nevlastní fluorofory, které jsou kovalentně navázány na danou zkoumanou látku. Často se využívají k fluorescenčnímu značení proteinů. V tomto případě se pak zpravidla jedná o deriváty fluoresceinu, rhodaminu a erythrosinu.

Poslední skupinou jsou fyzikálně vázané fluorescenční sondy. Většinou se jedná o malé organické molekuly, které jsou ke sledované struktuře vázány nekovalentně – po jejich přidání do systému se v něm zpravidla inkorporují na základě rozpustnosti nebo elektrostatických interakcí. Jejich fotofyzikální chování bývá specificky závislé na vlastnostech prostředí, ve kterém se nacházejí (pH, iontová síla, polarita, viskozita, tlak, teplota, přítomnost zhaščeče a další).

Vzhledem k nepřehlednému množství sond s rozdílnými vlastnostmi, které umožňují získat určité informace o daném systému, je volba vhodné fluorescenční sondy klíčovou součástí experimentu.

Pyren

Pyren patří mezi často využívané fyzikálně vázané fluorescenční sondy. Jedná se o polyaromatický uhlovodík s vysoce symetrickou molekulou, díky které vykazuje vysokou citlivost na polaritu prostředí, ve kterém se nachází.

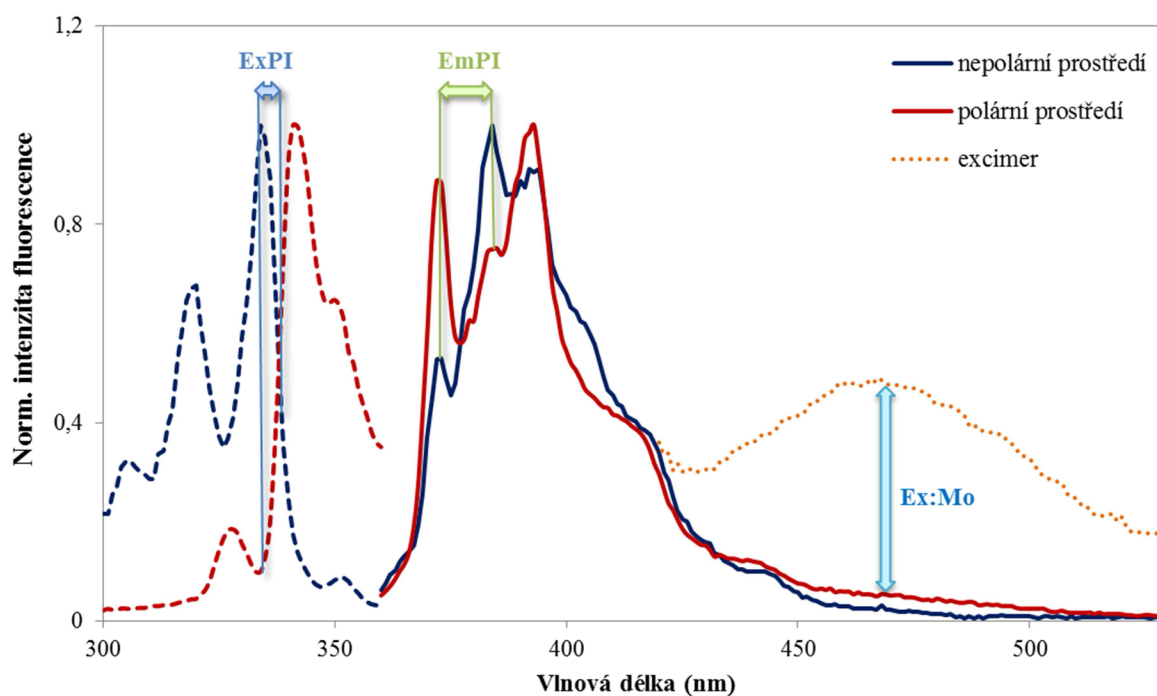


Obr. 4: Molekula pyrenu.

U některých aromatických molekul s vysokým stupněm symetrie je absorpční přechod ze základního do prvního singletového stavu ($S_0 \rightarrow S_1$) symetricky zakázán. Jednotlivé vibrační přechody v tomto pásu jsou pak silně závislé na polaritě rozpouštědla, v nichž se molekula sondy nachází. Tento jev je nazýván Hamův efekt. Akira Nakajima byl první, kdo se touto problematikou u pyrenu zabýval [3]. Relativní změny intenzity jednotlivých vibračních pásů ve fluorescenčním spektru pyrenu mají původ v překryvu zakázaného prvního a povoleného druhého excitovaného stavu. Majoritní interakce dipól-indukovaný dipól mezi prostředím a pyrenem způsobují, že vibrační přechod 0-0 je silně závislý na polaritě prostředí. Čím je rozpouštědlo polárnější, tím se pravděpodobnost přechodu 0-0 zvyšuje. Vibrační maximum tohoto přechodu (I_1) se nachází při vlnové délce 373 nm. Jako referenční pás slouží přechod

0-2, jehož maximum má vlnovou délku 383 nm. K určení polaritu prostředí se pak využívá poměr intenzit těchto pásů ($I_1:I_3$) označovaný jako emisní polaritní index EmPI nebo taktéž pouze pyren 1:3 poměr. Typicky nabývá hodnot v rozmezí $\approx 1,9$ pro polární rozpouštědla (1,87 pro vodu) a $\approx 0,6$ pro nepolární prostředí (0,58 pro hexan) [4].

Excitační spektrum pyrenu reaguje na zvyšující se polaritu prostředí posunem svého maxima k vyšším vlnovým délkám. Excitační polaritní index ExPI je pak stanovován jako poměr intenzity fluorescence při 333 nm a 338 nm [5; 6].



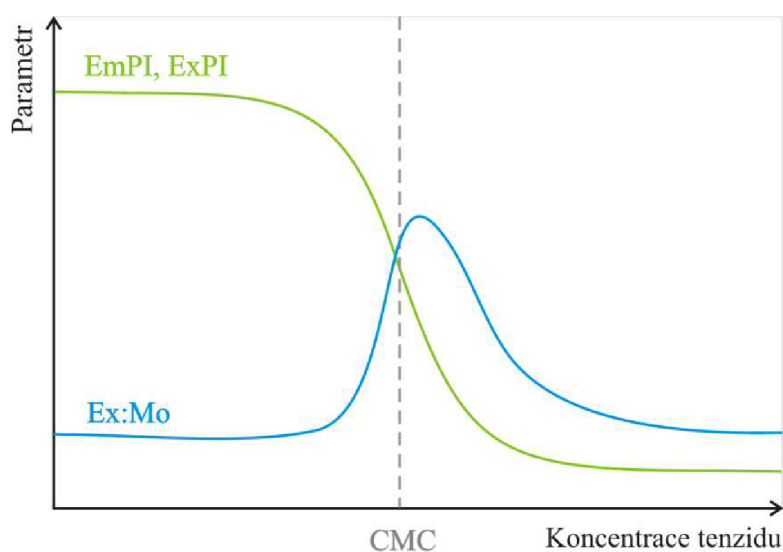
Obr. 5: Změny v excitačním a emisním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí. Modře jsou znázorněna spektra pyrenu v cyklohexanu a červeně v acetonu.

Dále mohou molekuly pyrenu tvořit tzv. excitovaný dimer neboli excimer [7]. Vlivem excitace molekuly pyrenu dochází ke změně její struktury a díky vzniku indukovaného dipólu je pak tato molekula pyrenu schopna interagovat s další, neexcitovanou molekulou pyrenu. Tvorba excimeru má za následek ztrátu části energie excitované molekuly, což vede k posunu maxima fluorescence k delším vlnovým délkám. Tvorba excimeru patří mezi difúzně kontrolované procesy – intenzita maxima fluorescence je funkcí koncentrace pyrenu, mikroviskozity okolí a v případě micelárních roztoků i funkcí rozdělení jednotlivých molekul pyrenu v hydrofobních jádrech micel. Poměr intenzity fluorescence pyrenového excimeru (470 nm) a monomerní formy pyrenu (373 nm) Ex:Mo lze taktéž označit jako tzv. viskozitní index.

Pyren je často využíván jako fluorescenční sonda pro charakterizaci koloidních systémů [8–12]. Díky polyaromatické struktuře molekuly má pyren převážně hydrofobní charakter. Ve vodě je pouze velmi málo rozpustný, přičemž z ní poskytuje charakteristický fotofyzikální signál. Na základě měření EmPI (popř. ExPI) pyrenu lze u roztoků běžných tenzidů stanovit kritickou micelární koncentraci (CMC) [13–16].

Při nízkých koncentracích tenzidu (pod CMC) odpovídají hodnoty polaritního indexu vodnému prostředí – v systému nejsou vytvořeny žádné micelární útvary, do jejichž hydrofobních jader by se molekuly pyrenu mohly solubilizovat. Při dosažení CMC pak dochází k výraznému poklesu hodnoty polaritního indexu způsobeného počátkem inkorporace molekul pyrenu do hydrofobních jader vznikajících útvarů. Nad CMC při dalším zvyšování koncentrace tenzidu zůstává hodnota polaritního indexu konstantní, jelikož jsou již molekuly pyrenu solubilizovány v hydrofobních jádrech micel.

Další, velmi citlivou vlastností pyrenu na formaci prvních micel okolo hodnoty CMC, je tvorba excimeru, jehož intenzita fluorescence je přímo úměrná pravděpodobnosti jeho tvorby. Při koncentraci tenzidu nižších než CMC je pravděpodobnost tvorby excimeru velice nízká. Totéž platí i výše nad CMC, kdy je již vytvořen velký počet kompaktních micel a je vysoce nepravděpodobné, že se v jedné micelle bude nacházet více než jedna molekula pyrenu. Oproti tomu se v oblasti okolo kritické micelární koncentrace tenzidu, vlivem inkorporace molekul pyrenu do prvních několika málo vzniklých micelárních útvarů, zvyšuje pravděpodobnost tvorby excimeru, což se v emisním spektru pyrenu projeví relativně silným nárůstem intenzity fluorescence v oblasti kolem 470 nm.



Obr. 6: Modelové průběhy jednotlivých parametrů (indexů) pyrenu.

Perylen

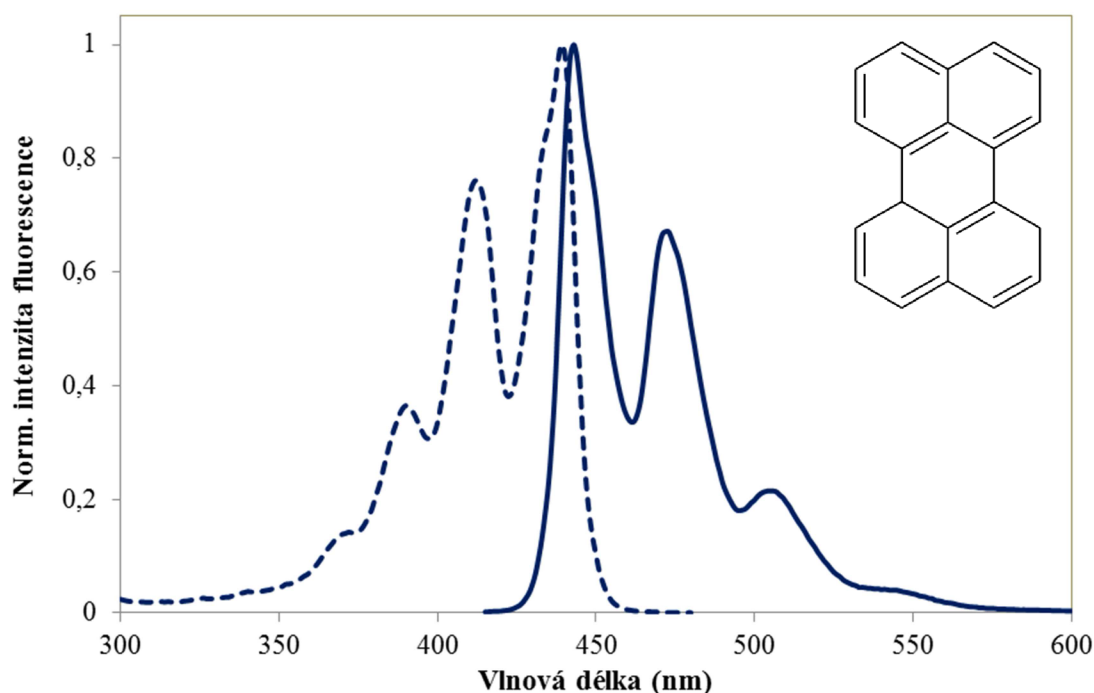
Perylen je jednou z fyzikálně vázaných fluorescenčních sond, které bývají využívány k měření polarizované fluorescence v koloidních systémech. Jedná se o polyaromatický uhlovodík se symetrickou molekulou, jehož excitační a emisní spektrum ukazuje významné struktury v závislosti na jednotlivých vibračních hladinách základního a excitovaného stavu a platí mezi nimi zákon zrcadlové symetrie (Obr. 7).

Perylen má hydrofobní charakter, dobře ho rozpouští většina organických rozpouštědel. Vhodná jsou pro něj rozpouštědla s nízkou permitivitou, jako je aceton či n-heptan. Ve vodě je perylen téměř nerozpustný. V micelárním roztoku se jeho molekuly solubilizují do prostoru hydrofobních jader. Jeho luminiscenční vlastnosti jsou přímo ovlivňovány

rozpustností v daném prostředí, proto se perylen často využívá jako fluorescenční sonda pro studium lipidických membrán a lipozomů [17–20] i micelárních systémů [21–24].

Molekula perylenu má planární diskovitý tvar, u něhož se předpokládá, že rotace v rovině bude výrazně rychlejší než rotace mimo rovinu, při které musí odhrnovat molekuly rozpouštědla. Chová se tedy jako anizotropní rotor. Rotační dynamika perylenu ve viskózních rozpouštědlech byla předmětem řady publikací [25–28].

V mikrokrytalické formě v excitovaném stavu vytváří perylen excimery s charakteristickou emisí v červené oblasti viditelného spektra a dobou života fluorescence v řádu desítek nanosekund [29]. V rozpuštěné formě při nízkých koncentracích perylen excimery nevytváří.



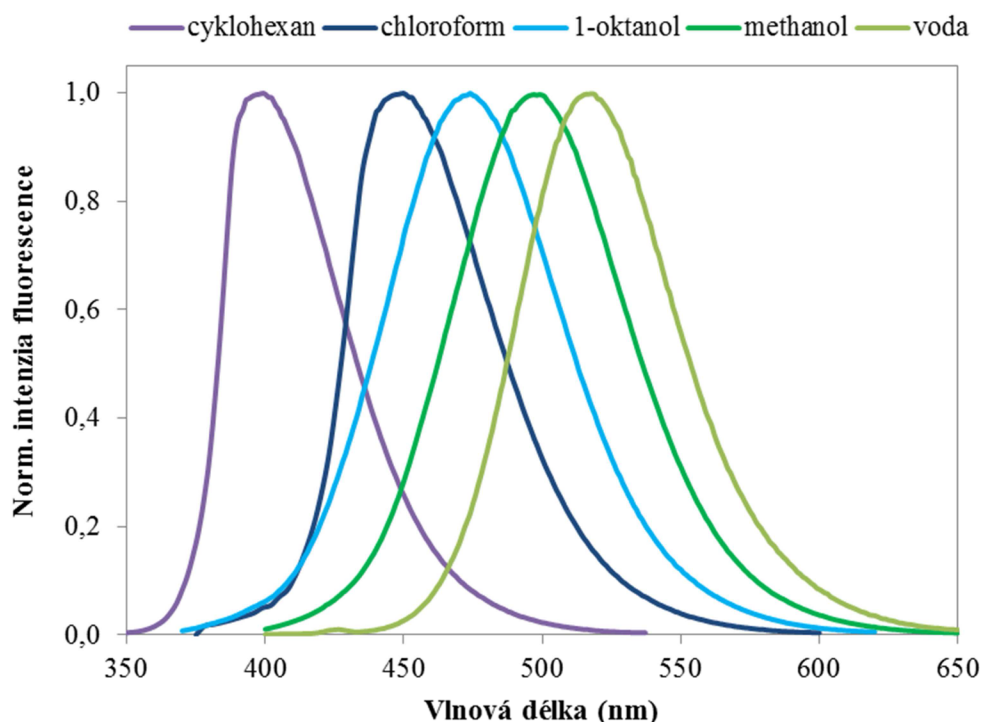
Obr. 7: Excitační a emisní spektrum perylenu v micelárním roztoku CTAB. V pravém horním rohu obrázku je vyobrazena molekula perylenu.

Prodan

Tato fluorescenční sonda citlivá na polaritu prostředí, ve kterém se nachází, je v rámci posledních čtyřech desetiletí využívána zejména pro studium fyzikálně-chemických vlastností biologických systémů, buněčných a modelových membrán [30–35]. V poslední době byla využita i pro výzkum vlastností reverzních micel [36–39] a dalších micelárních systémů [40; 41]. Jedná se o aromatickou sloučeninu s intramolekulárním přenosem náboje (ICT). Prvním, kdo se syntézou prodanu a jeho charakterizací zabýval, byl G. Weber. Objevil, že prodan vykazuje výrazný posun maxima emise od 530 nm ve vodném prostředí až po 400 nm v hydrofobním uhlovodíkovém prostředí (401 nm v cyklohexanu) [42].

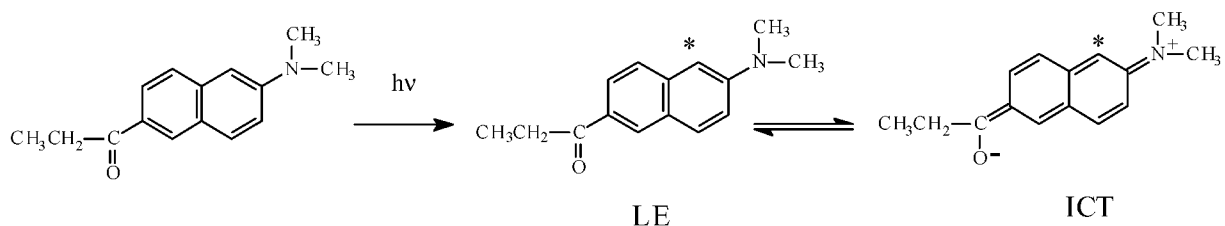
Při excitaci molekuly prodanu v roztoku dochází k vytvoření indukovaného dipólu, což vede vlivem elektrostatického působení k reorientaci okolních molekul rozpouštědla.

Orientací těchto molekul pak dochází ke ztrátě energie v systému a tedy posunu emisního spektra prodanu k delším vlnovým délkám. Čím vyšší bude polarita rozpouštědla, tím k vyšší ztrátě energie v systému dojde. S rostoucí polaritou prostředí a také přítomností H-vazeb dochází k bathochromnímu posunu emisního spektra prodanu.



Obr. 8: Emisní spektrum prodanu v rozpouštědlech s různou polaritou.

Excitovaná molekula prodanu se může vyskytovat ve dvou různých stavech. Prvním z nich je tzv. LE stav (*locally excited*), který může přejít na energeticky chudší tzv. ICT stav (*intramolecular charged transferred*). V nepolárních prostředích dochází zpravidla k emisi záření z LE stavu, v polárních pak díky silné interakci s rozpouštědlem ze stavu ICT [37]. V micelárním systému prodan emituje z obou výše uvedených stavů. Jeho emisní spektrum je pak výsledkem složení spekter jednotlivých stavů prodanu emitujících z rozdílného prostředí.



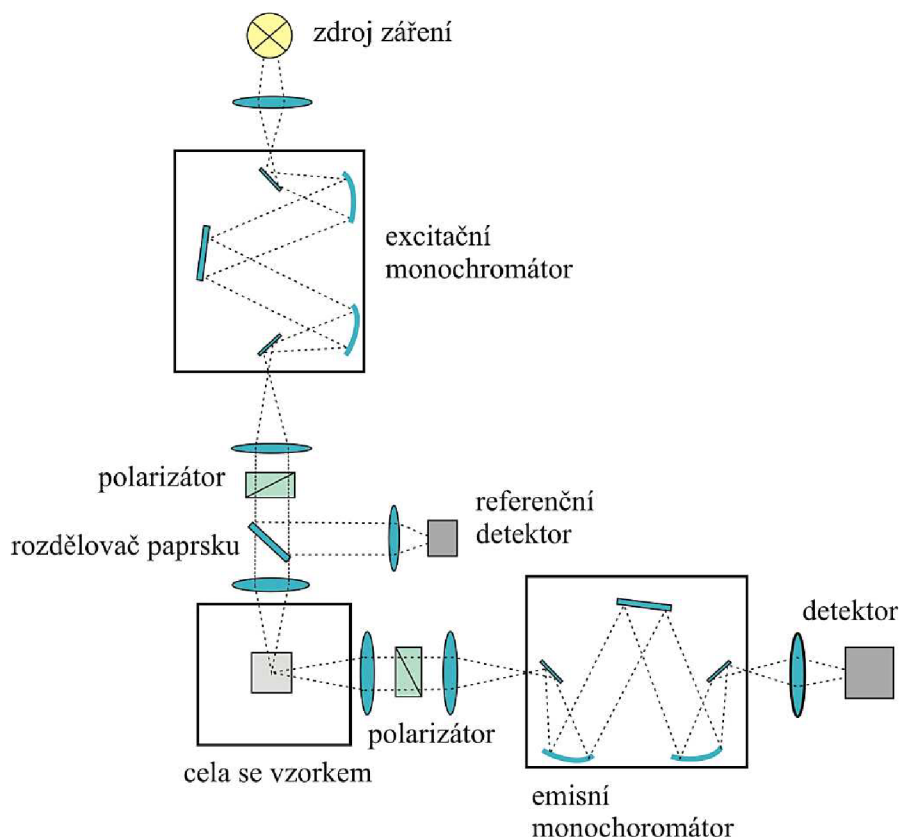
Obr. 9: Struktura molekuly prodanu – LE stav (lokálně excitovaný) a ICT stav (intramolekulární přenos náboje).

2.2 Princip stacionární a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopické metody nalézají uplatnění v širokém poli oborů a aplikací. Obecně je můžeme rozdělit do dvou základních skupin: stacionární neboli ustálené (*steady-state*) a časově rozlišené (*time-resolved*).

2.2.1 Stacionární fluorescenční spektroskopie

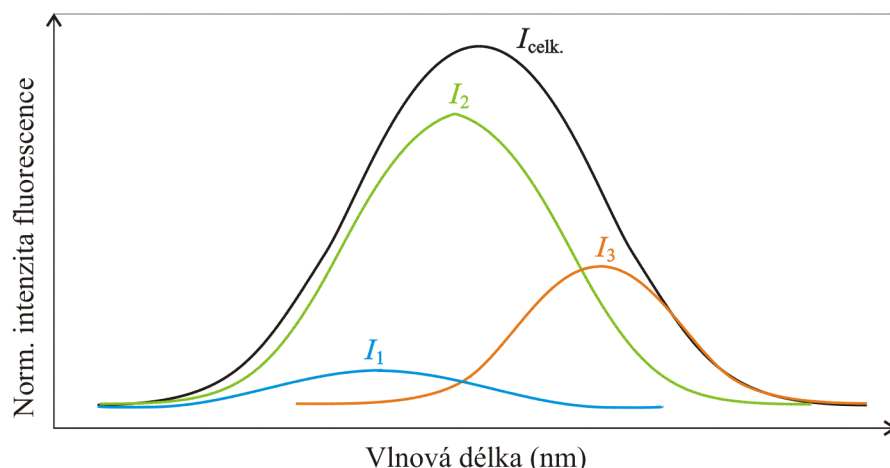
Měření stacionární fluorescence patří mezi běžné analytické techniky. Principem této metody je měření emisních spekter, tedy intenzity fluorescence po excitaci vzorku zářením o konstantní vlnové délce.



Obr. 10: Schéma běžného spektrofluorimetru.

Na obr. 10 je vyobrazeno základní schéma běžného fluorimetru pro měření stacionární fluorescence. Měření probíhá při konstantní excitaci kontinuálním paprskem zdroje. Excitační monochromátor slouží k výběru požadované vlnové délky budícího záření, které je dále vedeno do cely se vzorkem, kde budí fluorescenci. Emitované záření vzorkem se šíří všemi směry, přičemž detektor je umístěn v pravém úhlu od směru excitujícího záření kvůli možné kontaminaci signálu excitačním zdrojem. Před detektorem je umístěn druhý monochromátor, pomocí kterého je volena vlnová délka snímaného emitovaného záření. Výsledkem klasického fluorescenčního měření jsou pak excitační a emisní fluorescenční spektra. Polarizátory slouží k výběru daného směru excitačního/emitovaného záření při anizotropním měření fluorescence.

Obecně, emisní spektrum může být výsledkem složení několika vzájemně se překrývajících spekter různých fluoroforů, případně jednoho typu fluoroforu nacházejícího se v různých formách (viz obr. 11). Měření stacionární fluorescence nám tedy poskytuje informace o střední intenzitě fluorescence dané váženým průměrem všech dob života daného systému.



Obr. 11: Dekonvoluce emisního spektra na jednotlivé komponenty.

2.2.2 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

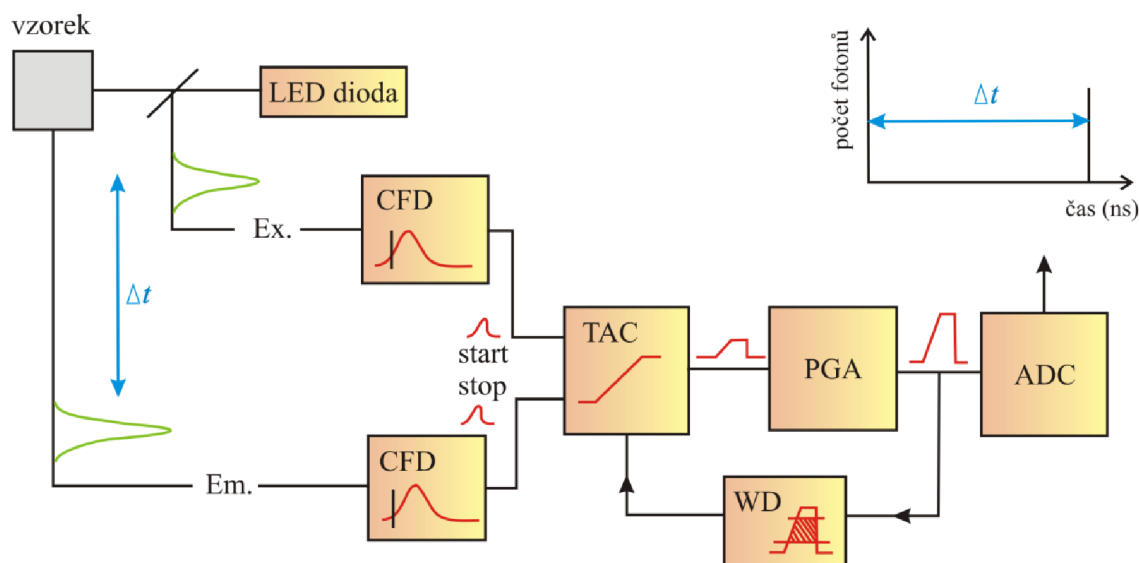
Časově rozlišená měření na rozdíl od stacionárního umožňují zjistit doby života dílčích (forem) fluoroforů a jejich relativní intenzity. Pomocí nich můžeme získat informace o dynamice excitovaných stavů, které jsou důležité pro řadu fotofyzikálních, fotochemických či fotobiologických procesů. Nejčastěji časově rozlišené metody dělíme na metody pulzní a metody fázově modulovaného excitačního záření.

Metoda TCSPC

Pod zkratkou TCSPC (*Time-correlated single photon counting*) se ukrývá metoda časově korelovaného sčítání fotonů, která patří pod pulzní časově rozlišené techniky. Je založena na principu, že pravděpodobnost detekce jednoho fotonu v čase t po předešlém excitačním pulzu je přímo úměrná intenzitě jeho fluorescence v tomto čase [1; 43]. Při měření je sledován čas mezi excitačním pulzem a detekcí emitovaného fotonu. Tento čas je vyneseno do histogramu, jehož osa x představuje časové intervaly, tzv. kanály a osa y počet fotonů, které jsou v daném časovém úseku zaznamenány.

Na obr. 12 je schematicky vysvětlen princip této metody. Měření je iniciováno velmi krátkým pulzem záření, který je realizován laserovou diodou. Tento pulz excituje vzorek a zároveň posílá signál elektronice. Ve výsledku, na jeden excitační pulz připadá méně než jeden detekovaný foton – typicky je jeden foton detekován zhruba za sto excitačních pulzů. Signál jde do prvního kanálu přes „diskriminátor konstantní funkce“ (CFD – *constant function discriminator*), který změří přesný čas excitačního pulzu. Dále je signál veden přes „převodník času na amplitudu“ (TAC – *time-to-amplitude convertor*), kde spustí nárůst napětí lineárně s časem. Mezitím excitovaný vzorek vykazuje fluorescenci a emitované fotony jsou zaznamenávány druhým kanálem. Přesný čas dopadu emitovaného fotonu je změřen druhým CFD prvkem, který v témže čase posílá *stop*-signál do TAC převodníku, kde bylo do téhle doby generováno napětí. Velikost tohoto napětí je přímo úměrná časovému zpoždění mezi excitačním a emisním signálem. Napětí je v případě potřeby zesíleno v zesilovači (PGA – *programmable gain amplifier*) a následně převedeno na číselnou hodnotu v „analogově-digitálním převodníku“ (ADC – *analog-to-digital convertor*). Kvůli minimalizaci falešných hodnot signálu je napětí omezeno určitým rozsahem hodnot. Jestliže signál nespadá do tohoto

rozsahu, je potlačen pomocí diskriminátoru (WD – *window discriminator*). Napětí převedené na digitální hodnotu je uloženo jako jedna událost s naměřenou časovou prodlevou. Tento proces se neustále opakuje do dosažení určeného počtu detekovaných fotonů. Pro správné vyhodnocení poklesu intenzity fluorescence je potřeba minimálně 4 000 fotonů [1].



Obr. 12: Princip měření metodou TCSPC – dle [1]. Jednotlivé zkratky jsou vysvětleny v odstavci výše.

Vyhasínání fluorescence

Časově rozlišené fluorescenční měření je na rozdíl od stacionárního absolutní metodou. Stanovená doba života fluorescence fluoroforu je vnitřní vlastností molekul fluoroforu, tudíž je, za určitých předpokladů, nezávislá na jeho koncentraci.

Obecně, vyhasínání fluorescence excitované molekuly fluoroforu zpět do základního stavu může být v případě mono-exponenciálního poklesu vyjádřeno rovnicí:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (7)$$

kde I_0 označuje intenzitu fluorescence v čase $t = 0$ po excitaci a τ odpovídá době života fluoroforu.

Ačkoliv je vyhasínání fluorescence založeno na kinetice reakce prvního řádu, mohou nastat situace, které vedou k *multi-* nebo *non-exponenciálnímu* vyhasínání. Příkladem může být vyhasínání populace fluoroforů nacházející se v nehomogenním prostředí nebo probíhající zhášecí proces či jiné vlivy prostředí, v němž se molekuly fluorescenční sondy nacházejí.

Časově rozlišená spektra (TRES)

Tato technika je užitečná v případě, kdy se ve vzorku nachází více emitujících složek, přičemž výsledné emisní spektrum je výsledkem vzájemně se překrývajících spekter různých fluoroforů či forem fluoroforů.

Jedná se o soubor časově závislých poklesů intenzity fluorescence měřených napříč celým emisním spektrem s určitým krokem vlnových délek $\Delta\lambda$. Získané vyhasínací křivky

fluorescence jsou pak vyhodnoceny vhodným matematickým modelem (1-5 exponenciální funkce), čímž jsou získány parametry potřebné k výpočtu intenzit fluorescence v různých časech. TRES lze pak zrekonstruovat dle vztahu:

$$I(\lambda, t) = I_{SS}(\lambda) \frac{\sum_j \alpha_j(\lambda) e^{\frac{-t}{\tau_j(\lambda)}}}{\sum_j \alpha_j(\lambda) \tau_j(\lambda)} \quad (8)$$

kde I_{SS} představuje steady-state intenzitu fluorescence, τ_j je doba života excitovaného stavu a α_j je její příslušná amplituda.

2.3 Zhášení fluorescence

Vlivem přítomnosti zhášeče může být fluorescence molekul fluoroforů částečně nebo úplně potlačena. Obecně, dle mechanismu tohoto procesu, dělíme zhášení fluorescence na dynamické a statické. Při statickém zhášení dochází k vytvoření nefluoreskujícího komplexu mezi fluoroforem a zhášečem, což vede ke snížení počtu molekul schopných emitovat fluorescence, aniž by byla ovlivněna střední doba života fluorescence vzorku. V případě dynamického zhášení dochází ke srážkám mezi excitovanými fluorofory a molekulami zhášeče, jež vedou k nezářivému přechodu do základního stavu.

2.3.1 Zhášení fluorescence v homogenním prostředí

V homogenním prostředí obsahujícím fluorescenční sondu P a zhášeč Q lze excitaci (9) a dynamické zhášení (10) popsat následujícími reakcemi, v nichž τ_0 představuje dobu života fluoroforu bez přítomnosti zhášeče, k značí rychlostní konstantu vyhasínání fluorescence a k_Q označuje bimolekulární zhášecí konstantu.



V přítomnosti zhášeče je doba života fluoroforu τ při dané koncentraci zhášeče $[Q]$ dána vztahem:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_Q [Q]. \quad (11)$$

Vztah (11) bývá velmi často upraven do Stern-Volmerovy rovnice, která má podobu:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_Q [Q], \quad (12)$$

kde $K_{SV} = \tau_0 k_Q$ bývá označováno jako Stern-Volmerova konstanta. Pokud má zhášecí proces čistě dynamickou podstatu, poměr τ_0/τ odpovídá poměru intenzit fluorescence I_0/I .

U statického zhášení molekula fluoroforu P v základním stavu vytváří se zhášečem Q komplex PQ, který neemituje záření. Rovnovážná konstanta tohoto děje K_{eq} pak závisí na vlastnostech páru fluorofor/zhášeč a jejich mikroprostředí



Jestliže dynamické a statické zhášení fluorescence probíhají současně, pak Stern-Volmerova rovnice přechází do tvaru

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{eq}[Q])(1 + K_{sv}[Q]). \quad (14)$$

2.3.2 Zhášení fluorescence v micelárním prostředí

Sféra efektivního zhášení

V případě, kdy fluorofor v excitovaném stavu a zhášeč nemohou měnit svoji vzájemnou pozici v prostoru (například v prostředí s vysokou viskozitou nebo v rigidní matici), navrhl Perrin model zhášení, ve kterém dochází ke zhášení fluorescence fluoroforu pouze tehdy, pokud se molekula zhášeče nachází uvnitř efektivní sféry o objemu V_P , která obklopuje fluorofor. Pokud se zhášeč nachází mimo tuto efektivní sféru, nemá na fluorescenci fluoroforu žádný vliv.

Rovnice Perrinova modelu má tvar:

$$\ln \frac{I_0}{I} = K_P[Q] = V_P N_A [Q] = \frac{4}{3} \pi R_S^3 N_A [Q] \quad (15)$$

kde je K_P označováno jako Perrinova konstanta, V_P je objem sféry, N_A je Avogadrova konstanta a R_S označuje poloměr efektivní sféry.

Určení agregačního čísla

V případě stacionárního měření fluorescence, čistě dynamického zhášení a za dodržení podmínek, že se v systému nachází pouze imobilní molekuly fluoroforu a zhášeče, koncentrace fluorescenční sondy je daleko nižší než koncentrace micel a poměr koncentrace zhášeče a micel se pohybuje v rozmezí 0–2, pak změnu intenzity fluorescence můžeme vyjádřit vztahem:

$$\frac{I_0}{I} = \exp\left(\frac{[Q]}{[M]}\right), \quad (16)$$

kde I_0 je intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášeče, I je intenzita fluorescence s přítomností zhášeče o dané koncentraci $[Q]$ a $[M]$ značí koncentraci micel v systému.

Pokud distribuce molekul fluorescenční sondy a zhášeče podléhá Poissonově statistice, pak můžeme z vynesení závislosti $\ln \frac{I_0}{I}$ na koncentraci zhášeče $[Q]$ určit agregační číslo micel N_{ag} z hodnoty směrnice této závislosti:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \frac{N_{ag}}{[S] - [CMC]} [Q], \quad (17)$$

kde $[S]$ je koncentrace roztoku tenzidu a $[CMC]$ označuje hodnotu kritické micelární koncentrace daného tenzidu.

Při časově rozlišeném měření metodou TCSPC je molekula sondy excitována krátkým světelným pulzem. V ideálním případě je za nepřítomnosti zhášedce vyhasínání fluorescence sondy monoexponenciální. Vlivem přítomnosti zhášedce se pak vyhasínací křivka mění v biexponenciální a může být proložena rovnicí, kterou navrhl Infelta a Tachiya [44] [45]:

$$I(t) = I(0) \exp \left\{ -\frac{t}{\tau_0} - C [1 - \exp(-k_q t)] \right\}, \quad (18)$$

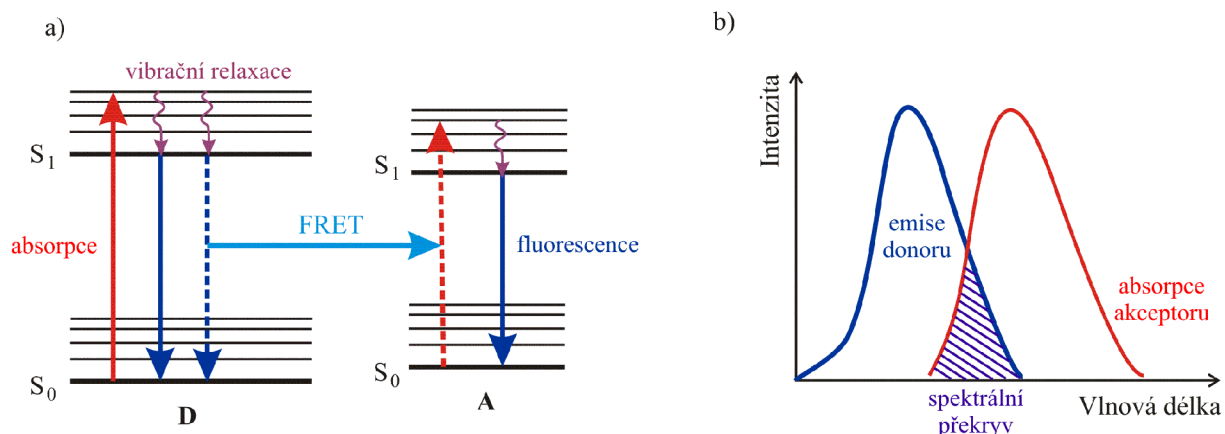
kde $I(t)$ a $I(0)$ jsou intenzity fluorescence v čase t a v čase 0, τ_0 značí dobu života sondy v micelárním prostředí, C představuje poměr koncentrace zhášedce a micel a k_q rychlostní konstantu zhášení.

Po vynesení závislosti C na koncentraci zhášedce lze ze směrnice této závislosti vypočítat hodnotu agregačního čísla:

$$C = \frac{N_{ag}}{[S] - [CMC]} [Q]. \quad (19)$$

2.4 Försterův rezonanční přenos energie

Försterův rezonanční přenos energie (FRET) je fyzikální jev popisující nezářivý přenos energie mezi dvěma molekulami fluoroforů – donorem (D) a akceptorem (A), které se nacházejí ve vzdálenosti mezi 10 a 100 Å. Tento přenos energie je uskutečněn na základě coulombických dipól-dipól interakcí. Díky jeho vysoké citlivosti se stal efektivním prostředkem k měření vzdáleností v nanoměřítku a studiu molekulových interakcí.



Obr. 13: a) Schéma rezonančního přenosu energie (Jablonského diagram). D – donor, A – akceptor. b) Znárodnění spektrálního překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru.

Mezi podmínky průběhu nezářivého přenosu energie patří spektrální překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru (Obr. 13b) a vhodná orientace přechodových momentů molekul D-A páru. Dále FRET závisí na kvantovém výtěžku fluorescence donoru a vzdálenosti mezi molekulami donoru a akceptoru.

Spektrální překryv emise donoru a absorpce akceptoru je charakterizován pomocí překryvového integrálu J , který lze vyjádřit jako:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda}, \quad (20)$$

kde $I_D(\lambda)$ je intenzita fluorescence donoru, $\varepsilon_A(\lambda)$ je absorpční molární koeficient akceptoru a λ je vlnová délka.

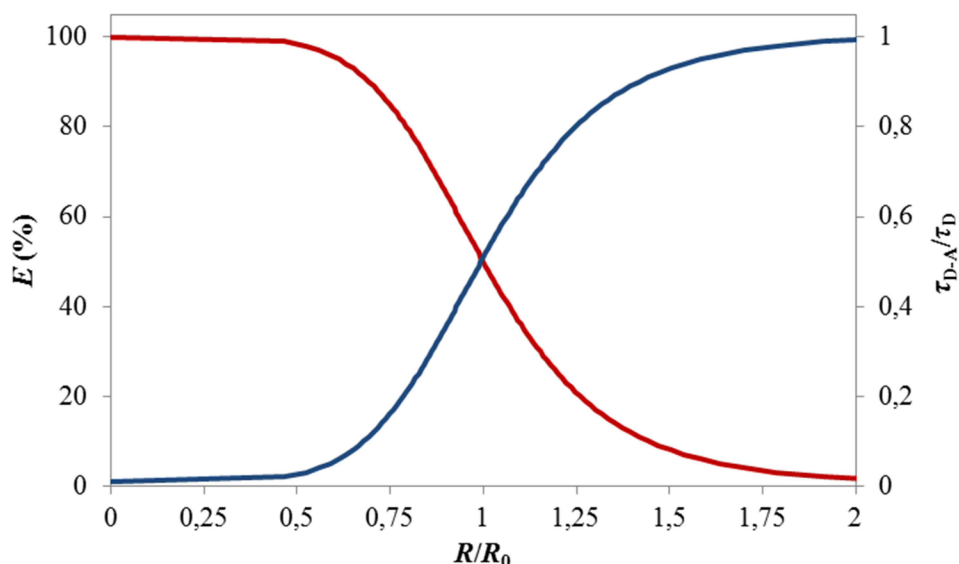
Charakteristickým parametrem FRET je tzv. Försterův poloměr R_0 , který odpovídá vzdálenosti mezi molekulami donoru a akceptoru, při které je přenos energie a spontánní rozklad excitovaného stavu donoru stejně pravděpodobný, jinak řečeno, kdy je účinnost přenosu energie rovna 50 %. Pro danou dvojici donor-akceptor je hodnota R_0 konstantní. Hodnotu Försterova poloměru lze spočítat ze vztahu:

$$R_0^6 = 8,875 \cdot 10^{-25} n^{-4} \phi_D \kappa^2 J, \quad (21)$$

kde n znamená index lomu prostředí, ϕ_D je kvantový výtěžek donoru a κ^2 odpovídá orientačnímu faktoru přechodových momentů, který může nabývat hodnot v rozmezí 0–4, přičemž v případě náhodné orientace molekul D-A je roven 2/3.

Efektivita přenosu energie E může být stanovena pomocí měření doby života nebo intenzity fluorescence donoru bez (index D) a za přítomnosti molekul akceptoru (index DA) dle rovnice:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}. \quad (22)$$



Obr. 14: Závislost efektivity FRET a doby života donoru na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem.

Efektivita přenosu energie je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti D-A. Vzdálenost mezi donorem a akceptorem R je pak dána vztahem:

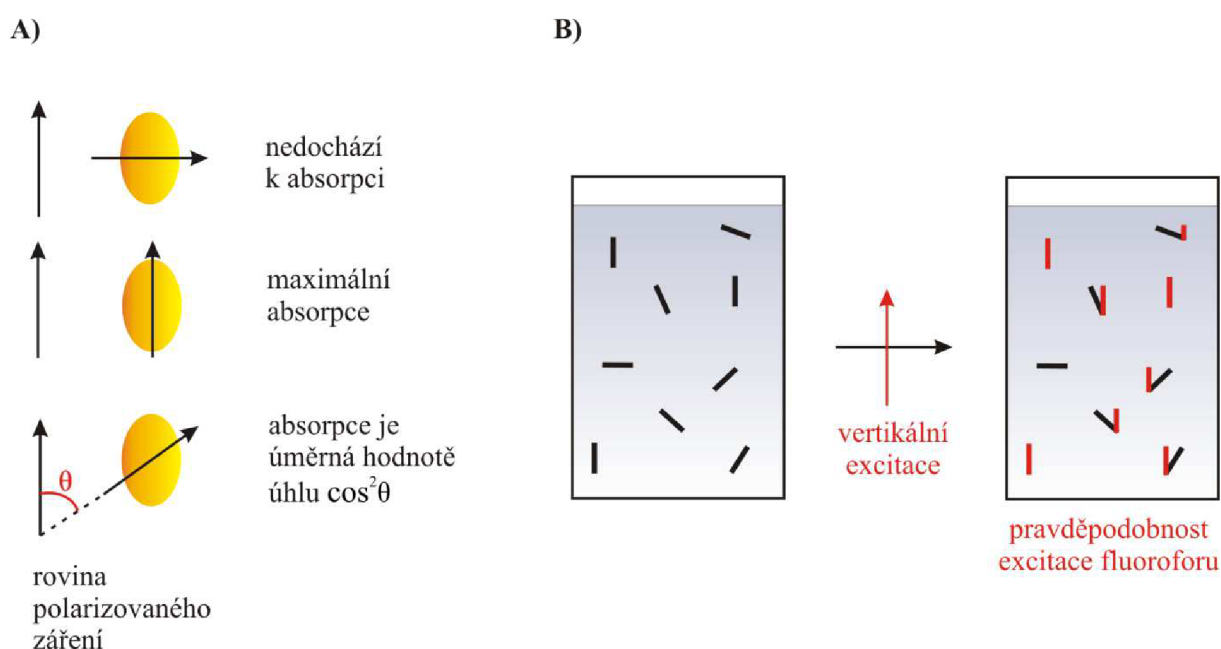
$$R = R_0 \left[\frac{1}{E - 1} \right]^6. \quad (23)$$

Vliv vzdálenosti mezi donorem a akceptorem na době života donoru a efektivitě přenosu energie je obrazně znázorněna na obr. 14.

2.5 Polarizovaná fluorescence, anizotropie fluorescence

Měření stacionární i časově rozlišené lineárně polarizované fluorescence patří mezi významné metody pro stanovování fyzikálních a chemických molekulárních vlastností a nalézá využití v širokém poli aplikací. V případě micelárních systémů se zejména využívá pro stanovení mikroviskozity uvnitř micel, jejich fluidity a dalších parametrů.

Anizotropní měření je založeno na fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem. Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, excitují se pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět absorpčního přechodového momentu do směru polarizace budícího záření. Pravděpodobnost absorpce fotonu molekulou fluoroforu je úměrná $\cos^2\theta$, kde θ je úhel, který svírá dipólový moment přechodu molekuly s rovinou polarizace excitujícího záření. Tento jev se nazývá fotoselekce (Obr. 15).



Obr. 15: A) Fotoselekce, B) Pravděpodobnost excitace fluoroforu vertikálně polarizovaným zářením.

V homogenním roztoku jsou molekuly fluoroforu orientovány náhodně. Po ozáření vzorku polarizovaným světlem dochází k selektivní excitaci, což má za následek vznik částečně orientované populace fluoroforů. Vlivem toho, že molekula fluoroforu během své doby života fluorescence vykoná mnoho pohybů (převážně rotačních), dochází k tomu, že emitované záření není ve shodě se zářením absorbovaným, ale je pootočené o určitý úhel – nastává

depolarizace. Toto pootočení je závislé na rozsahu a rychlosti rotační difúze, která souvisí s viskozitou rozpouštědla a s tvarem a velikostí rotující molekuly. Pokud bude rotace molekuly fluoroforu brzděna prostředím s vysokou viskozitou, bude naměřena velmi malá míra depolarizace, naopak, pro malou molekulu ve fluidním prostředí, bude emise záření depolarizována úplně a hodnota naměřené anizotropie se bude blížit k nule.

2.5.1 Definice a základní vztahy

Anizotropie fluorescence (r) se používá pro vyjádření míry polarizace fluorescence založené na fotoselektivní excitaci molekul fluoroforů polarizovaným světlem v opticky izotropním vzorku [2].

Stacionární anizotropie

Pro kontinuální excitaci lze hodnotu stacionární anizotropie $\langle r \rangle$ vyjádřit rovnicí:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (24)$$

kde I_{\parallel} , respektive I_{\perp} označuje naměřenou intenzitu fluorescence při paralelní orientaci emisního a excitačního polarizátoru, respektive při jejich kolmé orientaci. V alternativním zápisu lze I_{\parallel} , resp. I_{\perp} zapsat jako I_{VV} , respektive I_{VH} , kde první index odpovídá orientaci excitačního a druhý index orientaci emisního polarizátoru (vertikálně-vertikálně, vertikálně-horizontálně).

Polarizační stupeň

Další veličinou vyjadřující polarizaci fluorescence je tzv. polarizační stupeň $\langle p \rangle$, jenž je roven:

$$\langle p \rangle = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (25)$$

Mezi \bar{p} a \bar{r} platí přepočtení vztah:

$$\langle r \rangle = \frac{2\langle p \rangle}{3 - \langle p \rangle}. \quad (26)$$

Pro vyjádření polarizace emise je častěji využívána anizotropie, která je normalizována dle celkové intenzity fluorescence $I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ a její hodnota tak nezávisí na koncentraci fluoroforu.

Časově rozlišená anizotropie

Po excitaci velmi krátkým pulzem polarizovaného záření je okamžitá, resp. časově rozlišená hodnota anizotropie $r(t)$ dána rovnicí:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (27)$$

kde $I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t) = i(t)$ je totální časově rozlišená intenzita fluorescence. Z této rovnice a výrazu pro $i(t)$ lze získat časový vývoj jednotlivé polarizované složky:

$$i_{\parallel}(t) = \frac{i(t)}{3} [1 + 2r(t)], \quad (28a)$$

$$i_{\perp}(t) = \frac{i(t)}{3} [1 - r(t)]. \quad (28b)$$

Vztah mezi stacionární a časově rozlišenou anizotropií je dán rovnicí:

$$\langle r \rangle = \frac{\int_0^{\infty} r(t) i(t) dt}{\int_0^{\infty} i(t) dt}. \quad (29)$$

Aditivní zákon anizotropie

Celková anizotropie směsi, ve které jsou jednotlivé složky i charakterizovány hodnotou anizotropie r_i a přispívají k celkové intenzitě fluorescence frakcí $f_i = I_i / I$, je rovna součtu individuálních anizotropií. Tento vztah platí jak pro stacionární, tak časově rozlišenou anizotropii.

$$r = \sum_i f_i r_i. \quad (30)$$

V případě, že jednotlivé složky směsi vykazují mono-exponenciální vyhasínací křivku fluorescence s dobou života τ_i , pak může být jejich frakční intenzita v čase t vyjádřena jako

$$f_i(t) = \frac{a_i \exp(-t/\tau_i)}{I(t)}, \quad (31)$$

kde $I(t)$ je rovno:

$$I(t) = \sum_i a_i \exp(-t/\tau_i). \quad (32)$$

Hodnota časově rozlišené anizotropie $r(t)$ se pak spočítá dle vztahu:

$$r(t) = \sum_i r_i(t) \frac{a_i \exp(-t/\tau_i)}{I(t)}. \quad (33)$$

Z rovnice (33) vyplývá, že v čase t je hodnota anizotropie fluorescence závislá na relativním podílu z celkové intenzity fluorescence ve stejném čase. Tento fakt potvrzuje i definice emisní anizotropie založená na praktickém měření celkových komponent I_{\parallel} a I_{\perp} . Hodnota $r(t)$ by tedy měla být vnímána spíše jako „technická“ nebo „zřejmá“ anizotropie, jelikož v sobě neodráží celkovou orientaci relaxace po fotoselekcii, jak je tomu v případě populace jednoho druhu fluoroforu.

Fundamentální anizotropie

Jedná se o teoretickou hodnotu anizotropie fluorescence při absenci veškerého rotačního pohybu molekul fluoroforu. V praxi je pohybu fluoroforu bráněno pomocí rigidního

prostředí. Naměřená hodnota anizotropie, která je označovaná jako limitní anizotropie, je pak vždy o něco málo menší než teoreticky vypočítaná hodnota pro daný fluorofor.

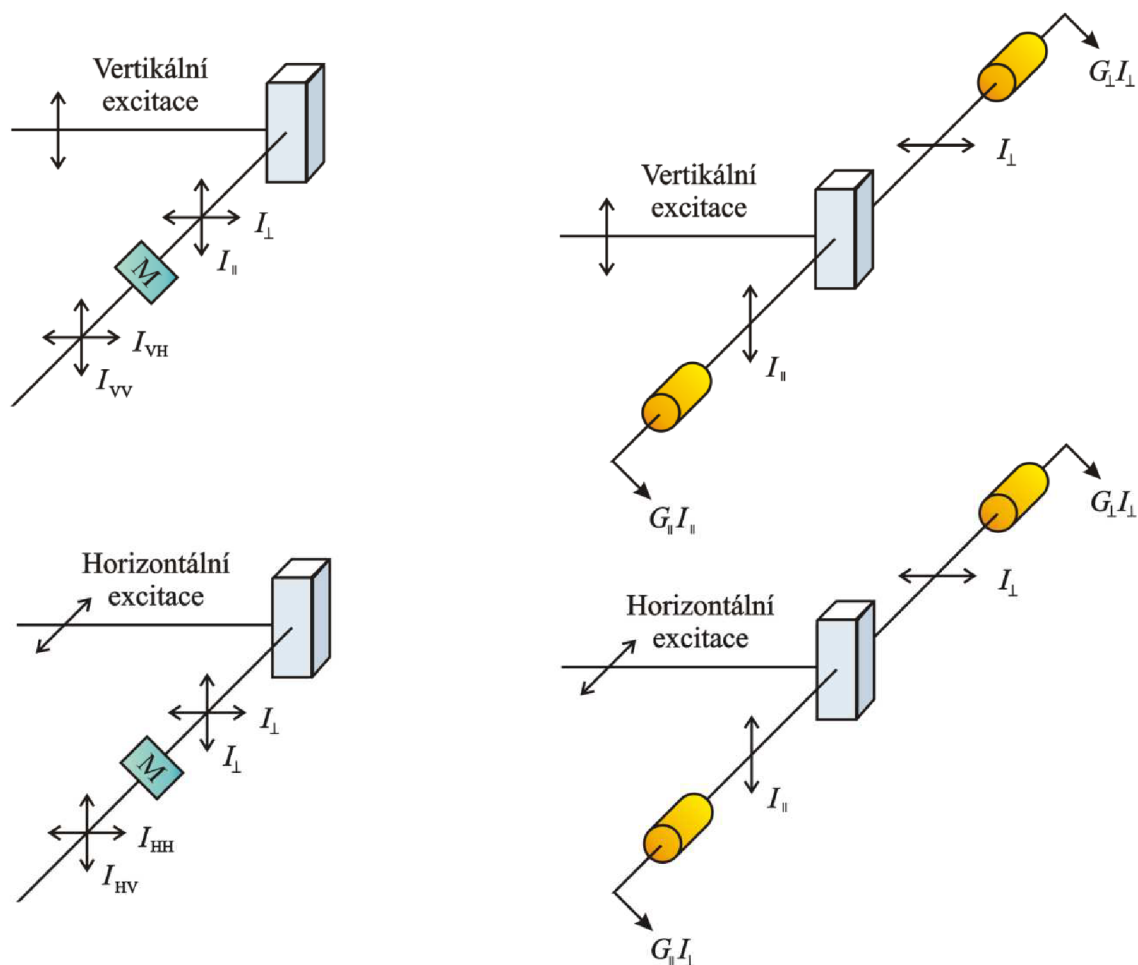
Teoretická hodnota fundamentální anizotropie při jedno-fotonové excitaci závisí pouze na úhlu β mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly fluoroforu dle rovnice:

$$r_0 = \frac{1}{5}(\cos^2\beta - 1). \quad (34)$$

Maximální hodnoty $r_0 = 0,4$ pak fundamentální anizotropie nabývá pro úhel $\beta = 0^\circ$, který odpovídá paralelním přechodovým momentům a minimální hodnoty $r_0 = -0,2$ pro $\beta = 90^\circ$, kdy jsou přechodové momenty orientovány kolmo.

2.5.2 Měření anizotropie fluorescence

V praxi se běžně používají dva typy měření anizotropie fluorescence (viz obr. 16). Častější z nich je tzv. L-formát, u kterého jsou jednotlivé polarizované složky emise detekovány postupně pomocí jednoho emisního kanálu. Druhým typem měření je tzv. T-formát, ve kterém jsou kolmé a paralelní složky emise pozorovány současně prostřednictvím samostatných emisních kanálů, což vyžaduje jejich shodnou odezvu.



Obr. 16: Schéma měření stacionární anizotropie fluorescence – vlevo – L-formát, vpravo – T-formát.

V L-formátu je vzorek postupně excitován různě polarizovaným zářením, přičemž emise vzorku je sledována pomocí monochromátoru obvykle umístěného kolmo na excitační paprsek. Jedná se o po sobě jdoucí čtyři měření, a to při nastavení polarizátorů – I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} a I_{HH} , přičemž poslední dvě měření souvisí s G-faktorem, což je korekční faktor související s rozdílnou odezvou detektoru pro rozdílné nastavení polarizátorů.

U spektrofluorimetru v T-formátu je měření prováděno následujícím postupem. Nejprve je excitační polarizátor nastaven na vertikální orientaci pro měření paralelních a kolmých signálů (R_V), následně je přestaven na orientaci horizontální (R_H), přičemž emisní polarizátory mají po celou dobu měření shodnou orientaci. Poměr R_V/R_H pak odpovídá rovnici:

$$\frac{R_V}{R_H} = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}. \quad (35)$$

Hodnotu anizotropie fluorescence pak vypočítáme ze vztahu:

$$\langle r \rangle = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} + 2}. \quad (36)$$

G-faktor

Pro vertikální a horizontální složky polarizované emise se reakce optických prvků a detektoru může lišit. Tento rozdíl v citlivosti detekčního kanálu lze pro každou emisní vlnovou délku korigovat tzv. G-faktorem, který představuje poměr citlivosti detekčního systému pro vertikálně a horizontálně polarizované záření. Anizotropie stacionární fluorescence pak může být spočítána z rovnice:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G(\lambda_{em})I_{VH}}{I_{VV} + 2G(\lambda_{em})I_{VH}}. \quad (37)$$

Hodnota $G(\lambda_{em})$ se nejčastěji určuje pomocí excitace vzorku horizontálně polarizovaným světlem při zachování všech ostatních optických nastavení přístroje (štěrbiny, filtry apod.). Tímto způsobem je detekční kanál ozářen stejným množstvím horizontálně a vertikálně polarizovaného světla. Pro I_{HV} a I_{HH} jako aktuální experimentální signály pak platí vztah:

$$G(\lambda_{em}) = \frac{I_{HV}(\lambda_{em})}{I_{HH}(\lambda_{em})}. \quad (38)$$

Magický úhel

Při měření intenzity fluorescence je obvyklé měření signálu, který je úměrný celkové intenzitě fluorescence I_T , nikoli částečné I_{\parallel} nebo I_{\perp} . Vzhledem k tomu, že účinnost přenosu emisního monochromátoru závisí na polarizaci záření, pozorovaný signál není přesně úměrný $I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}$, ale jiné kombinaci I_{\parallel} a I_{\perp} . Aby měření celkové intenzity fluorescence nebylo závislé na stupni polarizace vzorku, je při vertikálním nastavení excitačního polarizátoru potřeba nastavit emisní polarizátor na tzv. magický úhel, tj. $54,7^\circ$.

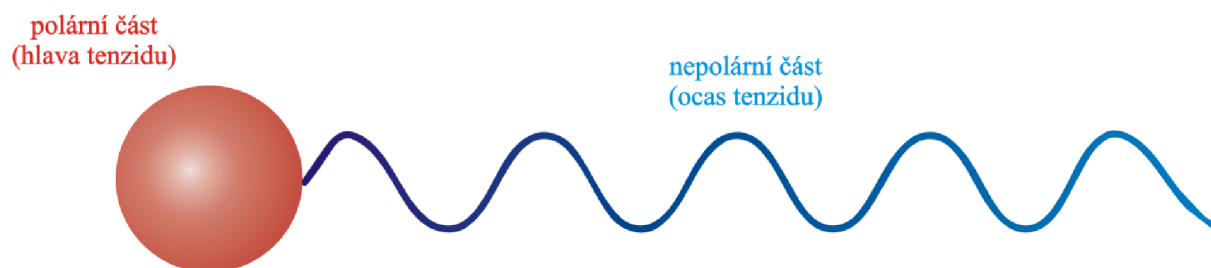
2.6 Tenzidy, asociativní (micelární) koloidy

Pod pojmem asociativní koloidy se ukrývají agregáty vzniklé „samo-sdružováním“ (*self-assembly*) molekul tenzidů. Tyto koloidní soustavy bývají klasifikovány jako lyofilní, ačkoliv se v některých směrech chovají jako dvoufázové systémy. Z termodynamického hlediska se jedná o stabilní systémy a lze pro ně do jisté míry používat termodynamiku pravých roztoků [46].

Tenzidové struktury v některých ohledech napodobují biologické struktury, a proto mohou být použity jako modelové systémy k napodobení funkce enzymů či membrán. Například ve fyziologických systémech jsou běžné tenzidové agregáty zvané lipozomy [47].

2.6.1 Struktura tenzidů

Tenzidy řadíme mezi amfifilní (amfipatické) organické sloučeniny, které mají vysoké tendence hromadit se na mezifázovém rozhraní. Jejich molekuly jsou složeny ze dvou částí – tzv. ocasu tenzidu, který je tvořen jedním či více nepolárními (hydrofobními) uhlovodíkovými řetězci a polární (hydrofilní) hlavou tenzidu.



Obr. 17: Molekula tenzidu.

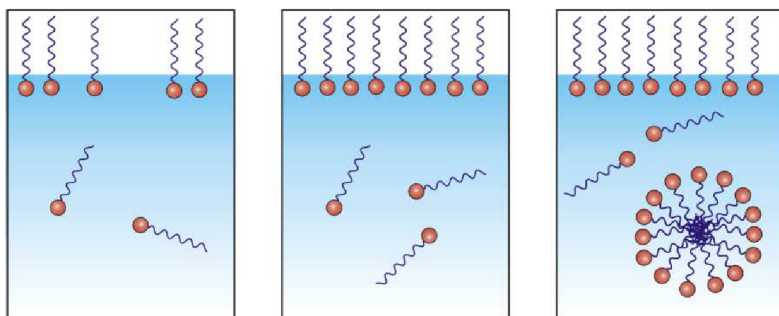
Uhlovodíkový řetězec může být lineární i rozvětvený, nasycený i nenasycený a může také obsahovat aromatická jádra. Ve většině případů se však jedná o rovný alkylový řetězec obsahující 8 až 18 atomů uhlíku. Dle povahy polární skupiny se tenzidy dále klasifikují (viz kapitola 2.6.4.).

2.6.2 Adsorpce tenzidů, vznik micel

Tenzidy patří do skupiny látek označovaných jako povrchově aktivní látky, díky tendenci se hromadit na mezifázovém rozhraní. Řídící silou tohoto procesu je snaha o snížení mezifázové energie (snížení povrchového napětí).

Při velkém zředění tvoří tenzidy pravé roztoky, následné zvyšování jejich koncentrace vede ke vzniku micel. Agregace je závislá na koncentraci tenzidu a probíhá ve dvou krocích. V první řadě nastane fázová separace, jednotlivé molekuly tenzidů se hromadí na fázovém rozhraní, hydrofilní části míří do roztoku, hydrofobní části tenzidů míří ven z roztoku. Díky tomu dochází ke snižování povrchového napětí, zvýšení osmotického tlaku a změně dalších fyzikálních vlastností roztoku. Jakmile se povrch roztoku nasytí molekulami tenzidu, začnou v něm vznikat micely [48]. Tento okamžik souvisí s pojmem kritická micelární koncentrace (CMC), což je hraniční hodnota koncentrace daného tenzidu, do které se vyskytoval v roztoku pouze v unimolekulární formě, ale od které již začíná vytvářet koloidní útvary,

tzn. micely. Při dalších přidávcích tenzidu do systému zůstává koncentrace unimolekulární formy stejná, pouze vznikají další a další micely.



Obr. 18: Adsorpce tenzidu na mezifázovém rozhraní, micelizace.

Hodnota CMC je důležitou charakteristikou, která je specifická pro jednotlivé tenzidy. Micely jsou dynamické agregáty, které mohou mít mnoho tvarů – kulatý, elipsoidní, zploštělý, protáhlý apod. a také různou velikost. Dalším agregačním parametrem je tzv. agregační číslo, které udává počet molekul tenzidu, z nichž se daná micela skládá.

2.6.3 Struktura micely

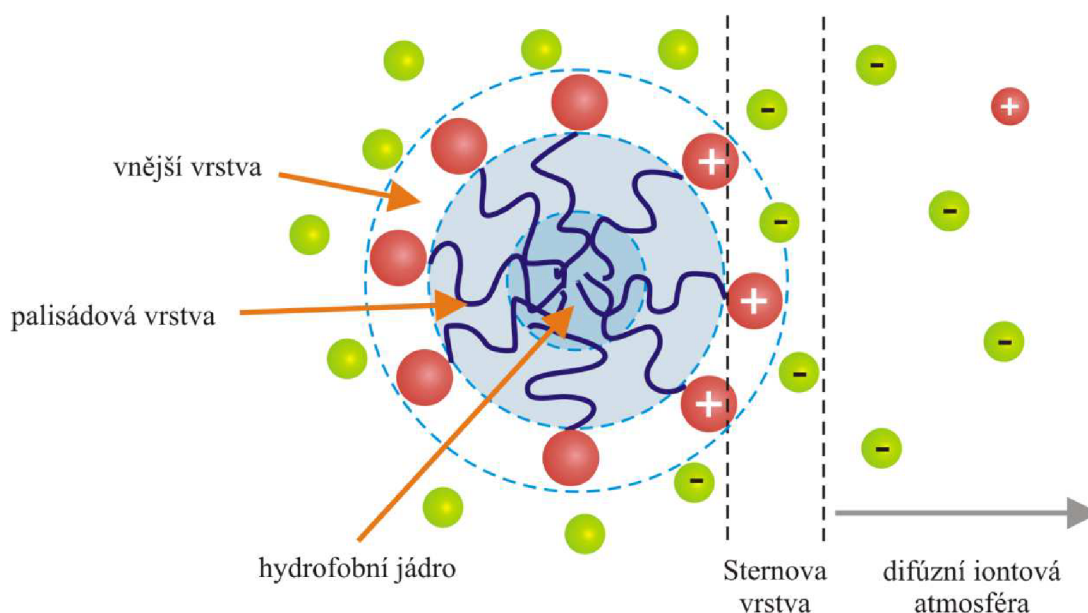
Velikost a tvar vznikajících micel závisí na několika faktorech jako je teplota, tlak, koncentrace (ať už vlastní, nebo přidaných látek), molekulární struktura tenzidu a další.

Základní rozdělení micel dle struktury je odvozeno od prostředí, ve kterém dané micely vznikají. Jádru micely má vždy opačný charakter než okolní prostředí. Ve vodném (polárním) prostředí je jádro micely tvořeno propletenými uhlovodíkovými řetězci molekul tenzidů, kdežto v nepolárním prostředí vzniká tzv. reverzní micela s jádrem tvořeným polárními hlavami tenzidu. Díky tomu se uvnitř micely mohou rozpouštět látky nerozpustné v daném prostředí, i když se celá micela jeví jako rozpustná.

Vnitřní struktura iontové micely ve vodném prostředí

Na následujícím obr. 19 je vyobrazena kationtová sférická micela ve vodném prostředí, jejíž strukturu lze rozdělit do tří částí. První z nich je tzv. vnější vrstva, oblast obsahující polární hlavy tenzidů. Jedná se o rozhraní mezi micelou a okolními molekulami vody. Druhou částí micel je tvořena tzv. palisádovou oblastí, která je tvořena vnějšími částmi hydrofobních uhlovodíkových řetězců. Poslední, třetí část, bývá označována jako vnitřní jádro micely [49].

U iontových micel se v blízkosti polárních hlav nacházejí také vázané protiionty (Sternova vrstva). Zbývající protiionty existují kromě Sternovy vrstvy také volně v roztoku. Tyto ionty podléhají elektrostatické přitažlivosti, která je poháněna směrem k micelám a zároveň tepelnému pohybu. Výslednicí těchto opačných sil je pak difúzní iontová atmosféra.



Obr. 19: Sférická kationtová micela ve vodném prostředí.

2.6.4 Klasifikace tenzidů

Základní rozdělení tenzidů je založeno na porovnání schopnosti disociovat ve vodném roztoku. Dle toho pak tenzidy rozdělujeme na iontové (ionogenní) a neiontové (neionogenní). Iontové pak dále dělíme podle náboje polární skupiny na kationtové, aniontové a amfoterní.

Neiontové tenzidy nejsou schopny elektrolytické disociace v roztoku. Jejich rozpustnost ve vodě je způsobena přítomností polárních hydrofilních skupin se silnými hydratačními schopnostmi (např. hydroxylových, esterových).

Amfoterní tenzidy obsahují dvě hydrofilní skupiny, jednu zásaditou a jednu kyselou, které jsou schopny v roztoku disociovat v závislosti na pH prostředí. V alkalickém prostředí se tedy chovají jako aniontové tenzidy, v kyselém jako kationtové. Kyselou funkční skupinou bývá karboxylová nebo sulfoskupina, zásaditou pak nejčastěji aminoskupina.

Aniontové tenzidy nesou po disociaci záporný náboj. Nejčastější funkční skupinou hydrofilní části bývá karboxylová skupina, popřípadě ji tvoří sulfáty, sírany nebo fosforečnany.

U kationtových tenzidů je ve většině případů kladný náboj nesen atomem dusíku, nejčastějším případem je kvartérní amoniová skupina.

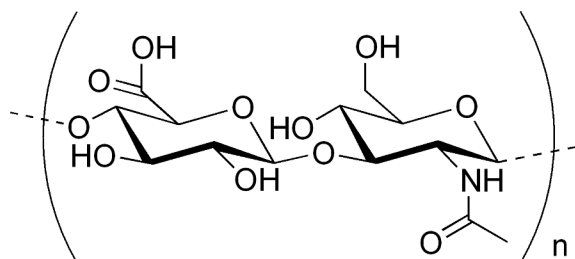
2.7 Kyselina hyaluronová, hyaluronan

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan, který objevil a popsal Karel Meyer s asistentem Johnem Palmerem. V roce 1934 ji extrahovali z očního sklivce skotu. O dvacet let později Karel Meyer určil její přesnou chemickou strukturu. Její název byl odvozen z řeckého slova *hyaloid* (sklovitý) a uronové kyseliny, kterou v ní Meyer s Palmerem objevili společně s glukosaminem [50].

V živém organismu se kyselina hyaluronová převážně vyskytuje v disociované formě (sodná nebo draselná sůl), kterou označujeme jako hyaluronan.

2.7.1 Struktura

Kyselina hyaluronová je přísně lineární polymer, který je složen z opakujících se disacharidových jednotek – kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou.



Obr. 20: Struktura kyseliny hyaluronové.

Struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní, jelikož glukóza v β -konfiguraci dovoluje objemnějším skupinám (hydroxyly, část karboxylátu, anomerní uhlík) zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální pozici, zatímco malé atomy vodíku zabírají stericky méně příznivou axiální polohu. Ekvatoriální boční řetězce tvoří polární, hydrofilní část řetězce, zatímco axiální vodíky vytváří hydrofobní oblasti (*hydrophobic patch*)[51; 52].

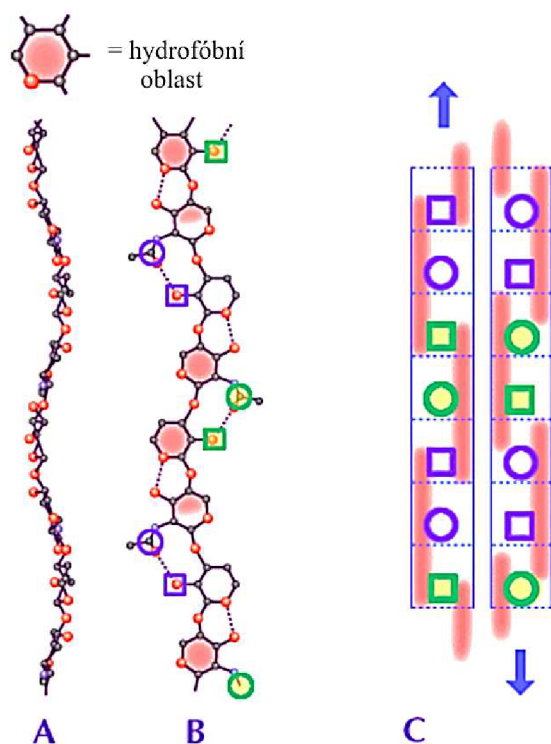
V osmdesátých letech minulého století se zabýval konformačními vlastnostmi řetězců hyaluronanu J. E. Scott s kolektivem. Nukleární magnetickou rezonancí potvrdil přítomnost uspořádané struktury hyaluronanu ve vodném roztoku, kde je každá disacharidová jednotka otočena o 180° oproti té předchozí. Po každých dvou otáčkách se tedy tato dvakrát stočená šroubovice (*two-fold helix*) vrátí na svou původní orientaci [53].

Přítomnost hydrofobních oblastí na řetězci hyaluronanu umožňuje asociaci s dalšími řetězci navzdory jejich zápornému náboji [52; 53]. Dva řetězce hyaluronanu se tedy mohou vzájemně vázat a vytvářet tak opakující se antiparalelní strukturu, ve které se hydrofobní oblasti skládají proti sobě po obou stranách každé šroubovice. Elektrostatické repulze mezi zápornými náboji, které by napomáhaly disociaci těchto agregátů, jsou překonávány hydrofobními interakcemi v kombinaci s vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou sousedních molekul. Interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu je vyobrazena na obr. 21.

Ve vodném či fyziologickém roztoku se hyaluronan chová jako typická semiflexibilní polymerní molekula – krátké řetězce zůstávají do určité míry lineární, zatímco dlouhé řetězce se „náhodně“ sbalují [52]. Struktura řetězce hyaluronanu je udržována kombinací chemické struktury disacharidů, intramolekulárních vodíkových můstků a interakcí s rozpouštědlem.

Střídání axiálních hydrofobních a ekvatoriálních polárních oblastí na dlouhém řetězci hyaluronanu má za následek tvorbu prostorově rozsáhlé domény s charakteristickými vlastnostmi. Společně s rozpouštědlem mohou do domény difundovat malé molekuly jako je voda, živiny či elektrolyty. Naopak velké molekuly (např. proteiny) jsou z ní částečně vytlačovány vlivem jejich velkého hydrodynamického objemu. Čím větší tyto molekuly jsou,

tím méně místa je pro ně v hyaluronanové doméně. Tento fakt vede ke zpomalení jejich difúze skrz doménu, což má za následek jejich nižší koncentraci v doméně oproti okolnímu prostředí bez hyaluronanu. Řetězce hyaluronanu se v roztoku neustále pohybují, tudíž se v doméně kontinuálně mění velikost efektivních pórů. Statisticky v ní existují póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností, což znamená, že všechny látky mohou procházet hyaluronovou sítí, avšak s různým stupněm zpomalení v závislosti na jejich velikosti [54; 55].



Obr. 21: Interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu [55]. A, B – zobrazení molekul hyaluronanu, červené místa na B značí hydrofobní oblasti na řetězci, čtverce reprezentují karboxylovou skupinu, kruhy skupinu acetamidovou. C znázorňuje schéma možného duplexu mezi dvěma řetězci hyaluronanu (boční pohled). Dvě participující molekuly jsou navzájem antiparalelní. Tečkované čáry ohraničují cukerné jednotky, červené pásy značí hydrofobní oblasti.

2.7.2 Biosyntéza

V lidském těle je syntéza hyaluronanu katalyzována pomocí enzymů nazývaných hyaluronansyntázy, které se řadí do třídy transmembránových proteinů. Jsou to jediné enzymy, které mají více funkcí. U obratlovců se vyskytují tři typy těchto hyaluronansyntáz, které se označují jako HAS1, HAS2 a HAS3.

Glykosaminoglykany, mezi které hyaluronan patří, jsou většinou syntetizovány v Golgiho aparátu uvnitř buňky a poté jsou připojeny k proteinům v jádře. Nicméně hyaluronan je na rozdíl od nich syntetizován v plazmatické membráně a není propojen s žádným jaderným proteinem. Samotná syntéza probíhá na vnitřní straně buněčné membrány, kde se pomocí hyaluronansyntáz střídavě váží příslušné monosachridové zbytky na konec řetězce. Rostoucí

řetězec je pak vytlačován skrz membránu do extracelulárního matrix, kde může hyaluronan vytvářet komplexy s proteiny a stává se tak součástí pericelulárního obalu [56].

Některé bakteriální kmeny jsou také schopné syntetizovat hyaluronan obdobně jako savci, kvůli usnadnění jejich patogenního způsobu života. Příkladem může být lidský patogen *Streptococcus pyogenes* nebo zvířecí patogen *Pasteurella multocida*, jimiž produkovaný hyaluronan má shodnou strukturu s hyaluronanem v savčích tkáních. Bakterie si z hyaluronanu vytvoří silnou obalovou vrstvu, čímž se stanou nerozpoznatelnými pro imunitní systém hostitele a napadaný organismus se jim pak nemůže účinně bránit [57; 58].

2.7.3 Výskyt, biologické funkce

Hyaluronan se prakticky vyskytuje ve všech tkáních obratlovců a také jej můžeme nalézt u některých bakteriálních kmenů, např. *Streptococcus* a *Pasteurella*, u nichž bývá součástí buněčné stěny. V lidském těle je základní stavební jednotkou mezibuněčné matrix. Ve větší míře se nachází v synoviální tekutině, pupeční šňůře, očním sklivci a kůži. Průměrný muž vážící 70 kg má okolo 15 g hyaluronanu v těle, z nichž je denně jedna třetina degradována a opět nasyntetizována [59; 60].

Hyaluronan má díky své schopnosti vázat se na receptory vliv na řadu významných procesů a funkcí buněk, taktéž na změny genové exprese. Konkrétní biologická aktivita je ovlivněna jeho molekulovou hmotností, délkou řetězce a okolností, za kterých je syntetizován. Podle toho pak reaguje s různými receptory a spouští různé signální dráhy. Nízko a vysokomolekulární hyaluronan mají často opačné buněčné odezvy. Vysokomolekulární hyaluronan je jedním z nejdelších polymerů v extracelulární matrix živočichů. Vyznačuje se anti-angiogenními účinky, potlačuje imunitní odezvu organismu a inhibuje proliferaci a migraci buněk. V synoviální tekutině slouží jako lubrikant a tlumič nárazů, zlepšuje metabolismus chondrocytů a inhibuje degradaci kloubní chrupavky. Jako součást pericelulární matrix zabraňuje prostupu virů a bakterií k buňce, napomáhá hojení ran a produkci nové granulační tkáně během zánětu. Naopak nízkomolekulární hyaluronan pro-angiogenní účinky, podporuje buněčnou proliferaci a migraci a působí jako stimulant zánětlivé cytokineze [61].

2.7.4 Využití

Díky svým vlastnostem a biologické kompatibilitě je hyaluronan látka velmi využívaná v medicínských aplikacích od přípravků na hojení ran, přes oční chirurgii, ortopedii a revmatologii až po plastickou chirurgii. Hyaluronan je spolu s ostatními glykosaminoglykany a kolagenem důležitou složkou při obnovení poraněné tkáně. Například v případě popálenin urychluje epitelizaci pokožky a podporuje tak schopnost zhojení bez jizev. Dále se využívá v kosmetických aplikacích, zejména k přípravě gelů a krémů proti vráskám a stárnutí kůže. Rozvoj zažívá použití hyaluronanu v tkáňovém inženýrství a také jeho využití pro cílenou distribuci nebo řízené uvolňování léčiv.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy

Na interakce mezi záporně nabitým hyaluronanem a kladně nabitými tenzidy typu alkytrimethylamonium bromid s různě dlouhými alkylovými řetězci (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků) se ve svých člancích zaměřili autoři *Thalberg a spol.* [62–67].

Pomocí NMR, metody fázové separace, vodivosti a solubilizace barviv zjistili, že se na hyaluronan váží tenzidy, které mají v alkylovém řetězci více jak deset atomů uhlíku, přičemž jejich vázání začíná již při velmi nízkých koncentracích hluboko pod hodnotou kritické micelární koncentrace daného tenzidu [62]. Interakce mezi hyaluronanem a těmito tenzidy pak vedou ke vzniku agregátů podobným micelám, které jsou vázány na kostře hyaluronanu. Tyto agregáty mají menší velikost oproti volným micelám tenzidu v roztoku bez přítomnosti polyelektrolytu. Vzniklou strukturu pak vystihuje model perlového náhrdelníku. U tenzidů s kratším uhlovodíkovým řetězcem je z energetického hlediska upřednostňována tvorba volných micel.

Také se ukázalo, že při dosažení určitého stupně navázání tenzidu na řetězec hyaluronanu přestávají být vznikající komplexy rozpustné ve vodě, což vede k fázové separaci a vzniku precipitátu [63]. Ten lze zpětně rozpustit přidávkem velkého nadbytku tenzidu nebo přidáním nízkomolekulárního elektrolytu.

Dále se tento tým zabýval fázovým chováním systému tetradecyltrimethylamonium bromid-hyaluronan-voda [64]. Hlavním znakem vytvořeného pseudofázového diagramu, v němž vrcholy odpovídají těmto třem čistým složkám, je dvoufázová oblast kapkovitého tvaru vycházející z vrcholu trojúhelníku příslušejícímu vodě, která je obklopena jednofázovým regionem. Nesymetrický tvar této dvoufázové oblasti naznačuje, že roztok koncentrovaného hyaluronanu je schopen rozpustit značné množství tenzidu. Oproti tomu se koncentrovaný roztok tenzidu po přidávku hyaluronanu téměř ihned fázově separuje. Tyto fázově separované komplexy hyaluronan-tenzid pak postupně přecházejí v průhlednou koncentrovanou fázi usazenou na dně vzorku, ve které se množství vody pohybuje okolo 70 %, což poukazuje na vysokou hydrofilitu výsledného komplexu.

Rostoucí délka alkylového řetězce tenzidu má za následek rozsáhlejší dvoufázový region, přičemž snižující se molekulová váha hyaluronanu vede pouze k nepatrným změnám v jeho poloze. Z toho tedy vyplývá, že interakce mezi hyaluronanem a tenzidem jsou méně preferovány se snižující se délkou alkylového řetězce tenzidu a molekulová hmotnost hyaluronanu nemá na fázový diagram výraznější vliv [65].

Dále studovali vliv přidávku nízkomolekulárního elektrolytu (NaBr) na fázovou separaci systému cetyltrimethylamonium bromid-hyaluronan [66]. Bylo zjištěno, že po přidávkách malého množství elektrolytu dochází ke zmenšování dvoufázové oblasti ve fázovém diagramu a po dosažení kritické koncentrace NaBr (250 mM) fázová separace nadále neprobíhá. Další přidávky soli (500 mM) ale opět vedou k fázové separaci, která má avšak odlišný charakter. Oproti nízkým koncentracím soli totiž vede k separaci na roztok bohatý na hyaluronan

a roztok bohatý na množství tenzidu. Přidání soli tedy omezuje interakce mezi hyaluronanem a tenzidem, z čehož vyplývá, že značná část interakcí mezi nimi je elektrostatické povahy.

Interakci mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy typu C_n TAB zkoumali i pomocí časově rozlišené fluorescence [67]. Jako fluorescenční sondu použili pyren, jako zhášec dimethylbenzofenon. Zjistili, že kritická agregační koncentrace (CAC) odpovídá zhruba poloviční hodnotě kritické micelární koncentrace tenzidu a je závislá na koncentraci hyaluronanu v roztoku. Dále díky porovnání emisních spekter pyrenu v roztocích tenzidu s hyaluronanem a bez hyaluronanu vyhodnotili, že vznikající micely mají v obou případech podobnou strukturu.

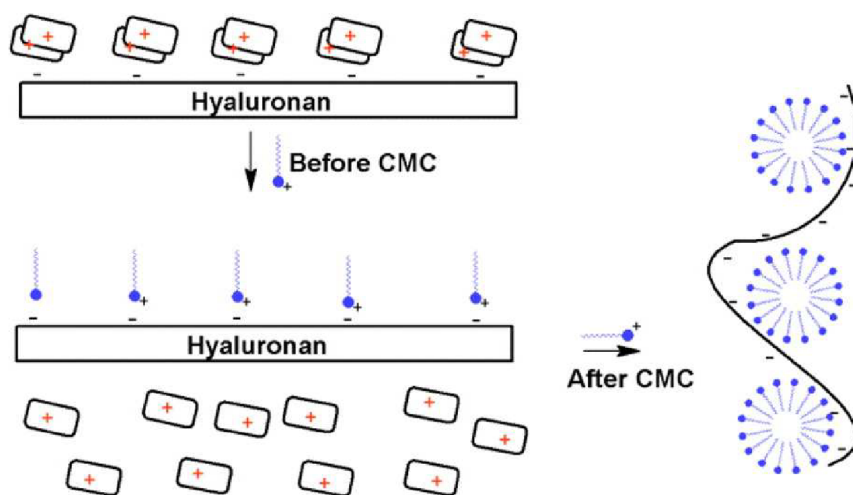
Interakce mezi hyaluronanem a tetradecyltrimethylamonium bromidem (TTAB) ve vodném prostředí při zvyšující se koncentraci chloridu sodného studoval i *Herslöf s kolektivem* [68]. Vlastnosti tohoto systému sledoval na základě měření viskozity a povrchového napětí roztoků. Ukázalo se, že při přidavku TTAB do roztoku hyaluronanu s velmi nízkým obsahem NaCl dochází k fázové separaci, naopak při vysokých koncentracích soli (200 mM) vzniká homogenní roztok, který má velmi nízkou viskozitu. Přídavek soli tedy způsobuje elektroneutralizaci záporně nabitých skupin na řetězci hyaluronanu, což je doprovázeno jeho svinutím a částečnou agregací. Při vyšších koncentracích TTAB a soli je pak preferován vznik volných micel před agregáty na řetězci hyaluronanu.

Halasová a spol. studovala interakce mezi hyaluronanem a různě nabitými tenzidy ve fyziologickém roztoku pomocí metody fluorescenční sondy a tenziometrie [69]. Naměřené výsledky ukázaly, že k tvorbě agregátů na řetězci hyaluronanu dochází v určitém rozmezí koncentrace tenzidu, je tedy vhodnější hovořit o koncentrační oblasti micelizace, nikoliv o přesné kritické micelární (agregační) koncentraci. Největší rozdíly mezi naměřenými daty příslušejícími fyziologickému roztoku tenzidu a fyziologickému roztoku tenzidu s hyaluronanem byly zjištěny u kationtového tenzidu CTAB a neiontového tenzidu Tween 20. U CTAB se ve fyziologickém roztoku oproti vodnému překvapivě projevilo zvýšení hodnoty CMC – přesněji řečeno, schopnost solubilizace se posunula k vyšším koncentracím tenzidu. Tento jev je pravděpodobně způsoben hydrofobními interakcemi mezi dostatečně dlouhými alkylovými řetězci CTAB a málo polárními částmi řetězce hyaluronanu, které jsou podporovány díky stínění elektrostatických sil přítomností chloridu sodného.

Mondek a spol. se zabýval vlivem hydratace hyaluronanu na interakci polymer-tenzid za pomoci pikosekundového fluorescenčního měření [70]. Porovnával přenos protonu 1-naftolu ve vodném micelárním systému CTAB a systémech hyaluronan-CTAB a polystyrensulfonát (PSS)-CTAB v závislosti na koncentraci CTAB. Pod kritickou micelární koncentrací CTAB se v systémech s PSS i hyaluronanem vytvářejí agregáty, do nichž se 1-naftol solubilizuje, díky čemuž se zpomalí proces přenosu protonu oproti vodnému prostředí. Při srovnání agregátů hyaluronan-CTAB a PSS-CTAB pak díky hydratační vrstvě hyaluronanu probíhá přenos protonu naftolu výrazně rychleji u vzorků s hyaluronanem. Stejně tomu je i v případě vzorků nad kritickou micelární koncentrací CTAB, kde přítomnost hyaluronanu v systému opět urychluje přenos protonu naftolu oproti vzorkům s PSS, který nemá hydratační obal. Tato studie přenosu excitovaného protonu 1-naftolu potvrzuje, že

hydratační vrstva hyaluronanu penetruje dovnitř micel, čímž mění emisní charakteristiky 1-naftolu.

Dále **Mondek** využil steady-state fluorescence (emisní spektra), časově rozlišenou fluorescence (doba života), mikroeologii a UV-VIS stanovení poměru absorbance monomer:dimer akridinové oranže (AO) ke sledování interakcí mezi hyaluronanem a CTAB ve vodném prostředí [71]. Ke srovnání kromě systému s hyaluronanem (hyaluronan-AO, hyaluronan-CTAB-AO) připravil a charakterizoval systémy také s polystyrenulfonátem (PSS-AO a PSS-CTAB-AO). Akridinová oranž vytváří dimery jak na řetězcích PSS, tak i na hyaluronanu, přičemž elektrostatické interakce jsou v případě hyaluronanu prokazatelně slabší vlivem jeho nižší nábojové hustoty. Po přidavku CTAB do systému dochází ke zvýšení fluorescence monomeru AO indikující disociaci dimerů a jejich nahrazení na řetězci polymeru molekulami tenzidu. Pod kritickou micelární koncentrací CTAB se jednotlivé molekuly tenzidu vážou na řetězec hyaluronanu a vytvářejí tzv. *bottle-brush* strukturu. Nad kritickou micelární koncentrací CTAB pak interakce s hyaluronanem vedou ke vzniku agregátů na řetězci polymeru. Tato struktura bývá popisována modelem perlového náhrdelníku.



Obr. 22: Princip sledování interakcí mezi hyaluronanem a CTAB pomocí akridinové oranže a schematické znázornění vznikajících struktur pod/nad kritickou micelární koncentrací CTAB [71].

Pilgrová s kolektivem studovala interakce mezi hyaluronanem a dvěma kationtovými tenzidy (CTAB a septonexem) při velmi nízkých koncentracích hyaluronanu z pohledu stability vznikajících agregátů [72]. Pomocí fluorescenční spektrometrie byl potvrzen vznik indukovaných tenzidových agregátů na řetězci hyaluronanu již před dosažením CMC v případě obou studovaných tenzidů. V určitém rozsahu koncentrací tenzid-hyaluronan pak dochází k fázové separaci a vzniku gelové fáze. Řídícím faktorem fázové separace se jeví koncentrace hyaluronanu, nikoliv poměr nábojů tenzid-hyaluronan. Agregáty v podobě indukovaných micel na řetězci hyaluronanu pak byly studovány z hlediska časové a teplotní stability a změny iontové síly v systému. U vzorků byla prokázána vysoká časová stabilita (3 měsíce při uchování v temnu a chladu), relativně dobrá teplotní stabilita (rozsah teplotních cyklů 10–50 °C), ale i významné strukturální změny po přidavku elektrolytu NaCl (0,15 M), který vede k potlačení elektrostatických interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy a tedy i k potlačení vzniku agregátů pod CMC.

3.2 Fluorescenční techniky ve výzkumu micelárních systémů

Fluorescenční spektroskopie nachází v posledních desetiletích uplatnění v široké škále oborů a aplikací díky své selektivitě, rychlosti a relativně snadné detekci. Metoda fluorescence bývá hojně využívána ke studiu vlastností fyzikálně-chemických i biologických systémů a může také poskytovat cenné informace o koloidních systémech a jejich interakcích.

Fluorescenční spektrometrie bývá mimo jiné hojně využívána ke studiu agregačního chování micelárních systémů, například ke stanovení kritické micelární koncentrace (CMC), tedy hraniční koncentrace daného tenzidu, od které dochází ke vzniku micel a také agregačního čísla N_{ag} , které dopovídá počtu molekul tenzidů, kterými je micela tvořena. Nejvyužívanější fluorescenční sondou ke stanovení CMC je pyren [12–15; 73], jehož molekula má převážně hydrofobní charakter a je pouze částečně rozpustná ve vodě. V emisním spektru pyrenu se objevují charakteristické vibrační pásy okolo 370–400 nm, jejichž absolutní a relativní intenzita, šířka a poloha závisí na polaritě mikroprostředí, v němž se jeho molekuly nacházejí [12]. Poměr intenzit fluorescence 1. a 3. vibračního pásu (emisní polaritní index EmPI, 373/383 nm) roste s rostoucí polaritou okolí pyrenu. Je známo, že závislost EmPI na koncentraci tenzidu vykazuje sigmoidní pokles [15]. Při koncentracích tenzidu pod CMC odpovídá hodnota EmPI polárnímu prostředí vody. S rostoucí koncentrací tenzidu pak hodnota EmPI klesá, což signalizuje přítomnost hydrofóbnějšího prostředí. Nad CMC jsou pak molekuly pyrenu solubilizovány do hydrofobních jader micelárních agregátů, díky čemuž se hodnota EmPI ustálí a zůstává při dalším zvyšování koncentrace tenzidu konstantní.

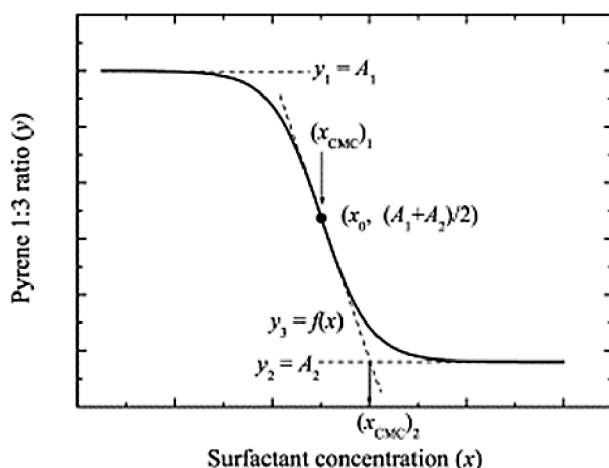
Zana a spol. zvažovali dva způsoby určení hodnoty CMC z emisního spektra pyrenu [74; 75]. Prvním způsobem je určení CMC podle inflexního bodu EmPI závislosti na koncentraci tenzidu, druhou možností je vyhodnocení CMC z průsečíku strmě klesající části a konstantní horizontální části této závislosti. Následně **Aquiar a kolektiv** navrhl jednoznačný postup pro určení těchto dvou bodů (x_{CMC1} a x_{CMC2}) [15]. Závislost EmPI (pyren 1:3) na koncentraci tenzidu může být adekvátně popsána klesající sigmoidní křivkou Boltzmannova typu:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2 \quad (39)$$

kde proměnná y odpovídá hodnotě EmPI, nezávislá proměnná x je totální koncentrace tenzidu, A_1 a A_2 jsou horní a dolní limita Boltzmannovy funkce, x_0 je její inflexní bod a Δx souvisí se strmostí křivky. Bod x_{CMC1} odpovídá inflexnímu bodu funkce x_0 , hodnotu x_{CMC2} lze určit dle vztahu:

$$x_{CMC2} = x_0 + 2\Delta x. \quad (40)$$

Na základě porovnání hodnot kritických micelárních koncentrací určených měřeními vodivosti a literární rešerše stanovili kritérium pro výběr mezi body x_{CMC1} a x_{CMC2} . Pokud je poměr $x_0/\Delta x$ větší než 10 (typicky u iontových tenzidů), pak je vhodnější za kritickou micelární koncentraci považovat bod x_{CMC2} oproti x_{CMC1} .



Obr. 23: Klesající sigmoidní křivka Boltzmannovského typu s vyznačenými charakteristickými parametry a body x_{CMC1} a x_{CMC2} [15].

Dalším charakteristickým parametrem micel je agregační číslo, které lze určit pomocí stacionárního (SSFQ) i časově rozlišeného (TRFQ) měření zhášení fluorescence (princip stanovení N_{ag} viz kapitola 2.3.2). Velmi časté je využití pyrenu jako fluorescenční sondy u obou typů měření [73; 76–82]. SSFQ zahrnuje měření intenzity fluorescence vzorku při zvyšující se koncentraci zhašeče a je obecně jednodušší na provedení i vyhodnocení dat než TRFQ, ke kterému je zapotřebí TCSPC spektrofluorimetr (viz kapitola 2.2.2.). Na druhou stranu, u SSFQ měření je třeba dodržet více omezujících pravidel a podmínek při provádění experimentu, než u časově rozlišeného měření, a také bývá zatíženo daleko větší chybou [82]. V rámci literatury jsou zjištěná agregační čísla micel časově rozlišenou metodou zpravidla vyšší než metodou stacionární. Rozdílnými výsledky mezi SSFQ a TRFQ měřením se zabývala **Alargova s kolektivem** [82]. Stanovila agregační čísla čistých tenzidů (aniontových, kationtových i neiontových) ve vodném prostředí, tenzidu SDS (dodecylsírán sodný) ve vodném prostředí s přidavkem různých polymerů a O/V mikroemulzí. Získané hodnoty agregačních čísel pomocí obou metod srovnává z pohledu kinetického poměru k_q/k . V případě, kdy kinetický poměr k_q/k je vyšší než 5, získáváme shodné hodnoty N_{ag} pro SSFQ i TRFQ, což platí zejména pro iontové tenzidy, které tvoří malé micely s nízkou viskozitou (SDS). Tuto podmínku splňovaly i studované systémy SDS-polymer, které mají sice mikroviskozitu agregátů vyšší, ale která je kompenzována nižším agregačním číslem na polymer vázaných micel. U ostatních studovaných systémů jsou získané hodnoty agregačních čísel v případě TRFQ vyšší než SSFQ, načež tento rozdíl mezi získanými hodnotami narůstá se zvyšujícím se agregačním číslem a také s narůstající mikroviskozitou agregátů.

Pomocí měření vodivosti a fluorescenčního měření (pyren, fluorescein, kumarin 6) studoval **J. Aguiar s kolektivem** vliv přidavku formamidu na micelizaci tenzidu TTAB [83]. Micelární agregační číslo stanovoval metodou statického zhášení pyrenu cetylpyridinium chloridem. S rostoucím přidavkem formamidu v systému hodnota agregačního čísla micel TTAB klesala. Tento jev souvisí s nárůstem plochy, kterou zabírá polární hlava tenzidu, což lze připisovat zvýšení solvatace micel v systémech obsahujících vyšší procento formamidu. V souladu s předchozím zjištěním, změny EmPI pyrenu poukázaly na zvýšení polarity prostředí. Hodnoty anizotropie fluorescence fluoresceinu a kumarinu 6 indikovaly se

zvyšujícím se množství formamidu snížení mikroviskozity prostředí, v němž se tyto sondy nacházely. Tato změna mikroviskozity byla vysvětlena formací micel s méně uspořádanou strukturou.

Měřením stacionární anizotropie fluorescence perylenu, difenylbutadienu (DPB) a fluoresceinu studoval **C. C. Ruiz** vliv přídavku ethylenglykolu (EG) na micelární formaci tetradecyltrimethylamonium bromidu (TTAB) [22]. Ze získaných hodnot anizotropie fluorescence jednotlivých sond solubilizovaných v různých částech TTAB micel (perylene, DPB v hydrofobním jádře a fluorescein na micelárním povrchu) porovnával mikroviskozitní změny těchto částí s rostoucím množstvím EG ve vzorku. Ukázalo se, že po přídavku EG do systému zůstává mikroviskozita hydrofobního jádra konstantní a nedochází tedy k výraznějším strukturálním změnám tohoto micelárního regionu. Naproti tomu, mikroviskozita v okolí molekul fluoresceinu s přídavkem EG vzrůstala, což bylo způsobeno pronikáním molekul EG do blízkosti micelárního povrchu.

P. Quagliotto charakterizoval agregační chování u (DTAB), cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a dvou dimerních (gemini) tenzidů typu dihexadecyl- α,ω -bis(alkyldimethylamonium bromid) pomocí měření konduktivity, intenzity fluorescence pyrenu a anizotropie fluorescence perylenu a fluoresceinu [23]. Kritickou micelární koncentraci stanovoval z hodnot EmPI pyrenu a také z naměřených hodnot anizotropie fluorescence fluoresceinu, které v závislosti na koncentraci tenzidu vykazovaly jednoduchý sigmoidní charakter. Předpokladem tohoto anizotropního měření je fakt, že při nižších koncentracích tenzidu než CMC není ve vodném prostředí bráněno rotačnímu pohybu molekul sondy. Jakmile se ale v systému začnou tvořit micely, anizotropie fluorescence vzroste díky inkorporaci molekul fluoresceinu do micel, čímž dojde ke snížení jeho rotační difúze. Získané výsledky z anizotropního měření s fluoresceinem se shodovaly s hodnotou CMC určenou pomocí konduktivity a fluorescence pyrenu. Měření anizotropie fluorescence perylenu pak poskytlo informace pro srovnání mikroviskozity a kompaktnosti hydrofobních jader micel jednotlivých tenzidů.

Časově rozlišené měření anizotropie fluorescence perylenu použil **Mathew McCarrol** pro studium vodného roztoku tritonu X-114, do kterého byl v různých množstvích přidáván aniontový tenzid SDS [24]. Při nízkých koncentracích SDS se projevila komponenta s velmi krátkým korelačním časem a křivky rozpadu anizotropie ukázaly existenci vysoké limitní hodnoty anizotropie fluorescence, což značilo, že bylo perylenu bráněno v rotačním pohybu v micelárním prostředí. Při vyšších koncentracích SDS se limitní anizotropie významně snížila, což naznačilo migraci sondy dovnitř micely.

Komaromy-Hiller s kolektivem zkoumal vývoj hodnot anizotropie fluorescence perylenu v závislosti na teplotě a koncentraci neiontového tenzidu tritonu X-114 před a po zakalení vzorků [84]. Naměřené hodnoty anizotropie využil k odhadu mikroviskozity micelárního jádra. Maximum anizotropie bylo pozorováno při dosažení CMC, bezprostředně po jejím překročení se hodnoty anizotropie snížily, což bylo připisováno zvětšení objemu micelárního jádra. Hodnoty anizotropie se pod bodem zákalu snižovaly i vlivem vzrůstající teploty, což souvisí s výraznějším rotačním pohybem sond. V bodě zákalu žádné výraznější změny

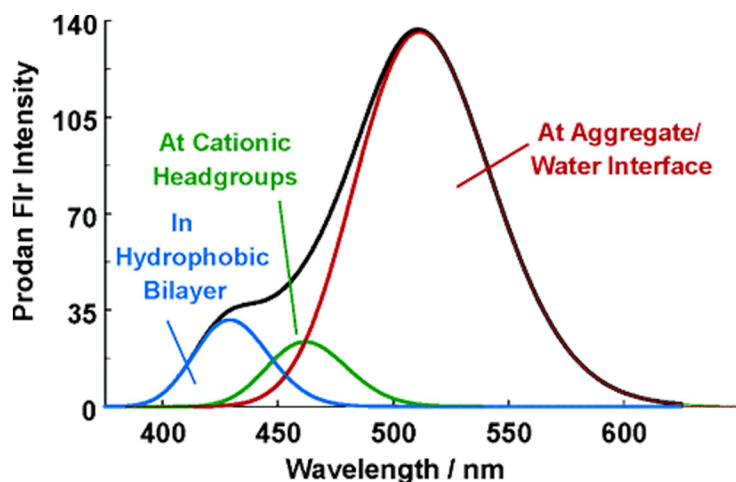
nenastaly. V oddělené micelární fázi vzniklé po zakalení vzorku byla naměřená o něco vyšší anizotropie, nicméně její hodnota s narůstající teplotou opět klesala.

Marieta Nichifor s kolektivem studovala vlastnosti hydrofobních domén vzniklých z postranních řetězců polysacharidů, které byly tvořeny *N*-alkyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(2-hydroxypropyl)amonium chloridem ve vodném prostředí [85]. Tyto vzniklé agregáty charakterizovala pomocí ustálené fluorescence (CAC), anizotropního měření (mikroviskozita) a kapilární viskozimetrie (makroviskozita). Jako fluorescenční sondy použila pyren, difenylhexatrien a *N*-fenylnaftylamin. Zjistila, že s rostoucí koncentrací a zvyšující se iontovou silou roztoku probíhají změny v konformaci polymeru na méně rozsáhlou strukturu, přičemž výsledkem je asociace hydrofobní strany řetězce. Tento stav je pak zachycen fluorofory. S rostoucí koncentrací polymeru roste i počet vznikajících malých agregátů podél řetězce, dokud nejsou asociovány všechny jeho hydrofobní části.

F. G. Sánchez studoval přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v CTAB micelách [86]. Perylen se nachází v hydrofobním jádře micelárních agregátů, kdežto fluorescein je solubilizován ve Sternově vrstvě na povrchu CTAB micel. Získané výsledky zhášecích experimentů demonstrovaly statický mechanismus zhášení páru perylen-fluorescein. Ze studia vlivu koncentrace akceptoru (fluoresceinu) na přenos energie vyplynulo, že k celkovému procesu přispívá pouze intramicelární přenos energie. Dále bylo dokázáno, že tato metoda založená na procesu přenosu energie lze využít pro stanovení agregačního čísla CTAB micel.

Aydin s kolektivem charakterizoval přenos energie mezi fluoresceinem a merocyaninem 540 ve vodných roztocích tenzidů – dodecylsírán sodný (SDS), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) a triton X-100 (TX-100) pomocí měření absorbance, intenzity fluorescence a doby života fluorescence [87]. Z naměřených výsledků stanovil rychlostní konstanty přenosu energie v jednotlivých prostředích, Försterův poloměr pro pár fluorescein-merocyanin a efektivitu přenosu v daných roztocích tenzidů. Nejvyšší efektivitu dosahoval přenos energie v roztoku CTAB, nejnižší pak v SDS.

K. K. Karukstis použil fluorescenční techniky a rozptyl světla pro charakterizaci micelárních agregátů *N*-alkyl-*N*-methylpyrrolidinium bromidu (C_n MPB) – *n* je počet uhlíků v hydrofobním řetězci (10, 12, 14, 16 a 18) [40]. Pro určení kritické micelární koncentrace použil jako sondu TNS (2-(*p*-toluidino)naftalen-6-sulfonát)), který vykazuje pouze slabou emisi ve vodném prostředí, nicméně po navázání na supramolekulární povrch intenzita jeho fluorescence výrazně vzroste. Maximum emise TNS se s rostoucí polaritou prostředí posouvá k delším vlnovým délkám – od 420 nm v organickém nepolárním rozpouštědle po 465 nm ve vodě. V micelárním prostředí má maximum fluorescence TNS polohu mezi 440–445 nm. Kritickou micelární koncentrací pak Karukstis určil na základě zlomu v závislosti intenzity fluorescence TNS při 441 nm na koncentraci vybraného tenzidu. Pro průzkum formace vznikajících agregátů zvolil jako fluorescenční sondu prodan a časově rozlišená fluorescenční měření. Výsledkem je složené emisní spektrum ze spekter jednotlivých stavů prodanu emitujících z rozdílných mikroprostředí agregátů (viz obr. 24) Pro určení agregačního čísla micel využil metodu zhášení pyrenu, jako zhášeč v systému posloužil prodan. Měření rozptylu světla ukázalo na vznik pouze sférických micel.



Obr. 24: Ukázka dekonvoluce emisního spektra prodanu ve vodném roztoku $C_{14}MPB$ na tři hlavní komponenty s maximy emise při $\lambda_1 = (436 \pm 2)$ nm (prodan v hydrofobním jádře), $\lambda_2 = (463 \pm 2)$ nm (prodan v oblasti polárních hlav) a $\lambda_3 = (508 \pm 2)$ nm (molekuly prodanu na rozhraní micelárního povrchu s vodou) [40].

Také **Karukstis a spol.** využil prodan pro studium vlastností aniontových reverzních micel voda/1,4-bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný (AOT)/n-heptan a popsal, že se v nich molekuly prodanu nachází v různých mikroprostředích, a to ve vrstvě vázané vody, mezifázovém regionu micel AOT a v n-heptanu [88]. Pro vyhodnocení získaných dat použil dekonvoluci emisního spektra do jednotlivých Gaussovských píků. Naproti tomu **Lissi a spol.** na základě souboru fluorescenčních technik tvrdí, že se molekuly prodanu ve stejném systému (reverzní micely voda/AOT/heptan) rozmístí především v nepolárním n-heptanu a na rozhraní reverzních micel, nikoliv ve vodě, kde je prodan málo rozpustný [89]. Taktéž **Sengupta s kolektivem** se v závěrech o lokalizaci prodanu v reverzních micelách AOT od Karukstise liší [36]. Sengupta tvrdí, že se molekuly prodanu nacházejí v mezifázové oblasti micel (emise v modré části spektra), v oblasti uhlovodíkových řetězců v nepolárním rozpouštědle a poslední část molekul prodanu se nachází v oblasti polárních hlav tenzidu.

4 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce bylo rozšíření povědomí o využití stacionárních a časově rozlišených pokročilých fluorescenčních technik dostupných na školícím pracovišti, které lze použít pro studium vlastností micelárních systémů a jejich interakcí s dalšími látkami, především biopolymery.

Prvním z cílů práce bylo vypracování literární rešerše, na jejímž základě byly vybrány jednotlivé použité fluorescenční techniky. Tyto techniky pak byly aplikovány na kationtové micelární systémy a jejich interakce s hyaluronanem. Jejichž problematikou se již řadu let na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně, zabývá výzkumný tým pod vedením prof. Ing. Miloslava Pekaře, CSc. Konkrétně byl fluorescenční výzkum zaměřen na ve světě poměrně neznámý kationtový tenzid septonex, českou specialitu, a známý kationtový tenzid CTAB, jejichž molekulární struktury jsou si podobné.

Z důvodu, že v odborné literatuře nebylo prozatím podrobněji komentováno agregační chování septonexu ve vodném prostředí, byla pomocí fluorescenčního měření s pyrenem stanovena jeho kritická micelární koncentrace a také jeho agregační číslo. Stejně měření bylo provedeno i pro CTAB, aby získané výsledky mohly být vzájemně porovnány.

Dalším cílem této práce bylo rozšíření prozatím získaných poznatků o interakcích mezi kationtovými micelami a řetězci hyaluronanu na základě vybraných fluorescenčních technik (anizotropie fluorescence, Försterův přenos energie, časově rozlišená fluorescence). Studované systémy vycházely z roztoků s vyšší koncentrací tenzidu, než je jeho kritická micelární koncentrace, přičemž byl studován vliv postupných přídavek hyaluronanu do systému, aby mohlo být posouzeno, zda lze zjistit informace o postupných strukturních změnách micelárního systému.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole jsou obecně shrnuty použité materiály, přístroje, standardní postup přípravy vzorků a informace o standardním vyhodnocování výsledků. Podrobnější popis provedení jednotlivých experimentů včetně vyhodnocení dat se nachází přímo u konkrétních kapitol věnujících se dané problematice.

5.1 Materiály

Fluorescenční sondy

Fluorescein sodium salt – CAS: 518-47-8, Fluka, suitable for fluorescence, č. šarže 2082530

Perylene – CAS: 198-55-0, Fluka, puriss. for fluorescence, č. šarže 2059009

Prodan (*N,N*-dimethyl-6-propionyl-2-naphthylamine) – CAS: 70504-01-7, Sigma-Aldrich, suitable for fluorescence $\geq 98\%$ (HPLC), č. šarže BCBD8898V

Pyrene – CAS: 129-00-0, Fluka, puriss. p. a. for fluorescence, č. šarže 2049273

Tenzidy

CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate) – CAS: 123-03-5, Sigma-Aldrich, minimum 99%, č. šarže: 075K0200

CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) – CAS: 57-09-0, Sigma-Aldrich, č. šarže SLBJ9504V

Septonex (Carbethependecini bromidum) – CAS: 10567-02-9, GNB chem, a.s.; č. šarže 910SEP002, 910SEP003

Hyaluronan

Hyaluronan 250–450 kDa – CPN s.r.o., č. šarže 230215-E1, $M_w = 340$ kDa

Rozpouštědla

Aceton p.a. – CAS: 67-64-1, Penta s.r.o.

Ethanol

Deionizovaná voda – PURELAB Option R7/15; ELGA, Velká Británie

Ostatní

Ludox

5.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy	Denver Instrument Mdl BC 100, Ohaus Pioneer PA214CM
Předvážky	Denver Instrument S-603
Mikropipety	Finnpipette, Eppendorf Research, Sartorius, Biohit
Třepačka	Heidolph Vibramax 100
Magnetické míchadlo	Variomag POLY 15
Vibrační míchadlo	IKA MS2 Minishaker
Refraktometr	

Luminiscenční spektrometr Fluorolog (HORIBA Scientific)

Zdroj záření	Xenonová lampa, 450 W, rozsah 200–850 nm
Monochromátory	Czerny-Turner, rozsah 0–1300 nm, přesnost 0,5 nm
Rychlost skenu	150 nm/s
Detektory	T1 – PMT, S1 – PMT, S2 – InGaAs(LN ₂)
Kvanta ϕ	integrační sféra pro měření absolutních kvantových výtěžků

TCSPC spektrofluorometr FluoroCube (HORIBA Scientific)

Zdroj záření	NanoLED diody, různé vlnové délky, 260–740 nm, pracovní frekvence 1 MHz
Monochromátor	Seya-Namioka, rozsah 200–800 nm
Detektor	IHB TBX-04 (185–650 nm, rozlišení 20 ps/kanál)
Vyhodnocování dat	program DAS6

UV-VIS spektrofotometr Cary 50 Probe (Varian)

Zdroj záření	Xenonová pulzní lampa
Monochromátor	Czerny-Turner, rozsah 190–1100 nm
Detektor	2 křemíkové diody

5.3 Standardní příprava vzorků

5.3.1 Zásobní roztoky

Všechny zásobní roztoky byly připraveny navážením potřebného množství dané pevné látky (s přesností na 4 desetinná místa) a analytickým doplněním rozpouštědla na požadovaný objem. Následně byly ponechány na magnetickém míchadle 24 hodin za laboratorní teploty.

Vodné roztoky tenzidů byly uchovány ve tmě při laboratorní teplotě. Zásobní roztoky hyaluronanu ve vodě byly uchovány v ledničce při teplotě 4 °C maximálně po dobu 10 dnů. Zásobní roztoky fluorescenčních sond v těkavých rozpouštědlech/vodě byly taktéž uchovány v ledničce při 4 °C.

5.3.2 Vzorčky s fluorescenční sondou

Do vialky bylo napipetováno požadované množství zásobního roztoku fluorescenční sondy v těkavém rozpouštědle, které bylo za sníženého tlaku odpařeno. Následně bylo do vialky přidáno potřebné množství zásobního roztoku požadované komponenty v požadovaném rozpouštědle, zpravidla v pořadí: zásobní roztok tenzidu, zásobní roztok hyaluronanu, voda. Pro zajištění důkladné solubilizace fluorescenční sondy byly vzorky před měřením ponechány 24 h na třepačce při laboratorní teplotě.

5.4 Vyhodnocení dat

5.4.1 Statistika vyhodnocení

U všech provedených experimentů byly namíchány minimálně tři paralelní sady vzorků. Prezentované hodnoty naměřených veličin jsou průměrnými hodnotami, jako chybové úsečky jsou do grafů vyneseny výběrové směrodatné odchylky.

5.4.2 Standardní vyhodnocení doby života (TCSPC měření)

K analýze dat získaných měření časově rozlišené fluorescence byl použit program DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software od firmy Horiba, který pracuje na principu metody nelineárních nejmenších čtverců. Pro zjištění dob života fluoroforu nacházejícího se ve studovaném vzorku, byly naměřené vyhasínací křivky fluorescence vyhodnoceny proložením 1-5 exponenciální funkcí, jejíž obecný tvar je:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right), \quad (41)$$

kde t představuje čas, A je korekční parametr, B je před-exponenciální funkce, která souvisí s množstvím konkrétní emitující látky v analyzovaném vzorku a τ je příslušná doba života.

Dvěma hlavními možnostmi, kterými lze reprezentovat B funkci, jsou:

- 1) Relativní (frakční) amplituda, která je vázána na konkrétní dobu života. Tato možnost je vhodná pro porovnání získaných dat se stacionární fluorescencí.

$$f_i = \frac{B_i \tau_i}{\sum_i B_i \tau_i}. \quad (42)$$

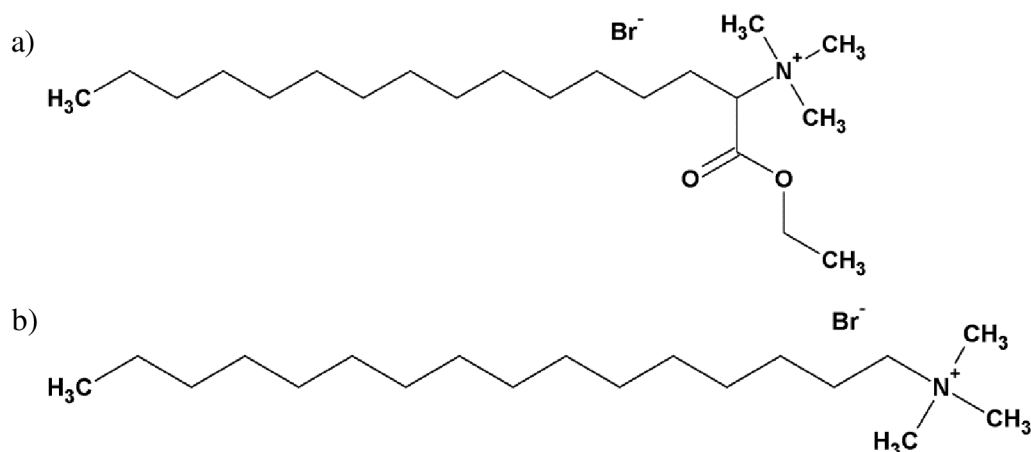
- 2) Normalizovaná hodnota, která je vhodná pro důkladnou analýzu multi-komponentních systémů.

$$b_i = \frac{B_i}{\sum_{i=1}^n B_i}. \quad (43)$$

Správnost proložení dat byla hodnocena vizuální kontrolou proložení naměřených dat zvolenou exponenciální funkcí, vizuální kontrolou náhodného rozložení vážených residuí a pomocí sledování hodnoty redukovaného χ^2 parametru, který má při správném proložení dat hodnotu kolem jedné.

6 KRITICKÁ MICELÁRNÍ KONCENTRACE SEPTONEXU A CTAB

Jako základ pro další experimenty byla v rámci této práce provedena charakterizace agregačního chování dvou používaných kationtových tenzidů – septonexu a CTAB (Obr. 25), ve vodném prostředí za pomoci fluorescenční spektrometrie. Prvním určeným parametrem byla kritická micelární koncentrace (CMC), která odpovídá hraniční koncentraci tenzidu, od níž dochází ke vzniku agregátů tenzidů zvaných micely. Pro stanovení hodnoty CMC byl jako fluorescenční sonda využit pyren, jehož molekula se vyznačuje vysokou citlivostí na polaritu prostředí, v němž se nachází.



Obr. 25: a) Septonex, b) CTAB.

6.1 Experimentální část

6.1.1 Příprava vzorků

Pro daný tenzid byla připravena řada s konstantní koncentrací pyrenu ($2 \cdot 10^{-6}$ M), v níž se koncentrace tenzidu pohybovala od 0,01 do 5 mM se zaměřením se na oblast předpokládané micelární koncentrace. Vzorky byly namíchány standardním postupem.

6.1.2 Měření

U vzorků byly naměřeny absorpční spektra v rozsahu 300–600 nm, s krokem 1 nm a rychlostí 600 nm/min. Emisní spektra byla měřena v rozmezí 360–530 nm, s krokem 1 nm, při nastavení excitačního monochromátoru na 336 nm a integračním čase 0,1 s. Emisní spektra pak byla korigována na vnitřní filtrační efekt dle vztahu [1]:

$$I_{\lambda, \text{kor.}} = I_{\lambda} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{\lambda} + A_{\text{exc}})}, \quad (44)$$

kde $I_{\lambda, \text{kor.}}$ a I_{λ} označuje intenzitu fluorescence korigovanou a naměřenou pro danou vlnovou délku λ , respektive. A_{λ} a A_{exc} , pak odpovídá absorpenci při dané a excitační vlnové délce. Všechna měření probíhala při teplotě 25 ± 1 °C.

6.1.3 Vyhodnocení dat

Z korigovaných emisních spekter byly vypočítány parametry EmPI (poměr intenzity fluorescence pyrenu při 373 a 383 nm) a Ex:Mo (poměr intenzity fluorescence excimeru při

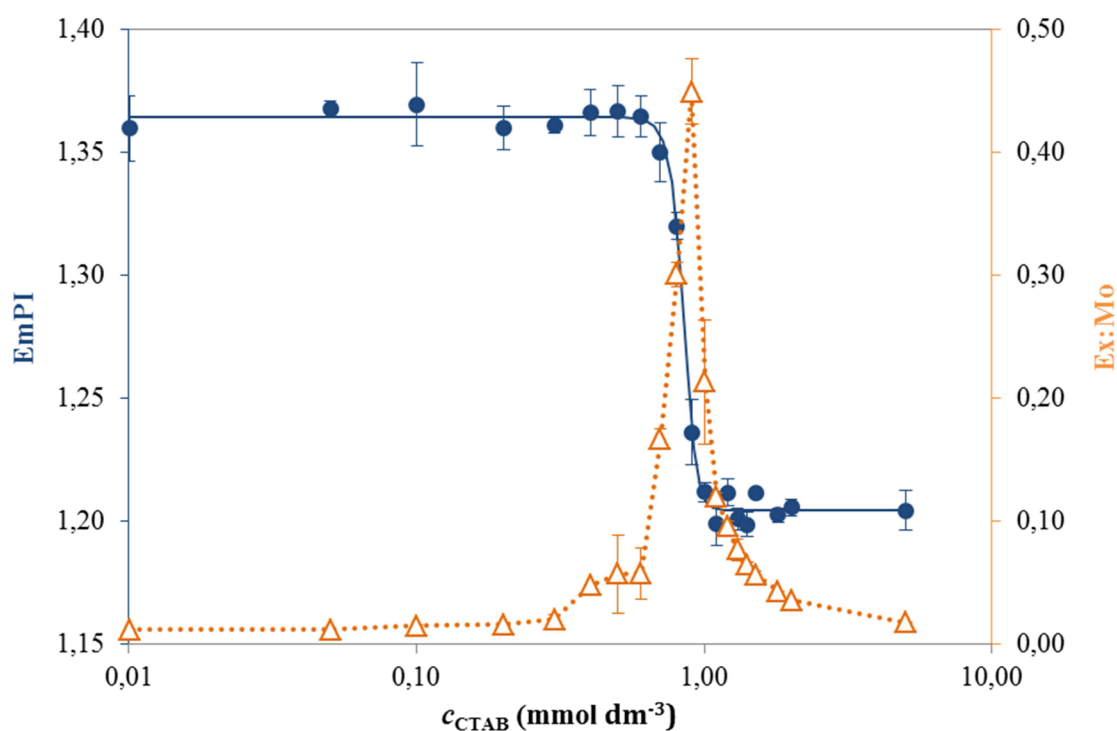
470 nm a monomeru při 373 nm). Získaná závislost EmPI na koncentraci tenzidu byla proložena Boltzmannovým modelem v programu OriginPro 8.1, jehož rovnice je dána jako:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (45)$$

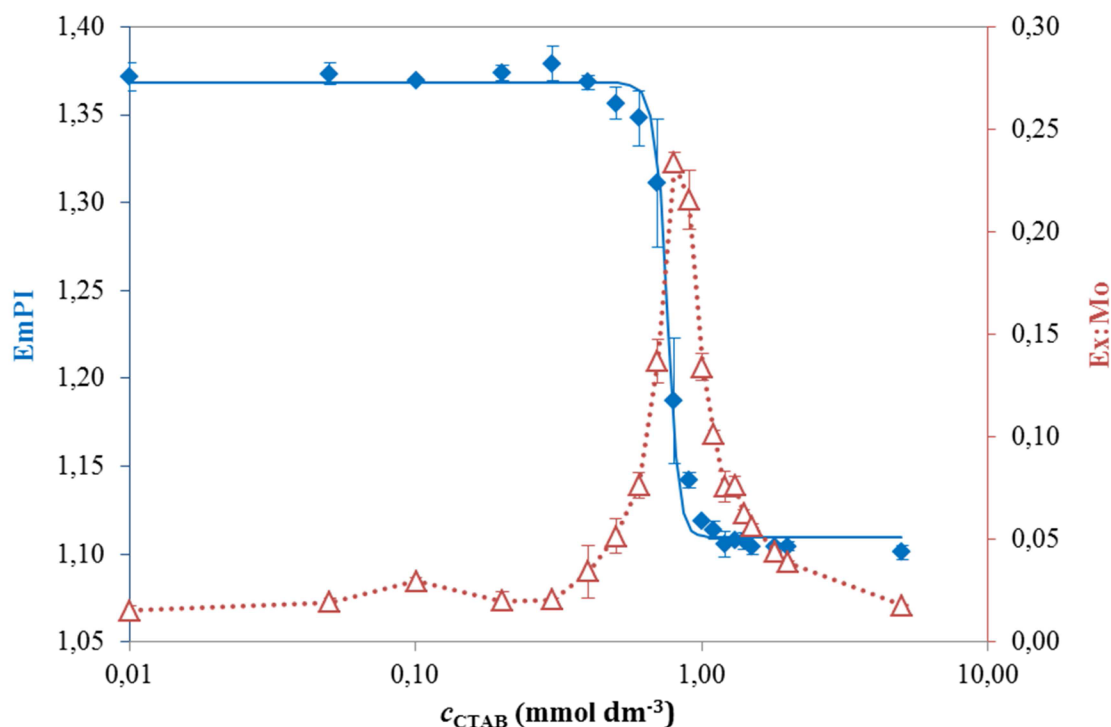
kde proměnnou y je EmPI, proměnnou x je koncentrace tenzidu, parametr A_1 a A_2 značí horní a spodní limitu sigmoidní křivky, x_0 je inflexní bod této závislosti a Δx charakterizuje strmost poklesu klesající části křivky. Ze získaných dat byly vyhodnoceny dvě hodnoty CMC – x_{CMC1} odpovídající inflexnímu bodu závislosti x_0 a x_{CMC2} odpovídající hodnotě $x_0 + 2 \Delta x$.

6.2 Výsledky a diskuze

Na následujících obr. 26 a obr. 27 jsou vyneseny získané hodnoty EmPI a poměru Ex:Mo pyrenu v závislosti na koncentraci daného kationtového tenzidu. Jak je z těchto obrázků patrné, získané hodnoty EmPI v závislosti na koncentraci CTAB a septonexu vykazují předpokládaný jednoduchý sigmoidní charakter.



Obr. 26: Závislost EmPI proložená Boltzmannovým modelem a závislost Ex:Mo na koncentraci CTAB ve vodném prostředí.



Obr. 27: Závislost $EmPI$ proložená Boltzmannovým modelem a závislost $Ex:Mo$ na koncentraci septonexu ve vodném prostředí.

V oblasti okolo kritické micelární koncentrace CTAB i septonexu dochází k výraznému nárůstu poměru $Ex:Mo$ vlivem zvyšující se pravděpodobnosti vzniku excimerů pyrenu, jejichž přítomnost se v emisním spektru projevuje nárůstem intenzity fluorescence kolem 470 nm. Tento jev je způsoben přítomností pouze malého množství vzniklých micel na počátku agregačního procesu, díky čemuž se výrazně zvyšuje pravděpodobnost vícenásobné inkorporace molekul pyrenu do jedné micely a tedy i pravděpodobnost vzniku excimeru. Se zvyšující se koncentrací tenzidu v systému pak dochází k vytvoření většího počtu kompaktních micel, do nichž se molekuly pyrenu mohou solubilizovat, vlivem čehož pravděpodobnost tvorby excimeru pyrenu opět klesá.

Na základě Aquiar a spol. byly ze získaných dat $EmPI$ vyhodnoceny dva body – x_{CMC1} a x_{CMC2} [15]. Kritériem vhodnosti vyhodnocení CMC dle daného bodu je hodnota poměru $x_0/\Delta x$. Pokud je tento poměr vyšší než 10, je za kritickou micelární koncentrací vhodnější považovat bod x_{CMC2} oproti x_{CMC1} . Vzhledem k tomu, že je poměr $x_0/\Delta x$ pro septonex roven 20,5 a pro CTAB 18,4, byl bod x_{CMC2} zvolen jako hodnota kritické micelární koncentrace pro další využití. Taktéž při srovnání hodnot kritické micelární koncentrace CTAB a septonexu stanovených a nalezených v literatuře, se jeví bod x_{CMC2} jako příhodnější. V následující tab. 1 jsou shrnuty parametry získané proložením dat $EmPI$ Boltzmannovým modelem pro oba tenzidy a taktéž srovnání s hodnotami kritické micelární koncentrace nalezené v literatuře.

Stanovená hodnota CMC pro septonex je o něco málo nižší než v případě CTAB, ačkoliv by kratší uhlovodíkový řetězec měl obecně hodnotu CMC zvyšovat. Snížení CMC oproti CTAB bude zřejmě zapříčiněno objemnější polární hlavou septonexu, která pravděpodobně stericky odstiňuje repulzi shodných nábojů amoniových skupin.

Tab. 1: Parametry vyhodnocené ze závislosti EmPI na koncentraci tenzidu proložením dat Boltzmannovým modelem.

Parametr	Popis	CTAB	Septonex
A_1	horní hranice S-křivky	$1,364 \pm 0,002$	$1,368 \pm 0,003$
A_2	dolní hranice S-křivky	$1,204 \pm 0,002$	$1,110 \pm 0,003$
$x_{\text{CMC}_1} = x_0$	inflexní bod (CMC_1)	$(0,845 \pm 0,005)$ mM	$(0,759 \pm 0,007)$ mM
Δx	strmost poklesu	$(0,046 \pm 0,005)$ mM	$(0,037 \pm 0,005)$ mM
$x_{\text{CMC}_2} = x_0 + 2\Delta x$	CMC₂	$(0,938 \pm 0,015)$ mM	$(0,833 \pm 0,011)$ mM
R^2	koeficient spolehlivosti	0,996 0	0,994 0
$\text{CMC}_{\text{lit.}}$ (mM)	CMC z literatury	0,91 [90]; 0,92 [76]; 0,97 [91]	0,81 [92]

7 AGREGAČNÍ ČÍSLO SEPTONEXU A CTAB

Dalším důležitým parametrem charakterizujícím agregační chování tenzidů je tzv. agregační číslo N_{ag} , které udává počet molekul tenzidů, z nichž je micela tvořena. Lze jej stanovit na základě stacionárního i časově rozlišeného měření zhášení fluorescence (viz kap. 2.3.2). Jako fluorescenční sonda byl v této práci pro stanovení agregačního čísla septonexu a CTAB využit pyren, jehož fluorescence byla zhášena cetylpyridinium chloridem (CPC).

7.1 Experimentální část

7.1.1 Příprava vzorků

V případě obou tenzidů byla agregační čísla micel zjišťována při koncentracích tenzidu 2, 5, 10 a 25 mM. Pro každou koncentraci tenzidu byla vytvořena řada 9 vzorků s konstantní koncentrací pyrenu a rovnoměrně se zvyšující se koncentrací zhášeče CPC (viz tab. 2). Vzorky byly namíchány standardním postupem.

Tab. 2: Koncentrace jednotlivých komponent v daných řadách vzorků sloužících k určení agregačního čísla micel tenzidů CTAB a septonexu.

$c_{SPTX/CTAB}$ (mmol dm ⁻³)	c_{pyren} (μmol dm ⁻³)	c_{CPC} (μmol dm ⁻³)
2	2	0–24
5	4	0–40
10	6	0–80
25	8	0–200

7.1.2 Měření

U všech vzorků byla měřena absorpční spektra (přístroj Cary 50) v rozsahu 300–530 nm s krokem 1 nm a rychlostí skenu 600 nm/min. Jako slepý vzorek byl u absorpčních měření použit roztok CTAB nebo septonexu o dané koncentraci bez přítomnosti pyrenu a CPC. Emisní spektra byla měřena na přístroji Fluorolog v rozsahu 360–530 nm při excitační vlnové délce 336 nm, integračním čase 0,1 s a při konstantním nastavení štěrbin pro danou koncentraci tenzidu mezi 1–2 nm. Emisní spektra byla korigována na vnitřní filtrační efekt dle rovnice (44).

Dále byla metodou TCSPC (přístroj FluoroCube) měřena vyhasínací křivka fluorescence pyrenu. Jako excitační zdroj byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 329 nm, emisní monochromátor byl nastaven na 383 nm, polarizátory na 54,7°, rozsah TAC byl nastaven na 2 μs a repetition rate na 1 MHz. Všechna měření probíhala při teplotě 25 ± 1 °C.

7.1.3 Vyhodnocení dat

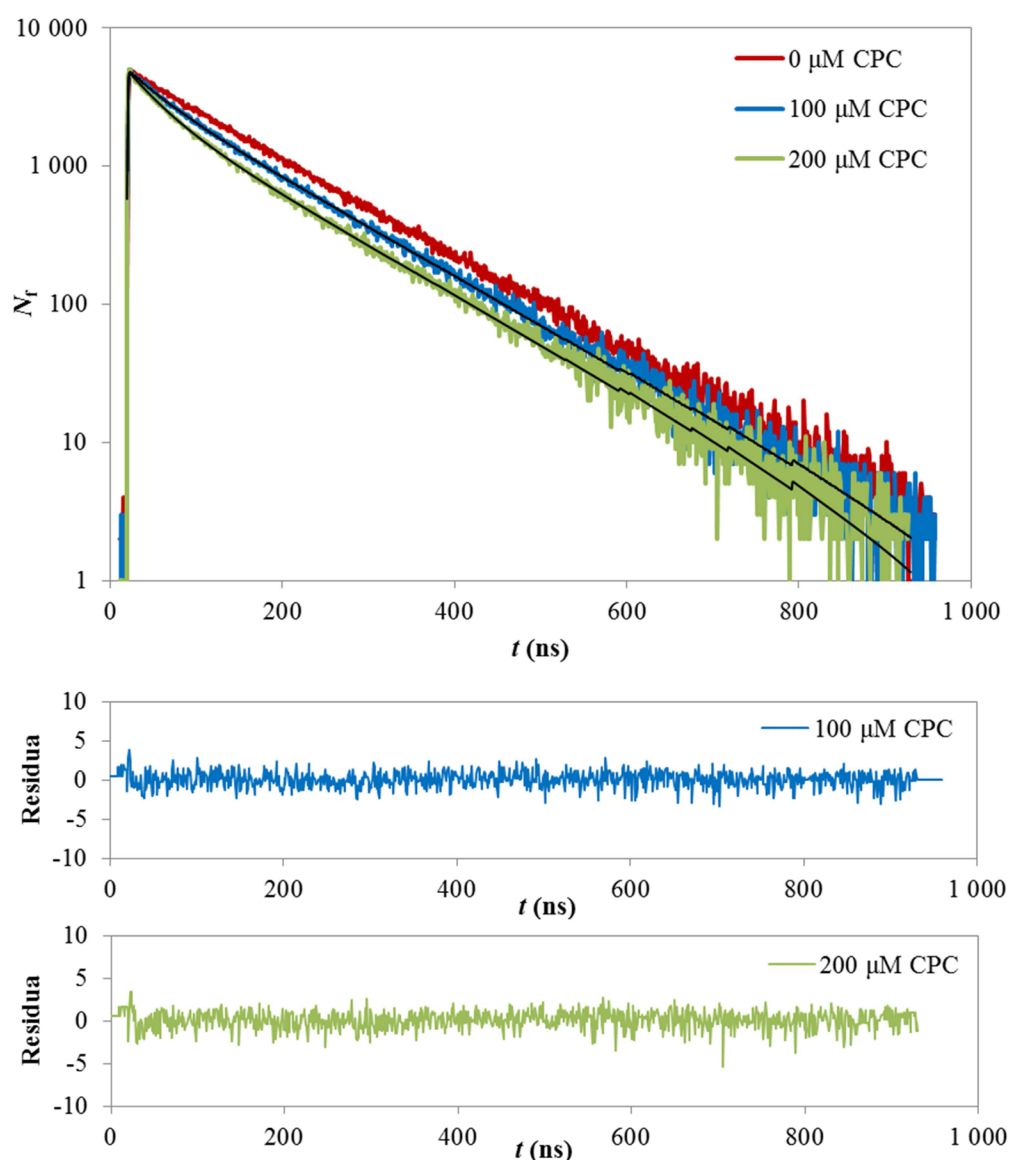
Agregační číslo micely N_{ag} bylo ze stacionárního fluorescenčního měření vyhodnoceno ze směrnice závislosti $\ln I_0/I$ na koncentraci zhášeče (viz rovnice 17). V případě časově rozlišeného měření zhášení fluorescence byly získané vyhasínací křivky prokládány

v programu DAS6 modelem micelárního zhášení založeného na teorii, kterou vytvořili Infelta a Tachia [44; 45], jehož rovnice je:

$$F(t) = A + B \exp \left[\left(\frac{-t}{T_1} \right) - C \left\{ 1 - \exp \left(\frac{-t}{T_2} \right) \right\} \right]. \quad (46)$$

T_1 zde označuje dobu života nezhasněného fluoroforu, T_2 znamená dobu života zhášeného fluoroforu, A je korekční faktor pozadí, B je intenzita fluorescence v čase 0 a C je poměr počtu molekul zhášeče a micel.

Agregační číslo micely N_{ag} pak bylo spočítáno ze směrnice závislosti C na koncentraci zhášeče dle rovnice (19).

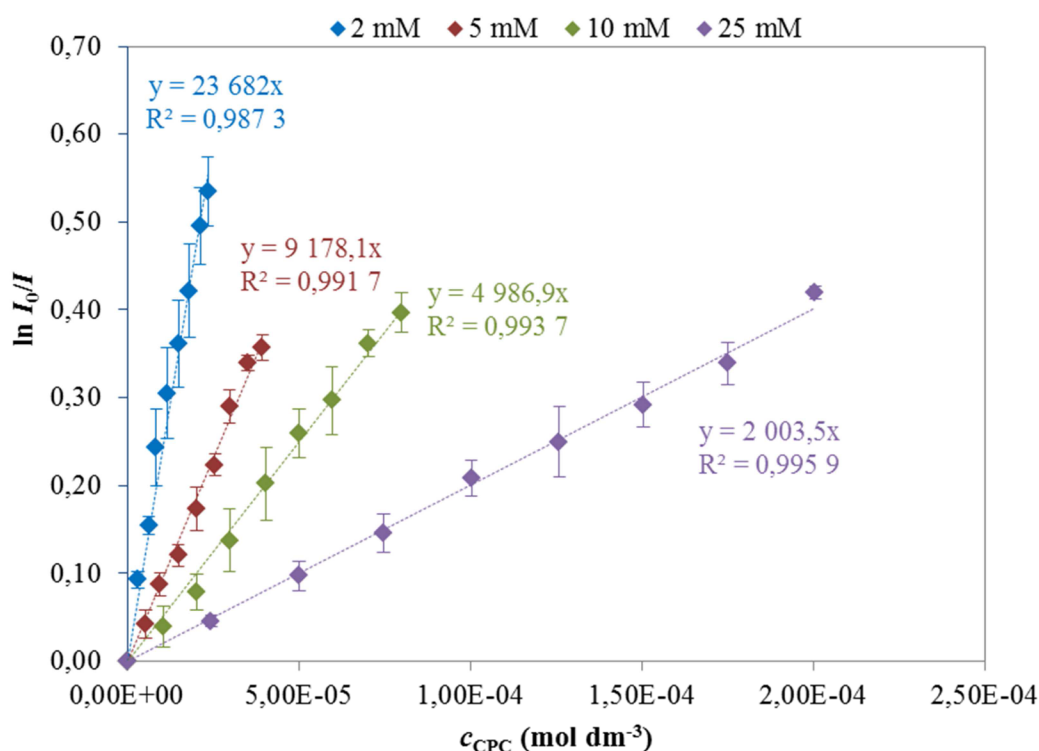


Obr. 28: Ukázka proložení dat vyhasínání fluorescence pyrenu v 25mM septonexu při různých koncentracích CPC jako zhášeče modelem micelárního zhášení. V případě systému bez CPC je vyhasínací křivka fluorescence pyrenu mono-exponenciální, proto ji nelze vyhodnotit modelem micelárního zhášení.

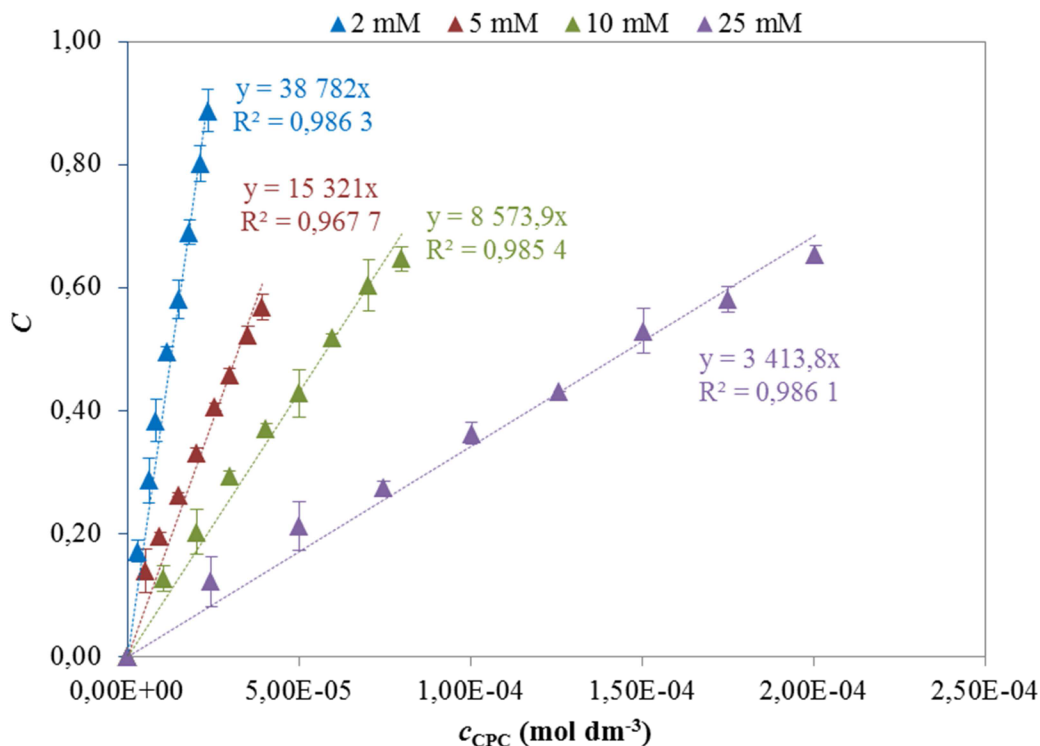
7.2 Výsledky a diskuze

Na obr. 29 a 30 jsou vyneseny závislosti $\ln I_0/I$ a C na koncentraci zhášeče CPC v systému pro vzorky se septonexem, z jejichž směrnice byla stanovena agregační čísla micel v daných případech. Jak je z těchto obrázků zřejmé, všechny vynesené závislosti mají lineární trend. Stejně tomu tak je i v případě roztoků CTAB.

V následující tab. 3 se nacházejí stanovená agregační čísla micel septonexu a CTAB. Dále jsou v ní uvedeny hodnoty agregačního čísla CTAB nalezené v literatuře, které byly určeny pomocí fluorescenčního měření. Co se týká septonexu, zatím u něj hodnota agregačního čísla nebyla publikována. Hodnoty agregačního čísla určené pomocí časově rozlišeného zhašení fluorescence jsou vyšší než v případě stacionárního měření, čemuž dobře odpovídají i hodnoty N_{ag} nalezené pro CTAB v literatuře naměřené daným způsobem. Dle Alargova a spol. je tomu tak v mnoha případech micelárních systémů, kdy rozdíly mezi zjištěnými N_{ag} rostou s narůstající mikroviskozitou agregátů a s rostoucí hodnotou N_{ag} [82]. Rozdíly mezi získanými hodnotami N_{ag} mohou souviset s rozdílnými teoreticko-matematickými základy (modely) stacionárního a časově-rozlišeného měření zhašení fluorescence.



Obr. 29: Závislost $\ln I_0/I$ na koncentraci zhášeče CPC pro různé koncentrace vodných roztoků septonexu nad CMC.



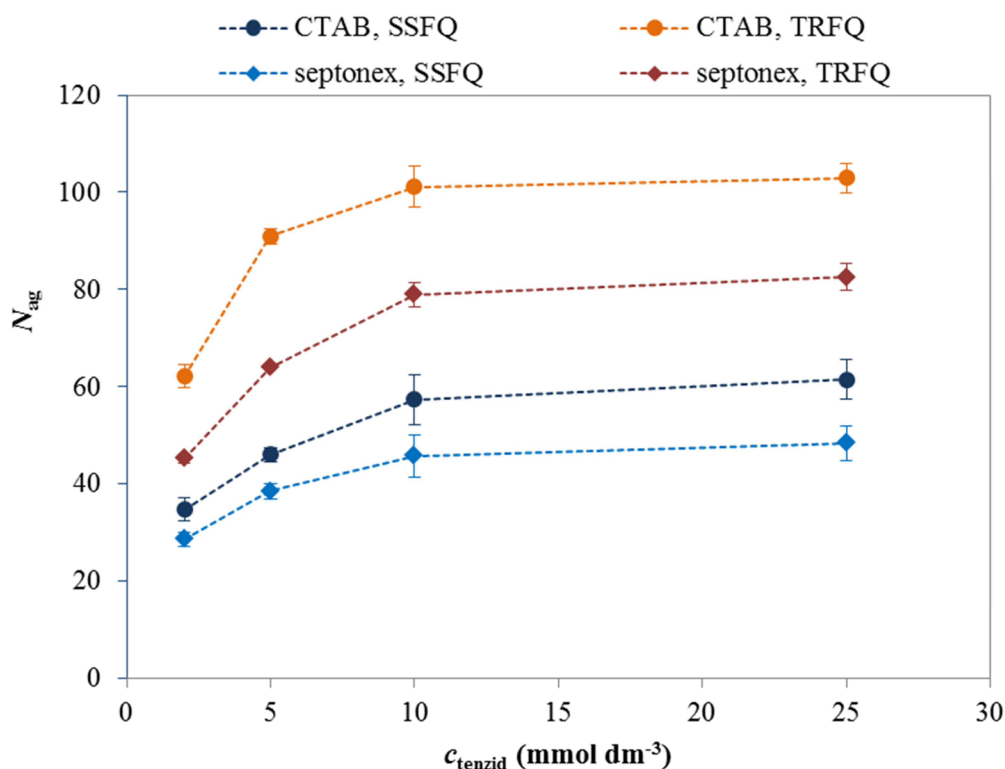
Obr. 30: Závislost parametru C na koncentraci zhlášeče CPC pro různé koncentrace vodných roztoků septonexu nad CMC.

Tab. 3: Micelární agregační číslo CTAB a septonexu stanovené pomocí stacionárního fluorescenčního zhlášení (SSFQ) a časově rozlišeného fluorescenčního zhlášení (TRFQ). Tučně jsou vyznačeny hodnoty agregačního čísla septonexu a CTAB určené v rámci této práce.

c_{tenzid} (mmol dm ⁻³)	CTAB		Septonex	
	SSFQ	TRFQ	SSFQ	TRFQ
2	34,7 ± 2,4 ; 61 [76]	62,7 ± 2,2 ; 75 [73]	28,9 ± 1,3	45,5 ± 1,0
3	40 [81]			
5	45,3 ± 1,8 ; 46 [81]	91,0 ± 1,5 ; 92 [78]	39,1 ± 0,2	64,0 ± 0,2
6	59 [77]	93 [73]		
7	59 [81]			
8		100 [73]		
10	56,2 ± 6,6 ; 54 [93]	101,1 ± 4,2 ; 102 [73]	47,1 ± 3,7	79,0 ± 2,5
12		103 [73]		
25	60,8 ± 3,7	102,9 ± 3,0 ; 108 [80]	49,2 ± 2,9	82,6 ± 2,7
30		120 [73]		
100		145 [79]		
neznámá (>CMC)	62 [94]			

Obecně v rámci odborné literatury, bývá často u iontových tenzidů publikována pouze jedna hodnota agregačního čísla, stanovená pro vyšší koncentraci tenzidu než CMC. Nicméně, jak naznačuje následující obr. 31, hodnota agregačního čísla je ovlivněna i koncentrací daného tenzidu. Hodnota N_{ag} septonexu i CTAB roste se zvyšující se koncentrací tenzidu v systému, což signalizuje micelární růst. Tato změna velikosti micel je výrazná zhruba do koncentrace septonexu a CTAB odpovídající desetinásobku jejich CMC. U vyšších koncentrací těchto tenzidů se pak hodnota agregačního čísla stává zhruba konstantní, což naznačuje přibližně jednotnou velikost micel v systému od určité koncentrace nad CMC. Z tohoto zjištění vyplývá, že k vytvoření stabilních a velikostně finálních micel je nezbytná přítomnost dostatečného množství molekul tenzidu v roztoku, což bývá často přehlíženo.

Ze srovnání hodnot agregačních čísel septonexu a CTAB je patrné, že micely septonexu jsou tvořeny menším počtem molekul tenzidů než je tomu v případě CTAB při stejné koncentraci. Tento fakt je způsoben rozdílnou strukturou polární hlavy septonexu a také jeho kratším alkylovým řetězcem. Díky objemnější polární hlavě septonexu se zde při tvorbě micel uplatňuje výrazněji sterický efekt než v případě CTAB, což vede ke snížení hodnoty agregačního čísla.



Obr. 31: Koncentrační závislost agregačního čísla micel pro CTAB a septonex stanoveného pomocí stacionárního měření (SSFQ) a časově rozlišeného měření (TRFQ) zhášení fluorescence.

8 PRODAN A FLUORESCEIN V ROZTOKU SEPTONEXU POD A NAD CMC

Tato kapitola disertační práce je věnována studiu změn základního fluorescenčního chování fluoresceinu a prodanu při zvyšující se koncentraci septonexu v systému od oblasti hluboko pod kritickou micelární koncentrací až po několikanásobně větší koncentraci septonexu, než je jeho hodnota CMC. U obou sond byla v rámci koncentrační řady septonexu měřena emisní spektra, u fluoresceinu pak byla navíc měřena stacionární anizotropie fluorescence. Motivací tohoto měření bylo zjištění, zda lze pomocí těchto dvou fluorescenčních sond a jednoduchého fluorescenčního měření sledovat agregační proces v roztoku septonexu.

Z naměřených dat byly vytvořeny závislosti změny polohy maxima emise příslušné fluorescenční sondy a anizotropie fluorescence fluoresceinu na koncentraci septonexu, z nichž je možné pozorovat průběh micelizace septonexu. Získané výsledky jsou porovnávány s hodnotou kritické micelární koncentrace septonexu stanovené pomocí pyrenu.

8.1 Experimentální část

8.1.1 Příprava vzorků

Pro obě sondy byly připraveny koncentrační řady obsahující 25 vzorků, v nichž se koncentrace septonexu pohybovala od 0,01 do 5 mM. Prodan měl ve všech vzorcích koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M, fluorescein pak $1 \cdot 10^{-6}$ M. Vzorky byly namíchány standardním postupem.

8.1.2 Měření

U všech vzorků byla naměřena emisní spektra na přístroji Fluorolog. U vzorků s prodanem byla měřena v rozsahu 420–650 nm při excitační vlnové délce 372 nm, integračním čase 0,1 s a při nastavení štěrbin na 2 nm.

U vzorků obsahujících fluorescein byla emise měřena v rozsahu 490–620 nm při excitační vlnové délce 470 nm, integračním čase 0,1 s a při nastavení štěrbin na 2 nm. Stacionární anizotropie fluoresceinu byla měřena v L-formátu, jako excitační vlnová délka bylo zvoleno 470 nm, emisní vlnová délka odpovídala maximu emisního spektra v daném případě a štěrbiny byly nastaveny na 5 nm. Pro každý vzorek bylo nastaveno 5 opakování měření, přičemž výsledkem byla zjištěná průměrná hodnota anizotropie. Integrační čas byl u všech vzorků nastaven na 1 s.

Všechna měření probíhala při teplotě 25 ± 1 °C.

8.1.3 Vyhodnocení dat

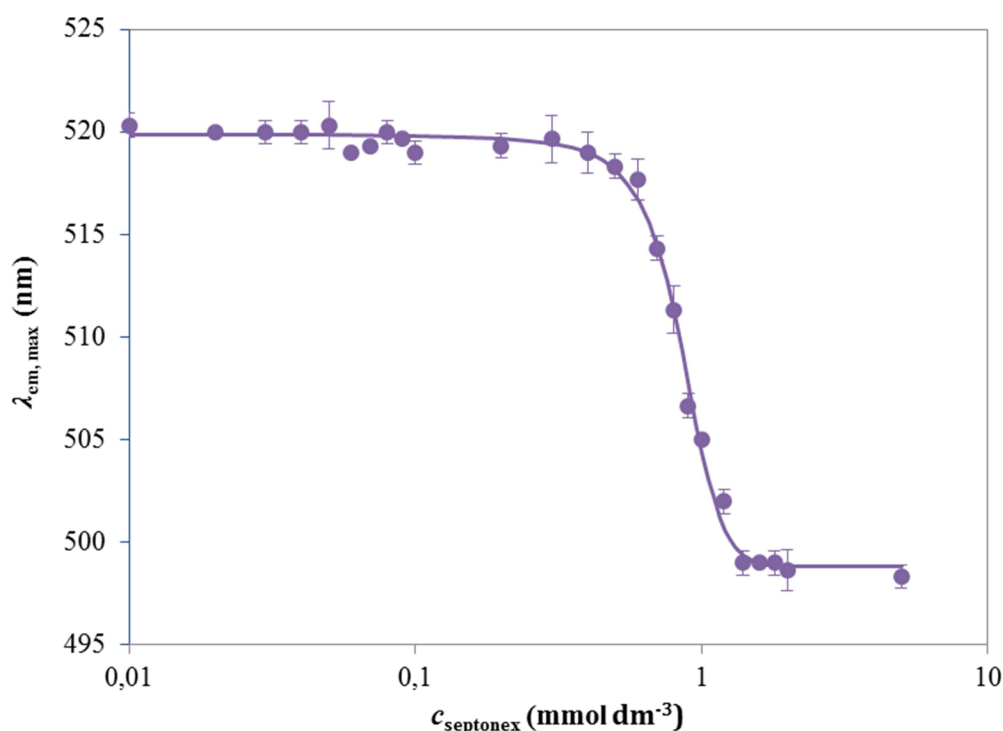
Ze získaných emisních spekter byla vyhodnocena závislost vlnové délky emisního maxima na koncentraci septonexu, v němž se fluorescenční sonda nacházela. U fluoresceinu pak byla také vyhodnocena závislost stacionární anizotropie fluorescence na koncentraci roztoku septonexu. Všechny závislosti byly proloženy Boltzmannovým modelem v programu OriginPro 8.1 dle rovnice (45).

8.2 Výsledky a diskuze

8.2.1 Prodan

Na následujícím obr. 32 je vyobrazena závislost polohy maxima emise prodanu na koncentraci septonexu ve vzorku, která vykazuje jednoduchý sigmoidní charakter. Při velmi nízkých koncentracích roztoku septonexu má emise prodanu maximum při 520 nm, které odpovídá emisnímu maximum i v případě vodného prostředí. V oblasti okolo kritické micelární koncentrace septonexu se pak maximum emise postupně posouvá ke kratším vlnovým délkám až do chvíle vytvoření se dostatečného množství micelárních útvarů, s nimiž molekuly prodanu interagují. V tomto okamžiku dochází k ustálení polohy maxima emise prodanu zhruba u 499 nm. Obecně, emisní spektrum prodanu v micelárním prostředí je výsledkem emise několika různých forem prodanu, které se v systému nacházejí (viz kapitola 11.2.2). Maximum emisního spektra je pak spojeno s fluorescencí molekul prodanu, které jsou solubilizovány na povrchu micelárních agregátů, což koresponduje i s oblastí vlnových délek, na kterých se maximum emise po překročení kritické micelární koncentrace ustálilo a odpovídá emisi prodanu z prostředí methanolu.

Z průběhu této závislosti lze tedy usuzovat průběh micelizace septonexu.



Obr. 32: Závislost vlnové délky maxima emisního spektra prodanu ($5 \cdot 10^{-6}$ M) na koncentraci roztoku septonexu.

Pokud na naměřená data aplikujeme metodu vyhodnocení kritické micelární koncentrace z EmPI pyrenu (viz kapitola 6), získáme po proložení dat Boltzmannovým modelem parametry, jejichž hodnoty jsou shrnuty v tab. 4. Inflexní bod závislosti, který je v případě vyhodnocování CMC označován jako bod x_{CMC1} , má hodnotu 0,855 mM, druhý bod x_{CMC2} , ze kterého se může stanovit hodnota kritické micelární koncentrace, má pak hodnotu 1,149 mM,

což jsou vyšší hodnoty koncentrace při srovnání se stanovením CMC pomocí pyrenu. Pokud ale aplikujeme pravidlo dle Aguiar a spol. [15], kdy v případě, že je poměr $x_0/\Delta x$ je menší než 10, je vhodné za hodnotu CMC považovat bod x_{CMC_1} , má pak vyhodnocená CMC pomocí prodanu hodnotu bodu $x_{\text{CMC}_1} = 0,855$ mM, což je blízko stanovené hodnotě pomocí pyrenu, která byla určena na 0,833 mM.

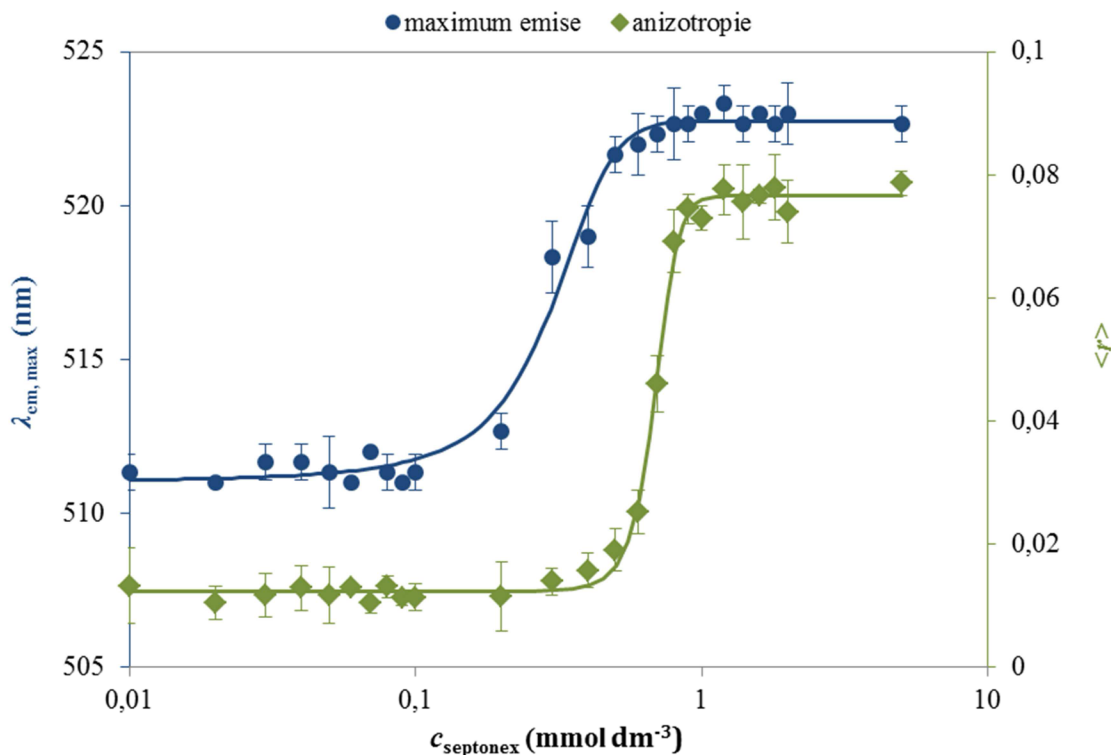
Tab. 4: Parametry vyhodnocené ze závislosti polohy maxima emise prodanu na koncentraci septonexu proložením dat Boltzmannovým modelem.

Parametr	Popis	CTAB
A_1	horní hranice S-křivky	$(519,9 \pm 0,2)$ nm
A_2	dolní hranice S-křivky	$(498,8 \pm 0,3)$ nm
x_0	inflexní bod (CMC₁)	$(0,855 \pm 0,010)$ mM
Δx	strmost poklesu	$(0,149 \pm 0,009)$ mM
$x_0+2\Delta x$	CMC ₂	$(1,15 \pm 0,02)$ mM
R^2	koeficient spolehlivosti	0,995 7

8.2.2 Fluorescein

U fluoresceinu byla sledována změna polohy maxima emise a také stacionární anizotropie fluorescence s rostoucí koncentrací septonexu v systému. Při nízkých koncentracích tenzidu hluboko pod CMC odpovídá maximum emise fluoresceinu jeho emisnímu maximu ve vodném prostředí. Stejně tak i zjištěné velmi nízké hodnoty anizotropie fluorescence naznačují volný rotační pohyb molekul této sondy. Od určité koncentrace septonexu pak dochází k posunu emisního maxima fluoresceinu k vyšším vlnovým délkám, jehož hodnota se ustálí na 523 nm. Posun emisního maxima fluoresceinu nastává při nižších koncentracích septonexu ve srovnání s nárůstem anizotropie, za který je zodpovědné omezení volného rotačního pohybu molekul fluoresceinu vlivem interakcí se vznikajícími micelárními útvary.

Obě naměřené závislosti (viz obr. 33) vykazují jednoduchý sigmoidní charakter, proto byly proloženy Boltzmannovým modelem. Získané parametry jsou shrnuty v tab. 5. Pokud opět aplikujeme pravidlo, kdy v případě, že je poměr $x_0/\Delta x$ je větší než 10, je vhodné za hodnotu CMC považovat bod x_{CMC_2} , má pak vyhodnocená CMC septonexu pomocí měření stacionární anizotropie fluorescence fluoresceinu hodnotu 0,822 mM, která je opět v dobré shodě se získanými výsledky pomocí pyrenu.



Obr. 33: Závislost vlnové délky maxima emisního spektra a stacionární anizotropie fluorescence fluoresceinu ($1 \cdot 10^{-6}$ M) na koncentraci roztoku septonexu.

Pro sledování agregačního procesu septonexu se zdá být příhodnější využití měření anizotropie fluorescence, u které dojde ke zvýšení hodnot vlivem interakcí molekul fluoresceinu se vzniklými micelárními útvary. Sledování procesu micelizace pomocí změny polohy maxima emise fluoresceinu bude velmi pravděpodobně zkresleno díky možnému výskytu různých (protonovaných a deprotonovaných) forem fluoresceinu v systému.

Tab. 5: Parametry vyhodnocené ze závislosti polohy maxima emise a stacionární anizotropie fluorescence fluoresceinu na koncentraci septonexu proložením dat Boltzmannovým modelem.

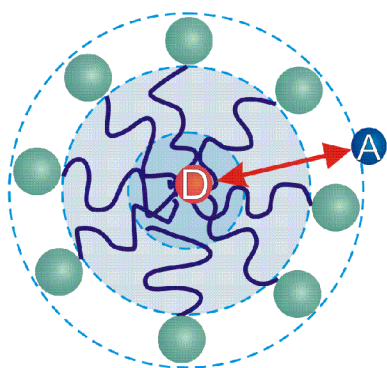
Parametr	Popis	Poloha maxima emise	Stacionární anizotropie
A_1	horní hranice S-křivky	$(510,7 \pm 0,4)$ nm	$0,012\ 3 \pm 0,000\ 5$
A_2	dolní hranice S-křivky	$(522,8 \pm 0,2)$ nm	$0,076\ 6 \pm 0,000\ 7$
$x_{\text{CMC}_1} = x_0$	inflexní bod (CMC_1)	$(0,299 \pm 0,014)$ mM	$(0,690 \pm 0,007)$ mM
Δx	strmost poklesu	$(0,086 \pm 0,012)$ mM	$(0,066 \pm 0,006)$ mM
$x_0 + 2\Delta x$	CMC_2	$(0,47 \pm 0,03)$ mM	$(0,822 \pm 0,013)$ mM
R^2	koeficient spolehlivosti	0,990 6	0,995 9

9 FRET V MICELÁRNÍM ROZTOKU SEPTONEXU A CTAB

Následující kapitola disertační práce je věnována rezonančnímu přenosu energie Försterovým mechanismem (FRET), jehož princip je založen na coulombických, dipól-dipól interakcích mezi molekulami donoru a akceptoru (teoretický základ viz kapitola 2.4). Jelikož je tento proces velice citlivý na vzdálenost mezi donorem a akceptorem, stal se efektivním prostředkem k měření vzdáleností v nanoměřítku nejen při studiu molekulových interakcí.

Struktura micelárních systémů umožňuje dosáhnout vysoké lokální koncentrace a vhodného prostorového uspořádání mezi molekulami donoru a akceptoru, což dělá tyto systémy zajímavými a vhodnými pro měření FRET.

V rámci této práce byl studován přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v micelárních roztocích septonexu a CTAB. Zatímco jsou molekuly perylenu (donor) solubilizovány v hydrofobních jádrech micel, molekuly fluoresceinu (akceptor) interagují s micelárním povrchem v oblasti Sternovy vrstvy [86].



Obr. 34: Lokalizace perylenu (D) a fluoresceinu (A) v kationtové micelle.

Na základě provedených stacionárních i časově rozlišených experimentů byl porovnáván přenos energie v micelárním prostředí septonexu oproti CTAB. Dále byl studován vliv koncentrace fluoresceinu na efektivitu FRET a zkoumáno, zda jsou získané výsledky ovlivněny časem, který uplyne po přidání akceptoru (fluoresceinu) do systému. Také byl vyhodnocen Försterův poloměr pro dvojici perylen-fluorescein v prostředí CTAB i septonexu a zkoumám vliv postupného přidavku hyaluronanu do micelárního roztoku na probíhající FRET, z něhož pak byly diskutovány možné probíhající interakce a tvorba agregátů mezi řetězci hyaluronanu a molekulami těchto tenzidů. Také byla řešena metodika zpracování získaných dat a srovnání experimentálních dat s Poissonovou statistikou.

9.1 Experimentální část

9.1.1 Příprava vzorků

Försterův poloměr páru perylen-fluorescein

Pro zjištění absorpčního molárního koeficientu fluoresceinu v 2mM vodném roztoku CTAB a septonexu byly standardním postupem vytvořeny koncentrační řady obsahující šest vzorků se zvyšující se koncentrací fluoresceinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ M až $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Dále byl stanovován kvantový výtěžek perylenu v 2mM roztocích septonexu a CTAB. Koncentrace

perylenu byla v tomto případě zvolena na základě vhodné hodnoty maximální absorpce vzorku na $5 \cdot 10^{-6}$ M. Vzorky byly nachystány standardním postupem. Index lomu prostředí byl měřen u čistých 2mM roztoků obou tenzidů.

Srovnání FRET v micelárním prostředí septonexu a CTAB

Pro porovnání FRET v micelárním prostředí septonexu a CTAB ($c_{\text{tenzid}} = 2$ mM), byly připraveny vzorky, v nichž byla konstantní koncentrace perylenu ($1 \cdot 10^{-6}$ M) a rovnoměrně se zvyšující koncentrace fluoresceinu mezi $5 \cdot 10^{-6}$ M a $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Nejprve bylo do vialek napipetováno potřebné množství zásobního roztoku perylenu v acetonu, následně byl aceton za sníženého tlaku odpařen a do vialek bylo přidáno potřebné množství zásobního roztoku tenzidu a vody. Kvůli solubilizaci perylenu do micel byl v této fázi vzorek promíchán na vibračním míchadle a ponechán 24 hodin na třepačce. Následně bylo do vzorků připipetováno potřebné množství zásobního roztoku fluoresceinu ve vodě a vzorek byl na třepačce ponechán dalších 24 hodin. Poté byly u vzorků změřeny absorpční spektra, emisní spektra a vyhasínací křivky fluorescence.

Vliv času po smíchání vzorku na výsledky FRET

Pro studium ovlivnění výsledků s časem byla připravena sada vzorků se septonexem (2 mM), v níž koncentrace perylenu činila $1 \cdot 10^{-6}$ M a koncentrace fluoresceinu se rovnoměrně zvyšovala mezi $5 \cdot 10^{-6}$ M a $3 \cdot 10^{-5}$ M.

Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. Časově rozlišené měření fluorescence a měření absorpčních a emisních spekter probíhalo ihned po přidání fluoresceinu do vzorku a následně po 2, 6, 24, 48 a 120 hodinách.

Vliv postupného přidavku hyaluronanu

Pro oba tenzidy byla připravena výchozí řada vzorků o koncentraci tenzidu 2 mM s konstantní koncentrací perylenu ($1 \cdot 10^{-6}$ M) a zvyšující se koncentrací fluoresceinu ($5 \cdot 10^{-6}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ M) stejným způsobem jako v předchozích případech. U těchto vzorků byly naměřeny vyhasínací křivky fluorescence, poté přidáno dané množství roztoku hyaluronanu, vzorky byly protřepány na vibračním míchadle a ponechány na třepačce do druhého dne, kdy opět proběhlo časově rozlišené měření fluorescence, následováno přidavkem hyaluronanu atd. Maximální koncentrace hyaluronanu ve vzorcích měla hodnotu 0,11 g/l.

9.1.2 Měření

Absorpční spektra (Cary 50) byla měřena v rozsahu 300–620 nm s krokem 1 nm a rychlostí skenu 600 nm/min. Emisní spektra (Fluorolog) byla měřena v rozsahu 420–620 nm při excitační vlnové délce 389 nm, integračním čase 0,1 s a při nastavení štěrbin na 2 nm. Emisní spektra pak byla korigována na vnitřní filtrační efekt dle rovnice (44).

Dále byla metodou TCSPC (FluoroCube) měřena vyhasínací křivka fluorescence vzorku. Jako excitační zdroj byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 389 nm, emisní

monochromátor byl nastaven na 441 nm, rozsah TAC byl nastaven na 100 ns a repetition rate na 1 MHz.

Pro stanovení absolutního kvantového výtěžku perylenu v 2mM CTAB a 2mM septonexu byla využita integrační sféra Quanta- ϕ na přístroji Fluorolog.

Všechna měření probíhala při teplotě 25 ± 1 °C.

9.1.3 Vyhodnocení dat

Försterův poloměr páru perylen-fluorescein

Z naměřených absorpčních spekter fluoresceinu v roztoku daného tenzidu byla vynesena závislost maximální absorbance (při 502 nm) na koncentraci fluoresceinu ve vzorku. Ze směrnice této závislosti byl pak určen absorpční molární koeficient fluoresceinu pro dané prostředí.

Integrál spektrálního překryvu emisního spektra perylenu a absorpčního spektra fluoresceinu byl vypočítán na základě vztahu:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda}, \quad (47)$$

kde $I_D(\lambda)$ je intenzita fluorescence donoru, $\varepsilon_A(\lambda)$ je absorpční molární koeficient akceptoru a λ označuje vlnovou délku.

Försterův poloměr páru perylen-fluorescein byl vypočítán dle vztahu:

$$R_0 = 0,2108 [n^{-4} \phi_D \kappa^2 J]^{1/6}, \quad (48)$$

kde n odpovídá indexu lomu prostředí, κ^2 je orientační faktor a ϕ_D výtěžek fluorescence donoru.

Stacionární fluorescence

Z naměřených a zkorigovaných emisních spekter byl vyhodnocen poměr intenzity fluorescence perylenu bez a za přítomnosti zhášeče (I/I_0) a přirozený logaritmus tohoto poměru ($\ln I/I_0$). Tyto poměry byly vyneseny do závislostí na koncentraci zhášeče v systému.

Časově rozlišená fluorescence

Naměřené vyhasínací křivky fluorescence byly vyhodnoceny v programu DAS6 proložením 1-5 exponenciální funkcí dle rovnice (41).

Ze získaných dob života τ_i a příslušných amplitud B_i byla vyhodnocena efektivita přenosu energie E a vázaná frakce N_{DA} (index D – donor, A – akceptor).

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (49)$$

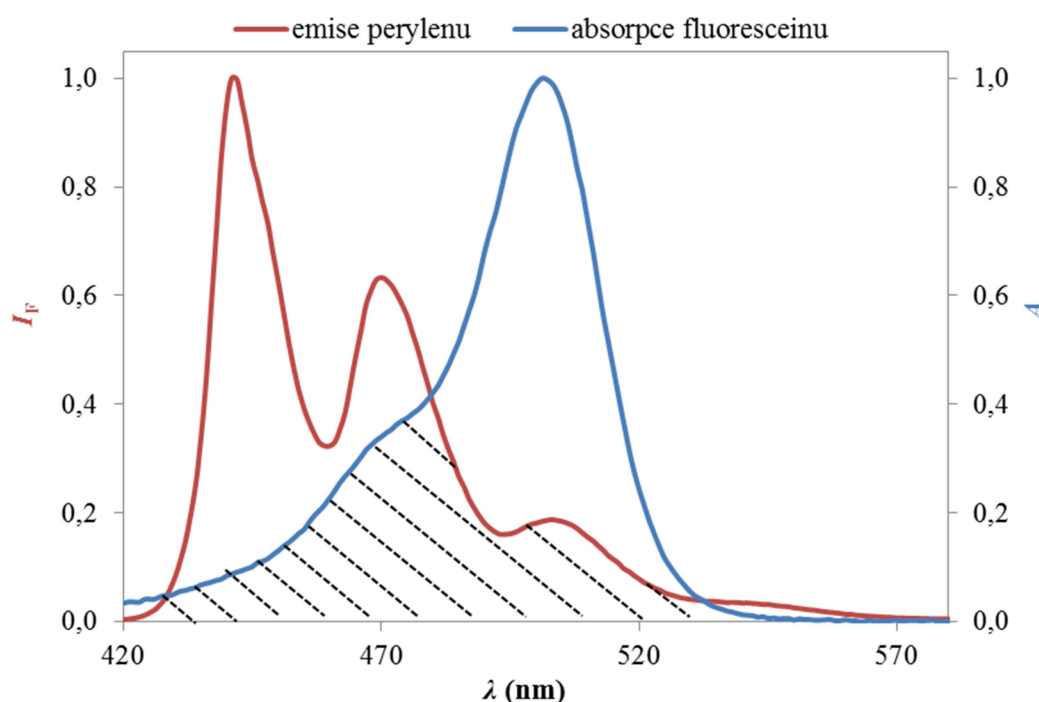
$$N_{DA} = \frac{B_{DA}}{B_{DA} + B_D} \quad (50)$$

9.2 Výsledky a diskuze

9.2.1 Försterův poloměr páru perylen-fluorescein

Jednou z hlavních podmínek, aby docházelo k Försterovu přenosu energie mezi donorem a akceptorem, je překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, který je pro pár perylen-fluorescein v micelárním roztoku septonexu vyobrazen na obr. 35. Absorpční spektra fluoresceinu o různých koncentracích v micelárním roztoku septonexu a z nich vynesená závislost maximální absorbance na koncentraci fluoresceinu se nachází na obr. 36. V případě vzorků s CTAB byly získány obdobné výsledky.

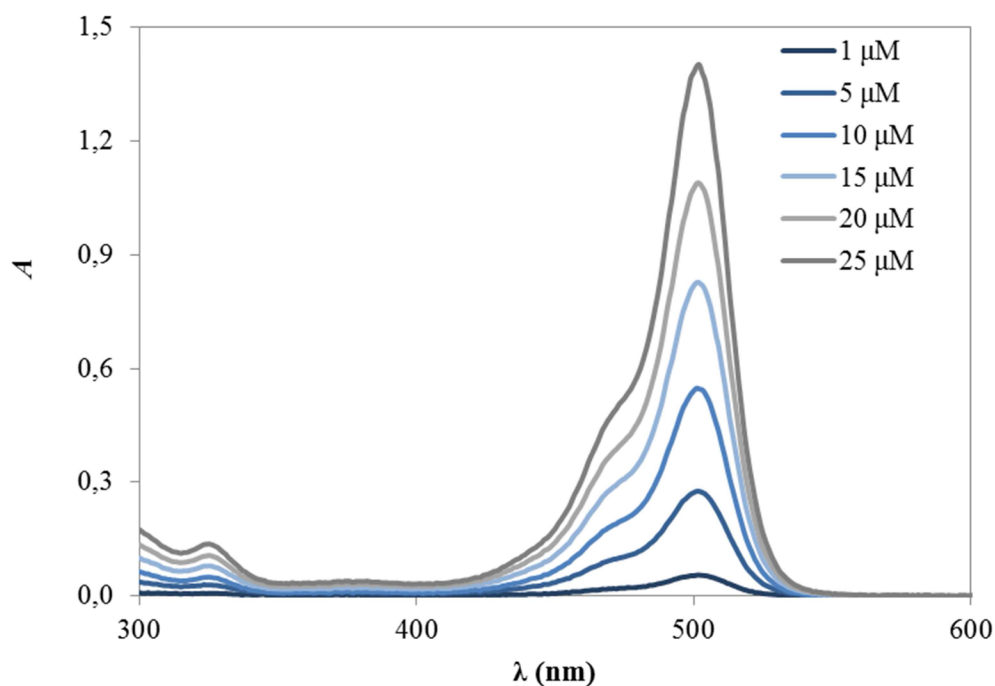
Försterův poloměr R_0 páru perylen-fluorescein byl v micelárním prostředí septonexu stanoven na 4,92 nm a v případě roztoku CTAB na 4,87 nm. Hodnoty všech veličin potřebných k výpočtu jsou sepsány v tab. 6.



Obr. 35: Spektrální překryv emisního spektra perylenu (donor) a absorpčního spektra fluoresceinu (akceptor) v 2mM roztoku septonexu.

Tab. 6: Hodnoty veličin použitých k výpočtům a určený Försterův poloměr páru perylen-fluorescein v 2 mM micelárním prostředí septonexu a CTAB.

Veličina (jednotka)	Popis	CTAB	Septonex
ε_A (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Absorpční molární koeficient fluoresceinu	35 044	55 289
J (dm ³ cm ³ mol ⁻¹)	Integrál spektrálního překryvu	$8,30 \cdot 10^{14}$	$8,59 \cdot 10^{14}$
ϕ_D	Kvantový výtěžek perylenu	0,861	0,921
n	Index lomu prostředí	1,3313	1,3316
R_0 (nm)	Försterův poloměr	4,87	4,92



Obr. 36: Absorpční spektra fluoresceinu o různé koncentraci (1–25 μM) v 2mM septonexu a z nich vyhodnocená závislost maximální absorbance (při 502 nm) na koncentraci fluoresceinu ve vzorku.

9.2.2 Metodika vyhodnocování efektivity FRET

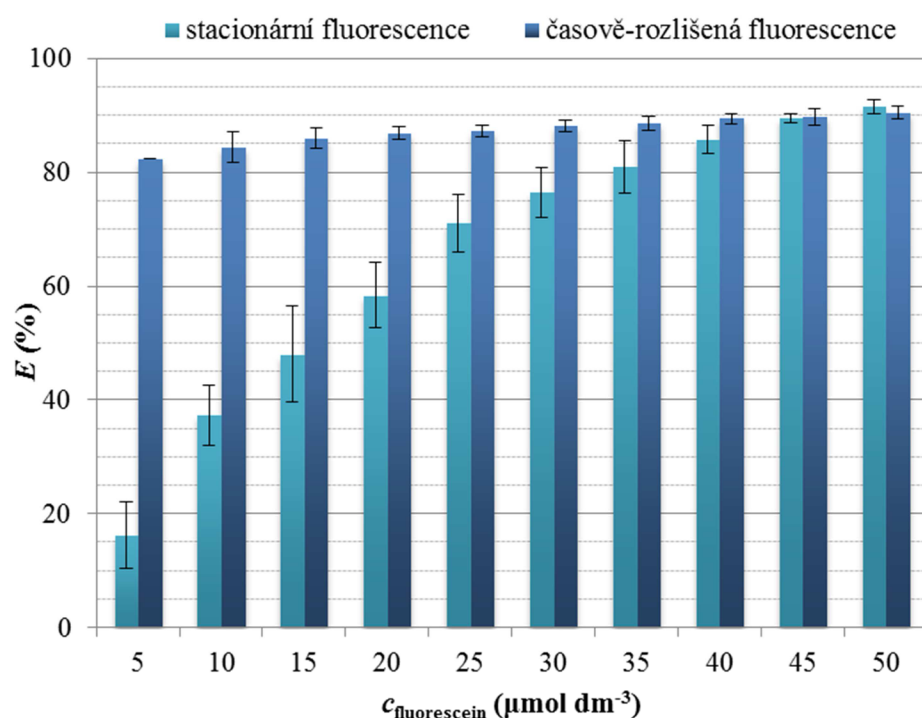
Z důvodu nejednotnosti vyhodnocování efektivity FRET v odborné literatuře, bylo nutné kvůli srovnávání výsledků v této práci stanovit jednotnou metodiku vyhodnocení získaných dat.

Model, který je využit v rámci této práce pro studium FRET v micelárním systému septonexu a CTAB je založen na několika předpokladech: 1) Všechny molekuly donoru (perylenu) a akceptoru (fluoresceinu) jsou asociovány s micelami. 2) Distribuce molekul donoru a akceptoru podléhá Poissonově statistice. 3) Zhášení fluorescence donoru může být popsáno výhradně intramicelárním přenosem energie Försterova typu, který vyžaduje překryv emisního spektra donoru a akceptoru.

Výrazný rozdíl ve vyhodnocení dat pramení z rozdílnosti stacionárního a časově rozlišeného měření fluorescence. Ve většině odborné literatury jsou výsledky získávány pouze jedním typem měření. V rámci stacionárních technik bývá efektivita FRET vyhodnocena z poměru intenzity fluorescence donoru za nepřítomnosti akceptoru (I_D) a za přítomnosti akceptoru (I_{DA}), kdežto u časově rozlišeného měření fluorescence se namísto intenzity fluorescence porovnávají doby života donoru τ_D a τ_{DA} (viz rovnice 22).

Následující obr. 37 ukazuje rozdíly ve vyhodnocení efektivity FRET ze stacionárního a časově rozlišeného měření pro pár perylen-fluorescein v 2mM roztoku CTAB. Obecně, u časově rozlišeného měření fluorescence lze rozlišit zhášenou a nezhasenou formu perylenu na základě stanovených dob života v systému, k nimž lze přiřadit i amplitudu, která vypovídá o množství daného druhu emitující látky. Efektivita FRET je v tomto případě vyhodnocena ze

získaných dob života zhášeného a nezhášeného perylenu, jejichž poměr je úměrný vzdálenosti, na kterou jsou molekuly donoru a akceptoru vzdáleny, ale není přitom ovlivněna množstvím vznikajících donor-akceptor párů, na rozdíl od stacionárního měření. Z tohoto důvodu byla v rámci této práce efektivita FRET hodnocena a srovnávána pouze z časově rozlišeného měření. Normalizovaná amplituda (dle rovnice 43) příslušející zhášenému donoru, označovaná jako vázaná frakce N_{DA} , pak vypovídá o poměru počtu zhášeného a nezhášeného perylenu po excitaci vzorku.



Obr. 37: Efektivita FRET mezi párem perylen-fluorescein vyhodnocená ze stacionárního (světle modrá) a časově rozlišeného měření fluorescence (tmavě modrá) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2mM roztoku CTAB.

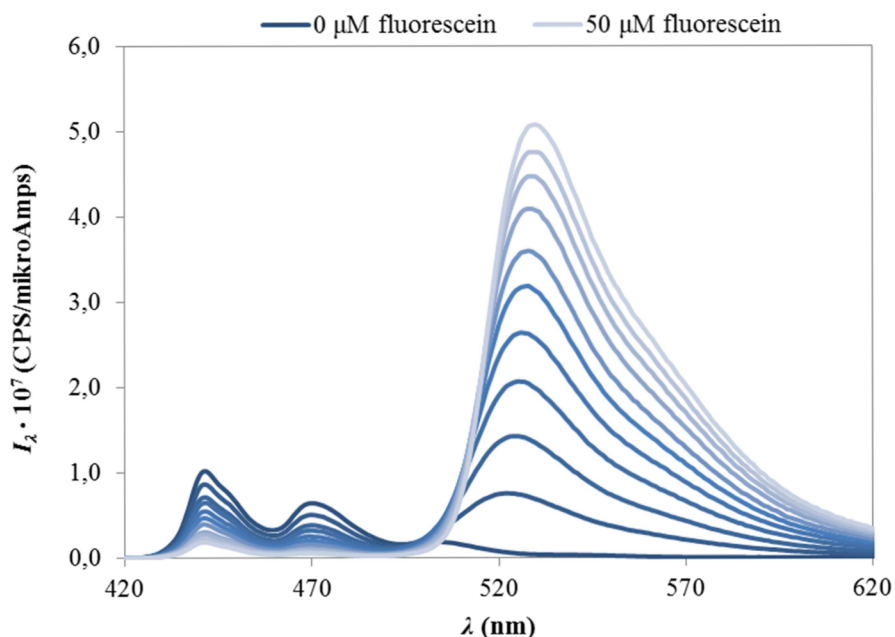
9.2.3 Srovnání FRET v micelárním prostředí septonexu a CTAB

Stacionární měření

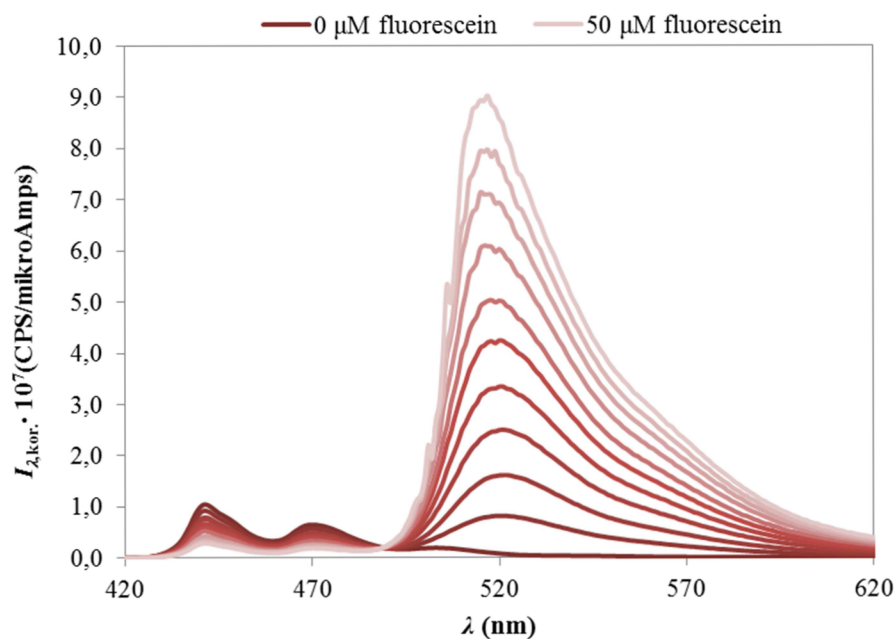
Jako prvotní inspirace pro měření FRET mezi perylenem a fluorescein v micelárním prostředí septonexu a jeho srovnání s CTAB byl použit článek od F. G. Sáncheze, který se pomocí stacionárního měření fluorescence věnoval studiu intramicelárního přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem v micelárním prostředí CTAB [86].

Pro zhodnocení vlivu koncentrace akceptoru (fluoresceinu) v systému na průběh FRET byla z korigovaných fluorescenčních spekter vzorků vyhodnocena intenzita fluorescence při 441 nm, která odpovídá maximu prvního píku emisního spektra perylenu a není ovlivněná fluorescencí fluoresceinu. Na následujících obr. 38 a 39 jsou vyobrazena nekorigovaná a korigovaná fluorescenční spektra páru perylen-fluorescein v prostředí 2mM septonexu. Jak je z nich patrné, vzhledem k probíhajícímu přenosu energie, s rostoucí koncentrací

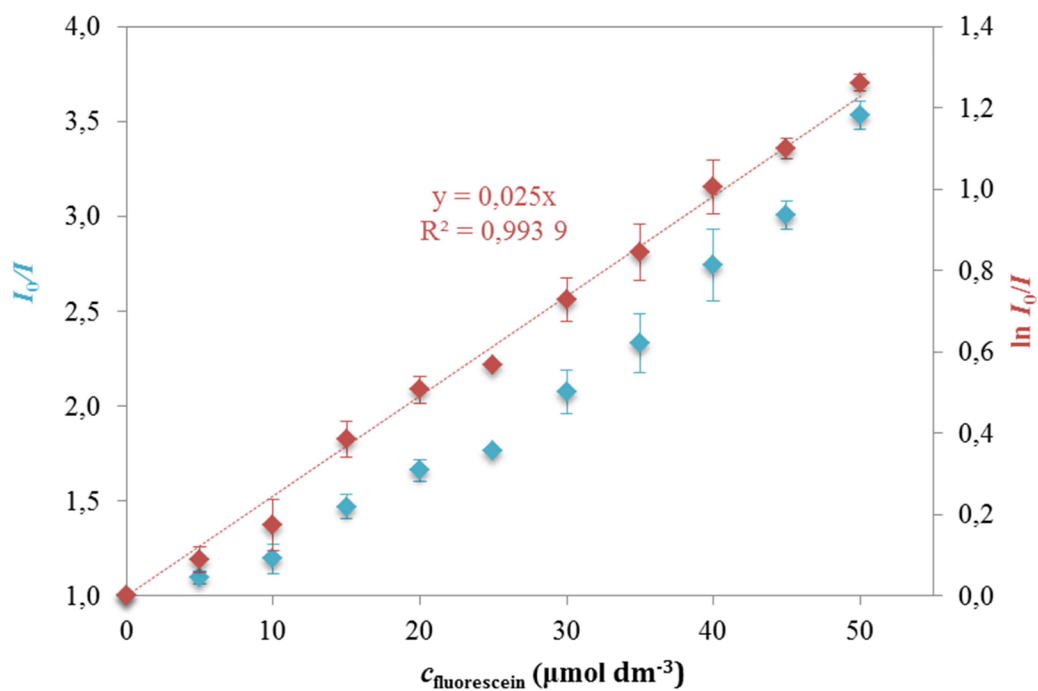
fluoresceinu v systému dochází k poklesu intenzity fluorescence perylenu a zároveň k nárůstu intenzity fluorescence fluoresceinu. Z obr. 38 je také patrný posun emise fluoresceinu k delším vlnovým délkám při jeho zvyšující se koncentraci. Tento posun je pravděpodobně způsoben zářivým přechodem vlivem self-absorpce molekul fluoresceinu a byl odstraněn korekcí dle absorbance vzorku (rovnice 41).



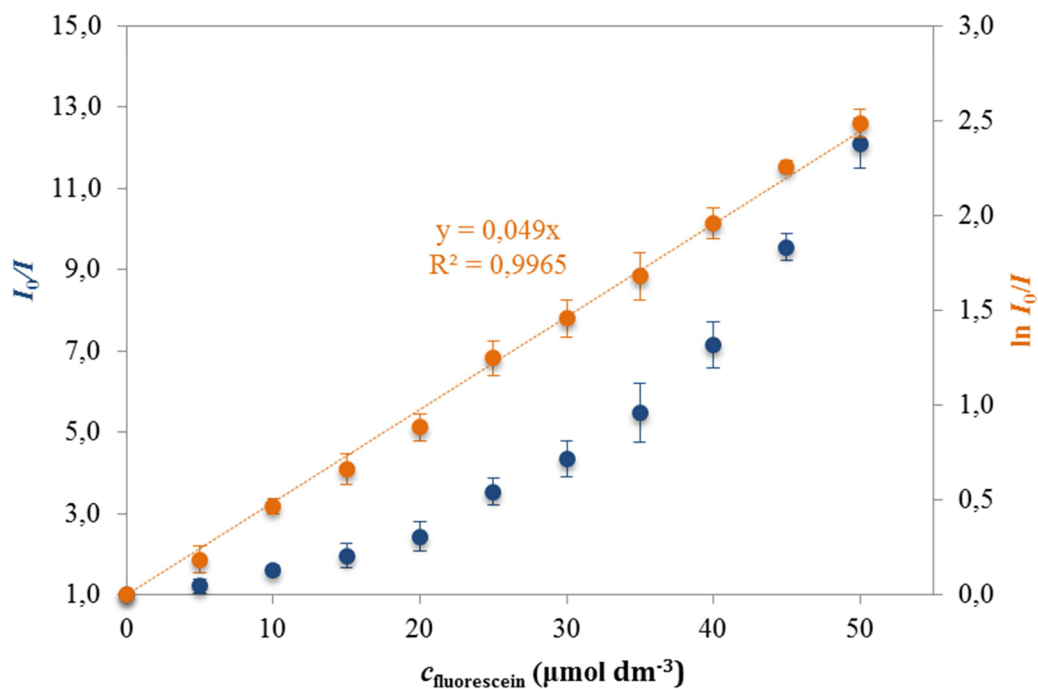
Obr. 38: Nekorigovaná fluorescenční spektra páru perylen-fluorescein v 2 mM roztoku septonexu, $c_{per} = 1 \mu M$, $c_{flu} = 0-50 \mu M$ s krokem $5 \mu M$.



Obr. 39: Korigovaná fluorescenční spektra páru perylen-fluorescein v 2 mM roztoku septonexu, $c_{per} = 1 \mu M$, $c_{flu} = 0-50 \mu M$ s krokem $5 \mu M$.



Obr. 40: Stern-Volmerova (modrá) a Perrinova (červená) závislost pro pár perylen-fluorescein v 2mM roztoku septonexu



Obr. 41: Stern-Volmerova (modrá) a Perrinova (oranžová) závislost pro pár perylen-fluorescein v 2mM roztoku CTAB.

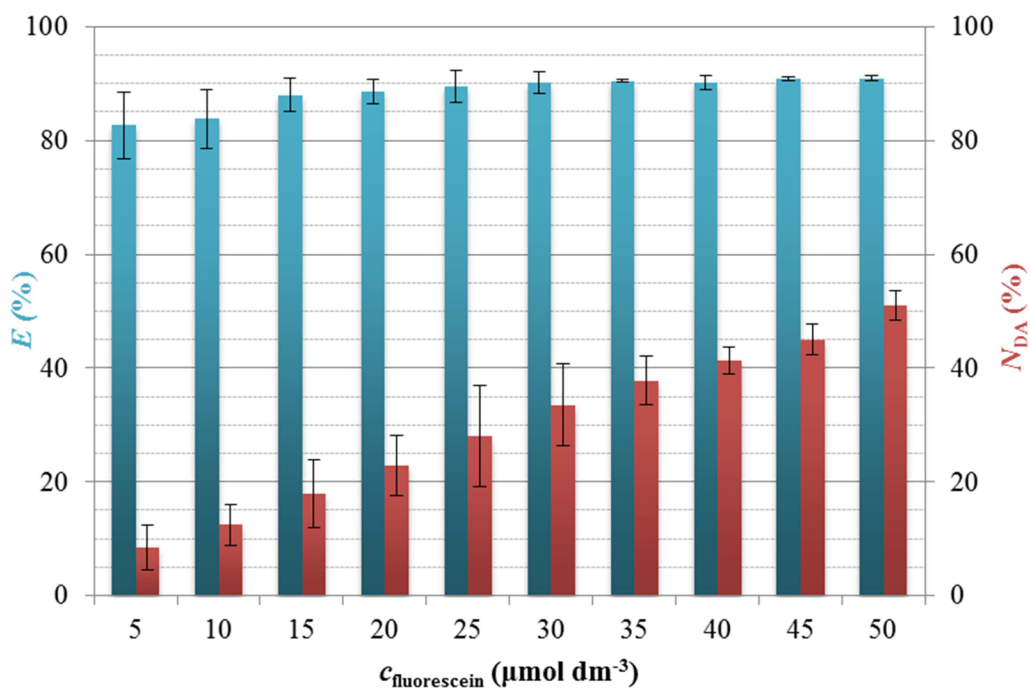
Obr. 40 a 41 zobrazují Stern-Volmerovu a Perrinovu závislost zhášení na koncentraci fluoresceinu ve vzorku pro koncentrační řadu se septonexem a CTAB. Je z nich zřejmá linearita Perrinovy závislosti pro oba tenzidy na rozdíl od Stern-Volmerovy závislosti, u které při vysokých koncentracích fluoresceinu dochází k zakřivení směrem vzhůru. Zjištěný průběh těchto závislostí je indikací tzv. *caged* systému, v němž jsou molekuly donoru a akceptoru seskupeny pospolu, nikoliv pevně, ale nacházejí se ve stejném „uzavřeném“ prostředí. Což v případě intramicelárního přenosu energie odpovídá situaci, kdy je molekula donoru, tj. perylenu, solubilizována v hydrofóbním jádře micely a molekula akceptoru, tj. fluoresceinu, interaguje s jejím micelárním povrchem.

V čem se ale výsledky mezi septonexem a CTAB liší, je hodnota poměru intenzit fluorescence I_0/I , která je u vzorku s nejvyšší koncentrací fluoresceinu zhruba třiapůlkrát vyšší v případě CTAB než v septonexu. Obecně platí, že velikost přenosu energie v micelárním prostředí souvisí s několika faktory. Prvním z nich je rostoucí koncentrace fluoroforů, druhým je vzdálenost mezi molekulami donoru a akceptoru, třetím je zvětšující se překryv emise donoru a absorpce akceptoru a čtvrtým faktorem může být změna na preferovanější orientaci molekul donoru vzhledem k molekulám akceptoru. Jelikož byla použita stejná koncentrace fluorescenčních sond v obou případech a rozdíl mezi překryvem emisního spektra perylenu a absorpčního spektra fluoresceinu mezi systémem s CTAB a se septonexem není nijak výrazný, zbývají dvě možné příčiny. Co se týká vzdálenosti mezi molekulami perylenu, solubilizovanými v jádře micel a molekulami fluoresceinu, interagujícími s micelárním povrchem, znamenalo by to, že v rámci septonexu jsou molekuly perylenu a fluoresceinu ve větší vzdálenosti než u CTAB, což bylo vyvráceno časově rozlišeným měřením. Z těchto důvodů se zatím jako nejpravděpodobnější příčina vyššího poměru I_0/I u CTAB jeví vhodnější orientace přechodových momentů sond v CTAB oproti septonexu.

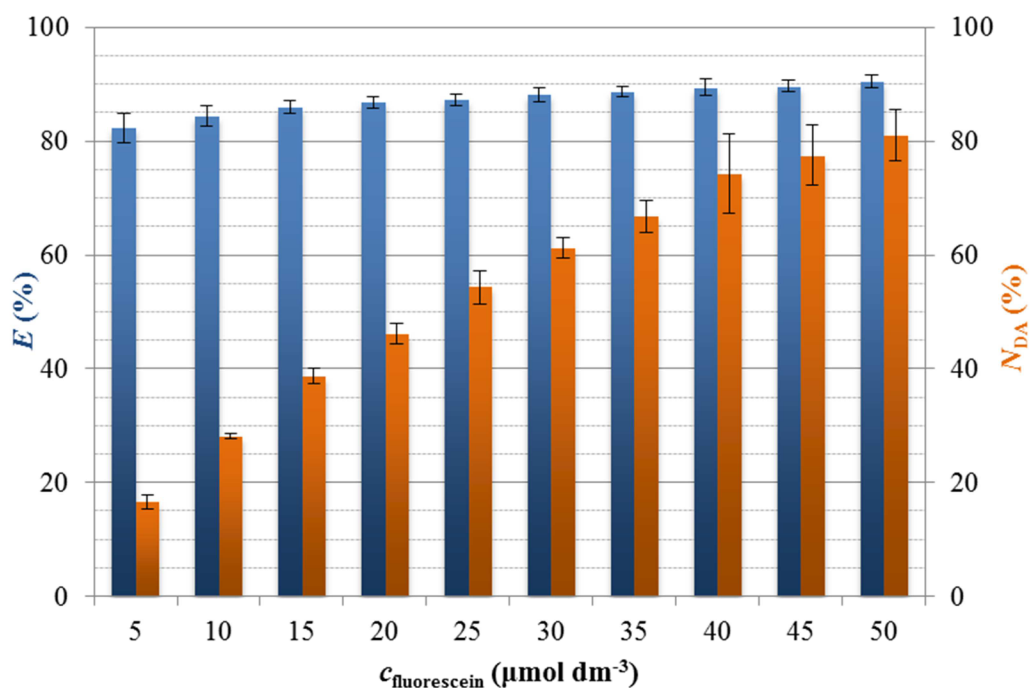
Časově rozlišené měření

Zjištěné rozdíly pro systémy se septonexem a CTAB byly potvrzeny i v rámci časově rozlišených fluorescenčních měření. Z vyhasínací křivky fluorescence vzorku byly vyhodnoceny přítomné doby života a jejich amplitudy odpovídající fluorescenci molekul perylenu. U vzorků bez přítomnosti fluoresceinu byla objevena pouze jedna doba života perylenu, jejíž hodnota byla v roztoku CTAB stanovena na $\tau_{D,CTAB} = (5,74 \pm 0,02)$ ns a v roztoku septonexu na $\tau_{D,SPTX} = (5,77 \pm 0,02)$ ns. V případech, kdy vzorky obsahovaly fluorescein, byly při 441 nm nalezeny dvě doby života jak u systémů se septonexem, tak s CTAB. Kratší doba τ_{DA} , jejíž hodnota se pohybovala mezi 0,5 a 1,3 ns, náleží molekulám perylenu, jejichž fluorescence je zhášena vlivem přítomnosti fluoresceinu, delší doba pak odpovídá perylenu v daném systému bez přítomnosti fluoresceinu, jedná se tedy o nezhášené molekuly perylenu.

Ze získaných dob života a odpovídajících amplitud byla vyhodnocena efektivita přenosu energie E a vázaná frakce N_{DA} v systému. Získané výsledky v závislosti na koncentraci fluoresceinu ve vzorcích pro systémy obou použitých tenzidů jsou vyobrazeny na následujících obr. 42 a 43.



Obr. 42: Efektivita FRET (modrá) a relativní zastoupení DA párů (červená) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2 mM roztoku septonexu.



Obr. 43: Efektivita FRET (modrá) a relativní zastoupení DA párů (oranžová) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2 mM roztoku CTAB.

Jak je z nich patrné, efektivita FRET nabývá pro systém se septonexem i CTAB stejných hodnot. Jelikož efektivita přenosu energie souvisí se vzdáleností mezi molekulou donoru a akceptoru, dá se předpokládat, že u obou tenzidů jsou molekuly páru donor-akceptor zhruba stejně vzdáleny. Rozdílem je ale hodnota vázané frakce N_{DA} , kdy v případě CTAB vzniká více párů perylen-fluorescein, než je tomu u septonexu. Tento fakt koresponduje a doplňuje výsledky ze stacionárního měření v předchozí kapitole. Z toho vyplývá, že nejpravděpodobnější příčinou rozdílů zjištěných výsledků v septonexu oproti CTAB, je méně vhodná orientace a lokalizace molekul fluoresceinu vzhledem k molekulám perylenu.

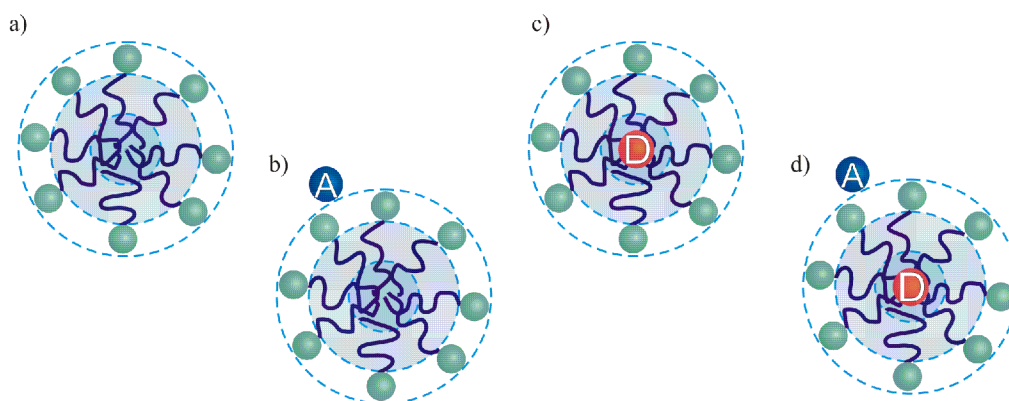
Srovnání výsledků FRET a Poissonovy statistiky

Obecně, intramicelární přenos energie je možný pouze při situaci, kdy je micela obsazena jak molekulou donoru, tak i akceptoru. Pravděpodobnost, se kterou tato skutečnost nastane, lze vypočítat z použitých koncentrací fluorescenčních sond a dříve zjištěných agregačních parametrů (kapitoly 6 a 7) dle Poissonovy statistiky.

$$P_n^S = \frac{x^n e^{-x}}{n!}, \quad (51)$$

kde P_n^S je pravděpodobnost, že micela obsahuje n solubilizovaných molekul S a x odpovídá počtu solubilizovaných molekul v jedné micelle.

Při dodržení nízkých koncentrací donoru a akceptoru v systému pak mohou obecně nastat čtyři možnosti obsazenosti micely, které jsou znázorněny na obr. 44. Jelikož je v rámci fluorescenčního měření sledována fluorescence perylenu, z micel, které perylen neobsahují, žádný fluorescenční signál není získán. Fluorescenční signál pochází pouze z micel, které perylen obsahují, a to buď v nezhášené formě anebo zhášené díky přítomnosti molekul fluoresceinu.

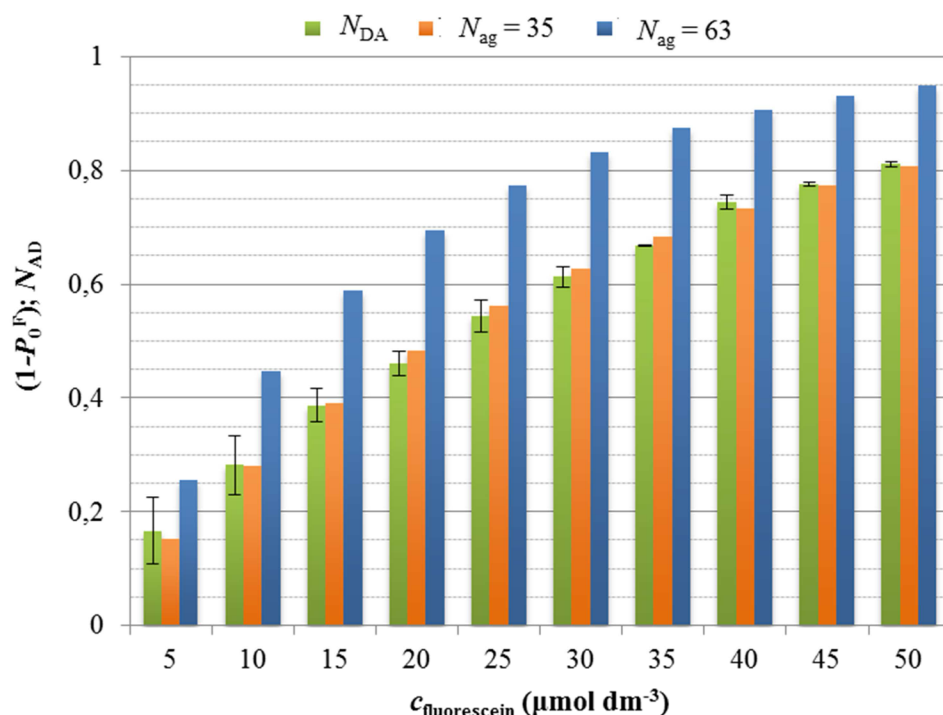


Obr. 44: Obecné možnosti obsazení micel molekulami donoru a akceptoru při nízkých koncentracích daných látek v systému.

Pravděpodobnost obsazení micely molekulou perylenu se ve studovaných systémech pohybuje v rozmezí $(1 - P_0^P) = 0,025 - 0,058$ (viz Příloha, Tab. P1, P3). Jelikož ale u micel, v nichž se perylen nenachází, nedochází k absorpci světla, nedochází v nich ani k přenosu energie. Z toho důvodu je pravděpodobnost výskytu molekuly akceptoru (fluoresceinu) pro přenos energie rozhodující. Na následujících obr. 45 a 46 jsou do grafů vyneseny vypočítané pravděpodobnosti výskytu alespoň jedné molekuly fluoresceinu v micelle CTAB/septonexu

v závislosti na koncentraci fluoresceinu v systému, společně s vázanou frakcí N_{DA} zjištěnou z časově rozlišeného měření FRET pro daný systém. Pro výpočet pravděpodobnosti výskytu daného fluoroforu byly použity stanovené agregační parametry kationtových tenzidů v této disertační práci, vypočítané pravděpodobnosti včetně použitých agregačních parametrů se nacházejí v Tab. P1-P4 v příloze.

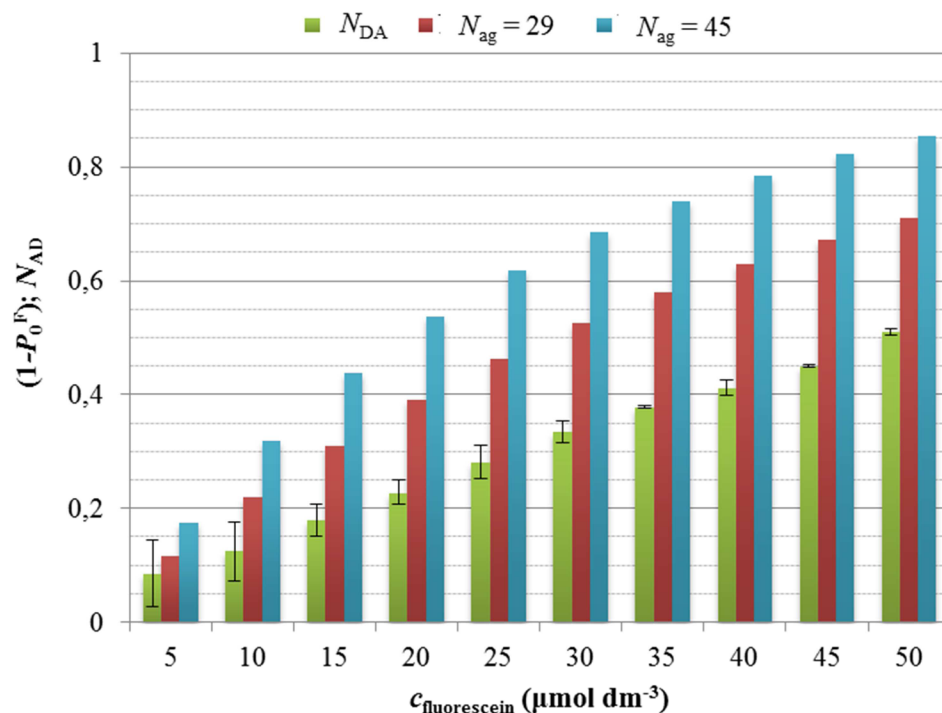
Jak je vidět na obr. 45, u micelárního roztoku CTAB dochází k pozoruhodné shodě vázané frakce N_{DA} , stanovené experimentálně, která v sobě ukrývá informaci o poměru počtu nezhasených a zhasených molekul perylenu po excitaci vzorku a teoreticky vypočítané pravděpodobnosti výskytu fluoresceinu pro agregační číslo micely CTAB určené pomocí stacionárního měření ($N_{ag} = 35$).



Obr. 45: Porovnání pravděpodobnost výskytu alespoň jedné molekuly fluoresceinu v micelle CTAB a vázané frakce N_{DA} v závislosti na koncentraci fluoresceinu ve vzorku. ($c_{CTAB} = 2 \text{ mM}$).

Tento výsledek svádí k myšlence, že stanovení agregačního čísla stacionárním měření zhášení fluorescence bude v případě CTAB reálnější než pomocí časově rozlišeného měření, podle něhož je agregační číslo CTAB vyšší. Nicméně je třeba brát v potaz i ovlivnění výsledků FRET vzájemnou orientací molekul fluoresceinu a perylenu. I v případě, kdy je micela obsazena molekulou donoru zároveň s molekulou akceptoru, nemusí dojít k přenosu energie díky možnosti špatného natočení emisních a absorpčních přechodových momentů daných molekul. Naměřené výsledky (viz obr. 45) by znamenaly, že pokud je doopravdy micelární agregační číslo CTAB rovno 35 v případě 2mM roztoku, pak by mezi všemi páry perylen-fluorescein, které se potkaly na jedné micelle, došlo vždy k přenosu energie nezávisle na jejich orientaci anebo by micely CTAB poskytovaly možnost přesně potřebné orientace páru donor-akceptor k tomuto procesu.

U 2mM septonexu na rozdíl od CTAB ke shodě vázané frakce N_{DA} a pravděpodobnosti výskytu alespoň jedné molekuly fluoresceinu v micelle při stanovených agregačních parametrech v této práci nedochází. Experimentálně stanovená vázaná frakce má výrazně nižší hodnotu než pravděpodobnost výskytu fluoresceinu pro obě stanovená agregační čísla septonexu. Tento fakt opět koresponduje se zjištěním, že celkově k přenosu energie dochází v případě septonexu méně než u CTAB, což bude pravděpodobně souviset s rozdílnou orientací/umístěním molekul fluoresceinu na povrchu micel septonexu oproti CTAB díky rozdílné velikosti polární hlavy těchto tenzidů.



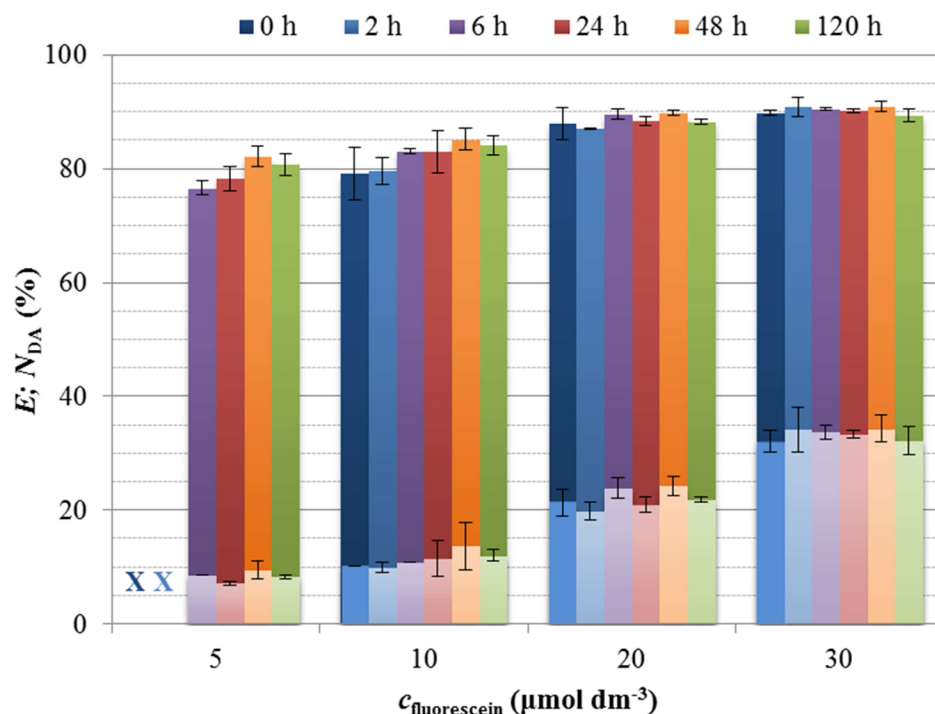
Obr. 46: Porovnání pravděpodobnost výskytu alespoň jedné molekuly fluoresceinu v micelle septonexu a vázané frakce N_{DA} v závislosti na koncentraci fluoresceinu ve vzorku. ($c_{SPTX} = 2 \text{ mM}$).

V rámci výsledků FRET je také nutné brát v úvahu i možnost vícenásobné inkorporace molekul fluoresceinu na povrch jedné micely a ovlivnění výsledné efektivity přenosu energie díky interakci jedné molekuly perylenu s více molekulami fluoresceinu, jejichž pravděpodobnost s rostoucí koncentrací fluoresceinu narůstá. Na základě propočítání poměru koncentrace micel a fluoresceinu (viz přílohy, Tab. P1-P4) bylo rozhodnuto o maximální koncentraci fluoresceinu ve vzorku $c_{\text{fluo,max}} = 30 \text{ mM}$ pro časové měření a měření vlivu přídavku hyaluronanu.

9.2.4 Vliv času po smíchání vzorku na výsledky FRET

Pro studium časového vlivu na získané výsledky FRET byla připravena sada vzorků v micelárním prostředí septonexu. U naměřených absorpčních a emisních spekter nedocházelo ke změnám v průběhu prodlužujícího se časového intervalu po přidání fluoresceinu do systému.

Při časově rozlišeném měření fluorescence u vzorků s nejnižší koncentrací fluoresceinu ($c_{\text{fluo}} = 5 \mu\text{M}$), bezprostředně po přidání do systému a po dvou hodinách od smíchání, nebyla nalezena kratší doba života odpovídající zhášenému perylenu. V těchto případech byla v systému objevena pouze doba života příslušející nezhašenému perylenu. Přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem se při nejnižší koncentraci fluoresceinu projevil až při měření po 6 hodinách po přidání fluoresceinu. Při jeho vyšších koncentracích, to jest od $c_{\text{fluo}} = 10 \mu\text{M}$ výše, pak byly přítomny dvě doby života ihned po jeho přidání do vzorku. Na následujícím obr. 47 jsou do sloupcového grafu vyneseny hodnoty stanovené efektivity přenosu energie E a vázaná frakce donor-akceptor párů N_{DA} v systému. Jak je vidět, při nižších koncentracích fluoresceinu v systému dochází k nárůstu efektivity přenosu s časem, což poukazuje na neustálenost daného systému. Při vyšších koncentracích fluoresceinu je efektivity i vázaná frakce takřka konstantní, z čehož lze usoudit, že při vysokých koncentracích akceptoru se počáteční neustálenost systému na naměřených datech nijak výrazně neprojevuje. Nicméně vzhledem k měření i při nízkých koncentracích fluoresceinu v systému byly všechny vzorky, u nichž bylo měřeno FRET, preventivně ponechány na třepačce alespoň 24 hodin, aby nedocházelo ke zvyšování nepřesnosti měření.

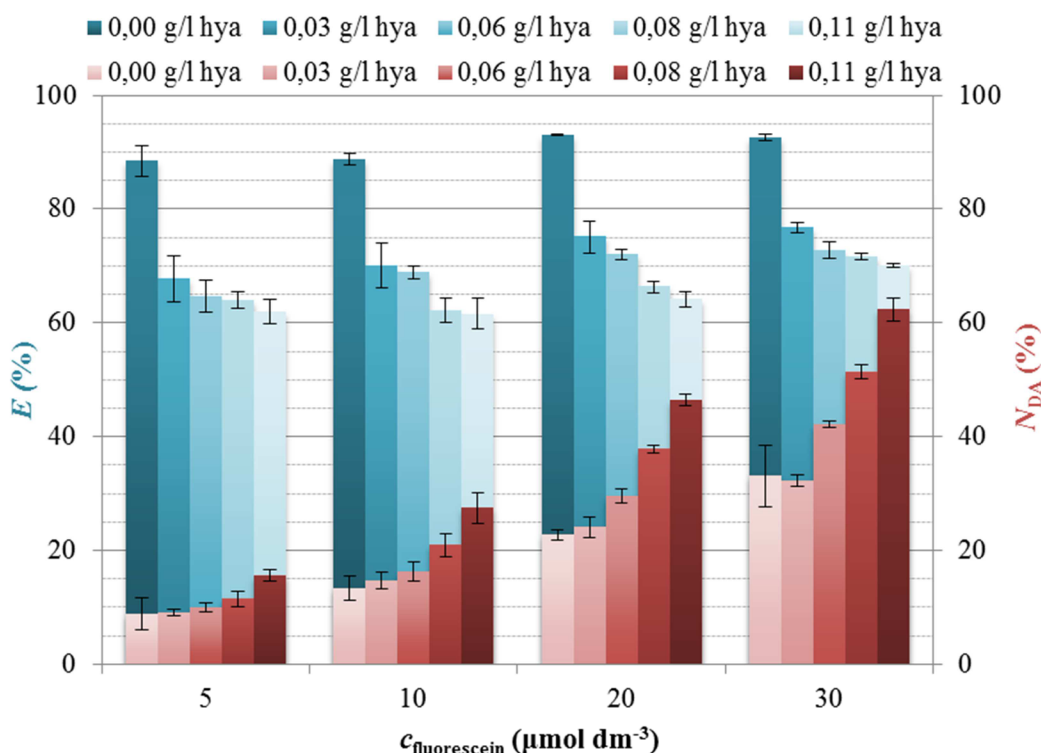


Obr. 47: Efektivita FRET (tmavé barvy) a relativní zastoupení DA párů (světlé barvy) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2 mM roztoku septonexu naměřené v různých časech po smíchání vzorku.

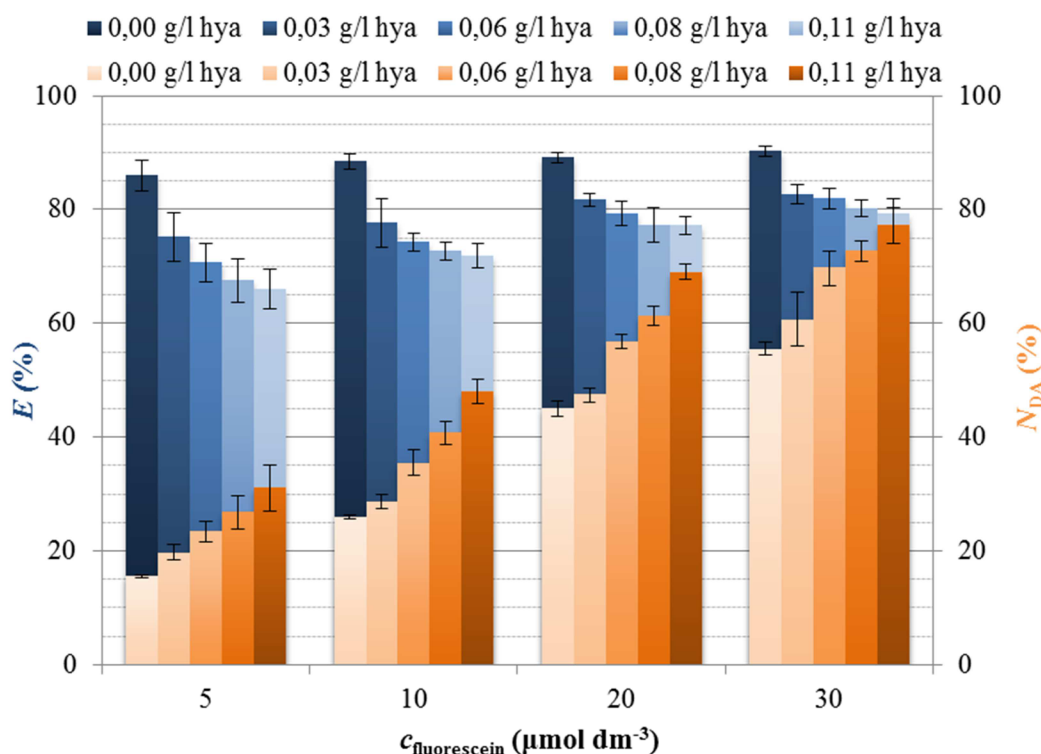
9.2.5 Vliv postupného přidavku hyaluronanu

Studium vlivu přidavku hyaluronanu do kationtového micelárního systému probíhalo na základě opakujících se časově rozlišených fluorescenčních měření, mezi kterými byl do vzorků postupně přidáván roztok hyaluronanu. Z vyhasínacích křivek fluorescence byly vyhodnoceny dvě přítomné doby života a jejich amplitudy odpovídající fluorescenci molekul zhášeného a nezhasíného perylenu. Z nich byla poté vyhodnocena efektivita FRET a vázaná frakce donor-akceptorových párů v daném případě.

Na obr. 48 a 49 jsou do sloupcových grafů vyneseny závislosti efektivita FRET a vázané frakce N_{DA} na koncentraci fluoresceinu v systému pro různé koncentrace hyaluronanu ve vzorku. Jak v případě septonexu, tak i v případě CTAB dochází s rostoucí koncentrací hyaluronanu k prodlužování doby života příslušející molekulám zhášeného perylenu a nárůstu příslušné amplitudy, díky čemuž se zjišťená efektivita přenosu energie s přidavkem hyaluronanu snižuje a hodnota vázané frakce donor-akceptorových párů naopak zvyšuje. Jinými slovy, pokud dochází ke snižování efektivita přenosu, značí to zvětšující se vzdálenost mezi molekulami perylenu a fluoresceinu, mezi kterými FRET probíhá. Nárůst vázané frakce N_{DA} pak souvisí s rostoucím počtem vznikajících donor-akceptorových párů.



Obr. 48: Vliv přidavků hyaluronanu na efektivitu FRET (modrá) a relativní zastoupení DA párů (červená) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2mM roztoku septonexu.



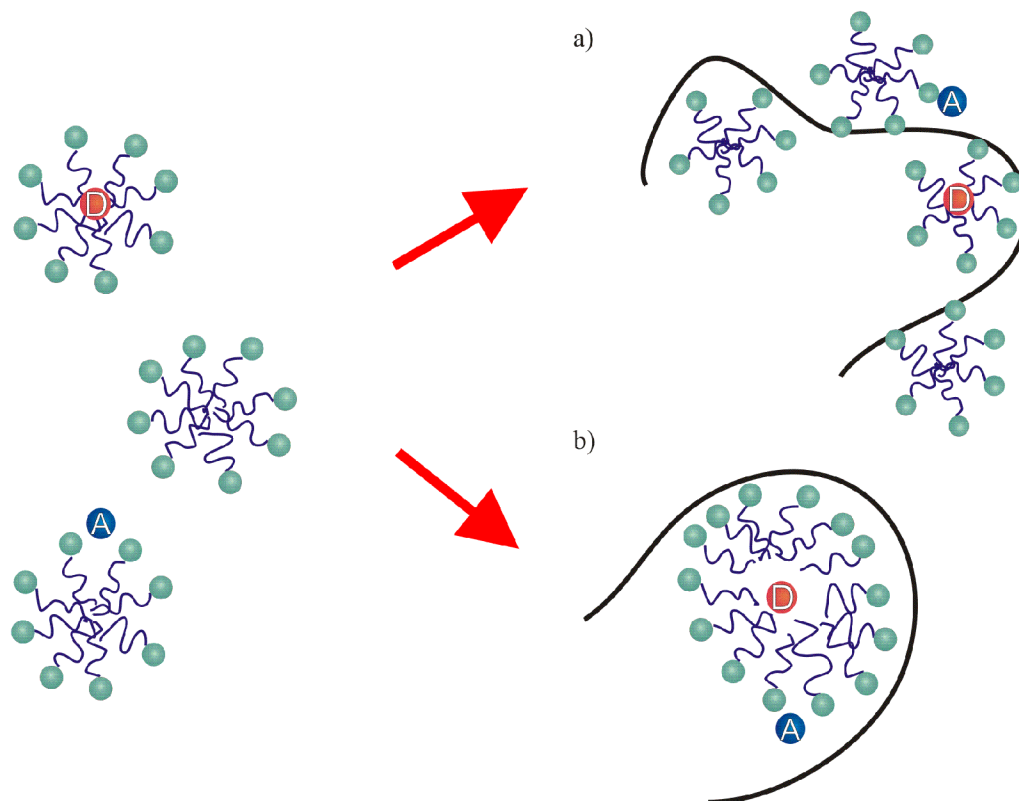
Obr. 49: Vliv přísadků hyaluronanu na efektivitu FRET (modrá) a relativní zastoupení DA párů (červená) v závislosti na koncentraci fluoresceinu v 2mM roztoku CTAB.

První z vysvětlení tohoto jevu by mohla být fúze několika micel do jedné větší, druhou možností by pak bylo vytvoření tzv. struktury perlového náhrdelníku, kdy jsou na řetězci polyelektrolytu formovány menší agregáty micelárního typu. V obou případech by teoreticky mělo docházet ke zvyšující se pravděpodobnosti setkání se perylenem a fluoresceinem do potřebné vzdálenosti, při které přenos energie probíhá a zároveň k nárůstu vzdálenosti mezi molekulami perylenem a fluoresceinem.

Na příkladu na následujícím obr. 50 u výchozího micelárního roztoku k FRET nedochází, jelikož ani u jedné micely nejsou zároveň přítomny molekuly donoru a akceptoru. V případě, kdy po interakci s hyaluronanem dochází k fúzi těchto micel a vzniku jedné větší, dochází i k tomu, že se molekula donoru a molekula akceptoru solubilizují do jedné micely, v níž se potkají v dostatečné vzdálenosti pro přenos energie. Splynutím dalších micel do větších micelárních útvarů pak vzrůstá i pravděpodobnost tvorby donor-akceptorového páru.

Pokud interakce původních micel s řetězcem hyaluronanu vede ke vzniku struktury perlového náhrdelníku, pak teoreticky může dojít k situaci, kdy se solubilizovaný donor v jedné minimicelě dostane do vhodné vzdálenosti s akceptorem, který sice interaguje s jinou minimicelou, avšak vlivem sbalení se do většího agregátu díky řetězci hyaluronanu se dostanou dostatečně blízko sebe na to, aby mezi nimi přenos energie proběhl. Tento přenos energie pak bude mít díky větší donor-akceptor vzdálenosti nižší efektivitu, zároveň i oproti micelárnímu systému bez hyaluronanu díky zvětšujícímu se množství podobných sbalených perlových náhrdelníků vzroste pravděpodobnost vytvoření dalších donor-akceptorových párů. V tomto případě by ale mohly vznikat i donor-akceptorové páry v rámci jedné minimicely, u nichž by naopak vzdálenost donoru a akceptoru byla menší než u původních klasických

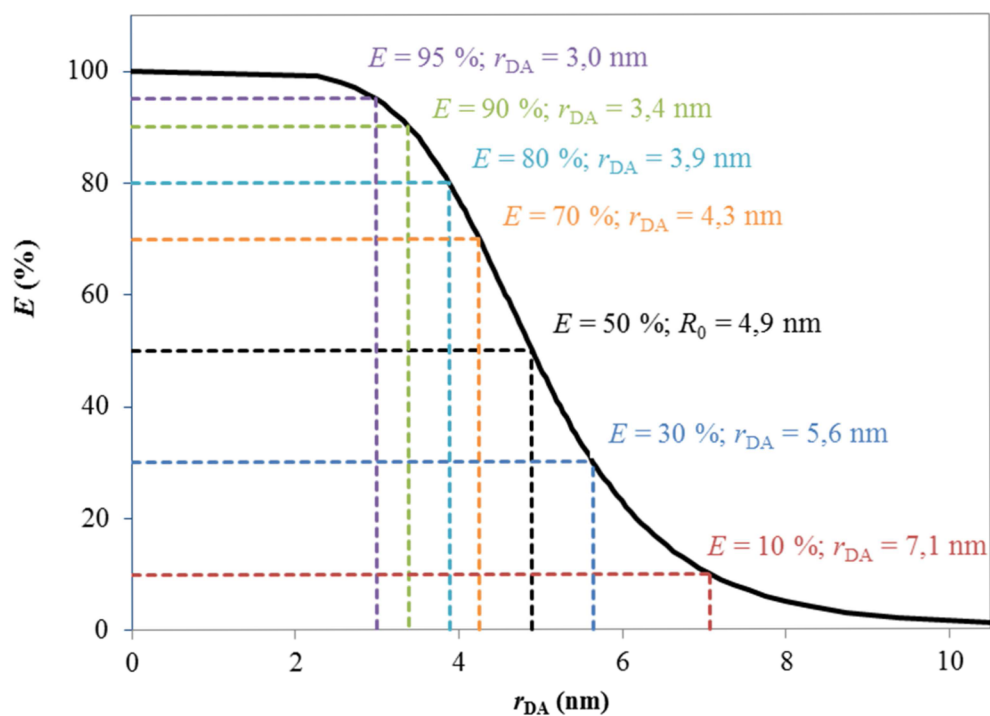
micel a tedy by i efektivita přenosu energie měla být vyšší. Je třeba ale brát v úvahu i omezení přesnosti stanovení vzdáleností mezi donor-akceptor párem vycházející ze samotného principu měření FRET.



Obr. 50: Možné výsledky interakcí mezi hyaluronanem a kationtovými micelami: a) vytvoření struktury tzv. perlového náhrdelníku, b) fúze více micel do jedné větší micely.

Na obr. 51 je vynesena závislost efektivitu FRET na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem pro pár perylen-fluorescein, u kterého byl Försterův poloměr (vzdálenost, kdy má přenos energie efektivitu 50 %) stanoven na 4,9 nm. Již v klasickém micelárním roztoku se naměřená efektivita přenosu pohybuje mezi 85–90 %, což zhruba odpovídá donor-akceptorové vzdálenosti okolo 3,5 nm. Tato vzdálenost by pak měla přibližně odpovídat micelárnímu poloměru. Pokud by došlo ke vzniku minimicel na řetězci hyaluronanu, je vysoce pravděpodobné, že by se molekula perylenu v hydrofobním jádře a molekula fluoresceinu na povrchu stejné minimicely dostaly do tak velké blízkosti, že by došlo k téměř úplnému zhášení perylenu, díky kterému by se doba života takovéto molekuly perylenu blížila 0 ns a nebyla by rozpoznatelná od šumu pozadí. Pro představu, 99% efektivita FRET odpovídá vzdálenosti perylen-fluorescein $r_{DA} = 2,3$ nm.

Z výsledků měření tedy nelze stoprocentně rozhodnout, která varianta agregátů hyaluronan-micela je pravděpodobnější.



Obr. 51: Závislost efektivity FRET na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem pro pár perylen-fluorescein (Försterův poloměr $R_0 = 4,9$ nm).

10 ANIZOTROPIE V MICELÁRNÍM ROZTOKU SEPTONEXU A CTAB

V této kapitole disertační práce jsou shrnuty poznatky ze stacionárního a časově rozlišeného měření anizotropie fluorescence perylenu a fluoresceinu v micelárním prostředí septonexu a CTAB po postupných přidávcích hyaluronanu.

Metoda anizotropie fluorescence, která je založená na principu měření polarizované fluorescence, se zpravidla v případě micelárních systémů využívá pro pozorování a stanovování viskozitních poměrů (rigidity, fluidity) v mikrookolí fluoroforu. Jelikož je hydrofobní perylen přednostně solubilizován v jádru micely a fluorescein interaguje s micelárním povrchem, lze z naměřených hodnot anizotropie fluorescence těchto dvou sond usuzovat strukturní změny týkající se celé micely, ke kterým dochází díky interakci s řetězcí hyaluronanu.

10.1 Experimentální část

10.1.1 Příprava vzorků

Byly připraveny čtyři výchozí sady vzorků – perylen v septonexu, perylen v CTAB, fluorescein v septonexu a fluorescein v CTAB, přičemž koncentrace roztoků tenzidu činila 2 mM a koncentrace fluorescenční sondy v dané řadě byla $1 \cdot 10^{-6}$ M. U těchto vzorků proběhlo měření emisních spekter, stacionární anizotropie fluorescence, doby života a časově rozlišené měření anizotropie fluorescence. Následně bylo ke vzorkům přidáno dané množství roztoku hyaluronanu, vzorky byly protřepány na vibračním míchadle a ponechány na třepačce do druhého dne, kdy byla opět provedena všechna fluorescenční měření, po nichž byl do vzorku opět přidán další hyaluronan, atd. Celkem byly provedeny čtyři přídatky hyaluronanu do všech vzorků, přičemž maximální koncentrace hyaluronanu měla hodnotu 0,11 g/l.

10.1.2 Měření

Vzorky s perylenem

Emisní spektra (Fluorolog) byla měřena v rozsahu 420–620 nm při excitační vlnové délce 389 nm, integračním čase 0,1 s a při nastavení štěrbin na 2 nm. Stacionární anizotropie byla měřena v L-formátu, při excitační vlnové délce 389 nm, emisní vlnové délce 441 nm a při nastavení štěrbin na 5 nm. Pro každý vzorek bylo nastaveno 5 opakování měření, přičemž výsledkem byla zjištěná průměrná hodnota anizotropie. Integrační čas byl u všech vzorků nastaven na 1 s.

Dále bylo metodou TCSPC (FluoroCube) měřeno vyhasínání fluorescence vzorku. Z vyhasínací křivky fluorescence při nastavení polarizátorů na magický úhel $54,7^\circ$ byla vyhodnocována doba života vzorku. Ze souboru vyhasínacích křivek při různých nastaveních polarizátorů (VV, VH, HV, HH, V – vertikálně, H – horizontálně) byla vyhodnocena vyhasínací křivka anizotropie fluorescence pro daný vzorek. Jako excitační zdroj byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 389 nm, emisní monochromátor byl nastaven na 441 nm, rozsah TAC byl nastaven na 100 ns a repetition rate na 1 MHz. Minimální rozdíl mezi

vyhasínacími křivkami fluorescence pro vyhodnocení anizotropie byl nastaven na 5 000 countů (fotonů). Všechna měření probíhala při teplotě 25 ± 1 °C.

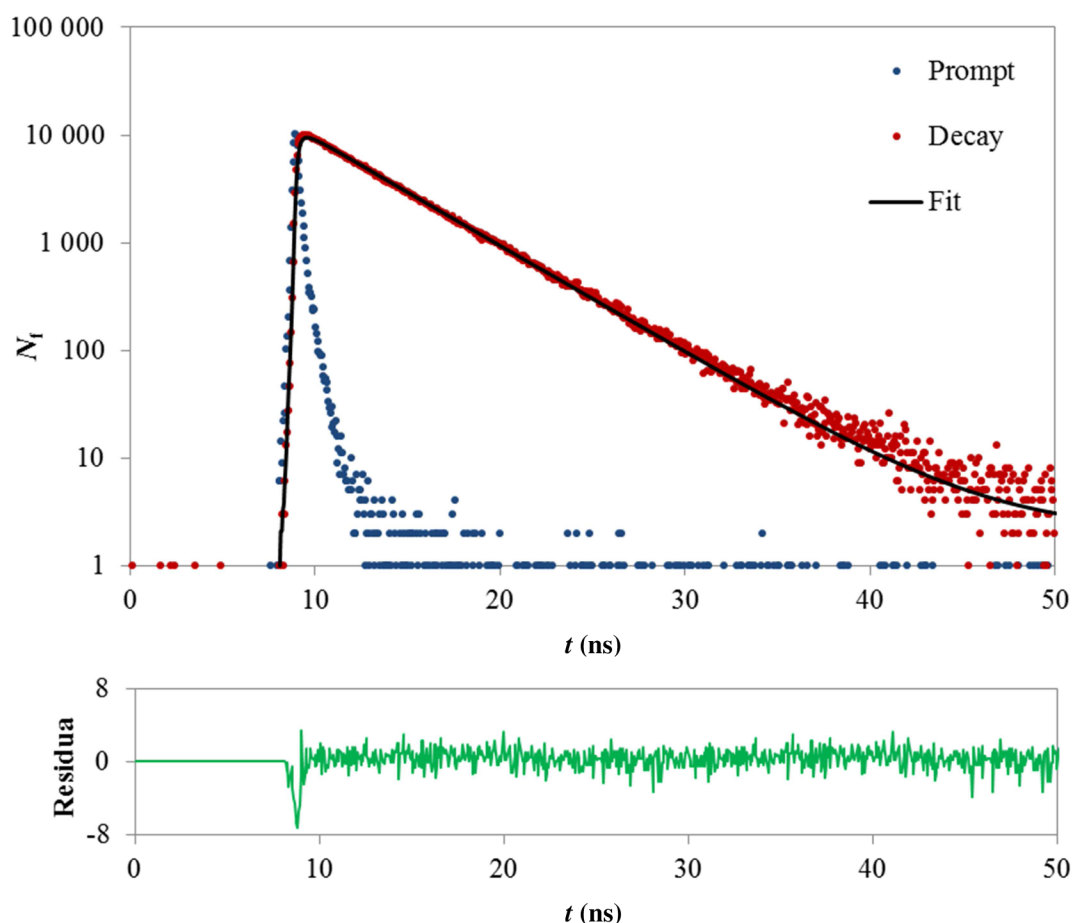
Vzorky s fluoresceinem

Měření emisních spekter, stacionární anizotropie, doby života fluorescence a časově rozlišené anizotropie probíhalo při obdobném nastavení přístrojů jako u vzorků s perylenem. Za excitační vlnovou délku bylo zvoleno 470 nm, emisní spektrum fluoresceinu bylo měřeno v rozsahu 490–620 nm a anizotropie při emisní vlnové délce 525 nm. U časově rozlišených měření byla jako excitační zdroj použita NanoLED 470L dioda a emisní monochromátor byl nastaven na 525 nm.

10.1.3 Vyhodnocení dat

Doba života

Naměřené vyhasínací křivky fluorescence byly vyhodnoceny v programu DAS6 proložením 1-5 exponenciální funkcí viz rovnice (41).



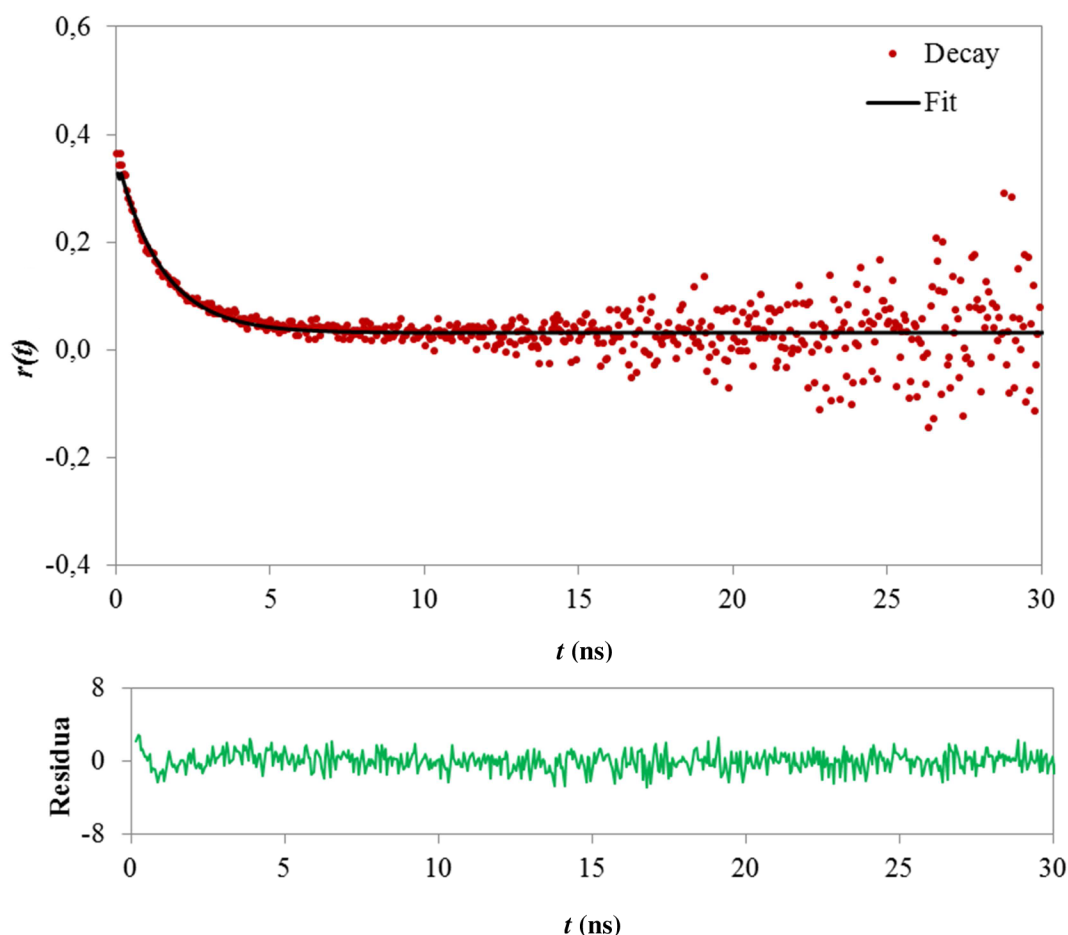
Obr. 52: Vyhodnocení doby života fluoresceinu ($1 \mu\text{M}$) v 2mM septonexu bez přítomnosti hyaluronanu. Prompt – odezva lampy, Decay – vyhasínání fluorescence, Fit – proložení dat exponenciální funkcí.

Časově rozlišená anizotropie fluorescence

Z naměřených vyhasínacích křivek fluorescence při daných orientacích polarizátorů byla v programu DAS6 vytvořena vyhasínací křivka anizotropie fluorescence, která pak byla proložena funkcí ve tvaru:

$$r(t) = r_{\infty} + B_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_{ri}}\right), \quad (52)$$

kde r_{∞} představuje infinitní neboli rovnovážnou hodnotu anizotropie fluorescence, B_i je před-exponenciální funkce (amplituda), které souvisí s množstvím emitující látky v analyzovaném vzorku a τ_{ri} jsou příslušné rotační korelační doby.



Obr. 53: Vyhodnocení vyhasínání anizotropie fluorescence fluoresceinu ($1 \mu\text{M}$) v 2mM septonexu bez přítomnosti hyaluronanu. Decay – vyhasínání anizotropie fluorescence, Fit – proložení dat exponenciální funkcí.

10.2 Výsledky a diskuze

10.2.1 Emisní spektra, doba života

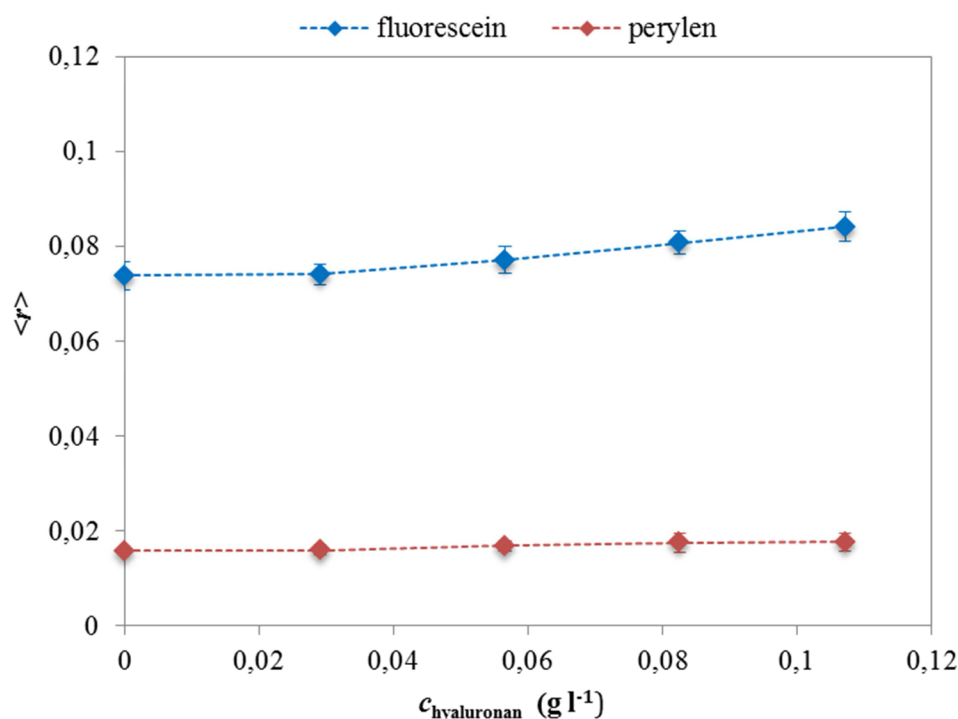
Emisní spektra (jejich tvar a poloha maxima) perylenu a fluoresceinu v septonexu a CTAB nebyla ovlivněna přidavky hyaluronanu do systému. Taktéž doba života se u obou fluoroforů vlivem přítomnosti hyaluronanu neměnila. Fluorescein vykazoval ve všech vzorcích se

septonexem stejnou dobu života $\tau_{fl,SPTX} = (4,36 \pm 0,02)$ ns a ve vzorcích s CTAB byla jeho doba života stanovena na $\tau_{fl,CTAB} = (4,39 \pm 0,04)$ ns. Perylen v roztoku septonexu nezávisle na přidávcích hyaluronanu vykazoval dobu života $\tau_{per,SPTX} = (5,75 \pm 0,05)$ ns a ve vzorcích s CTAB pak jeho doba života byla stanovena na $\tau_{per,SPTX} = (5,70 \pm 0,07)$ ns. Z toho vyplývá, že naměřené změny v hodnotách anizotropie fluorescence jsou způsobeny pouze omezením rotačního pohybu fluorescenčních sond vlivem změny struktury jejich mikrookolí.

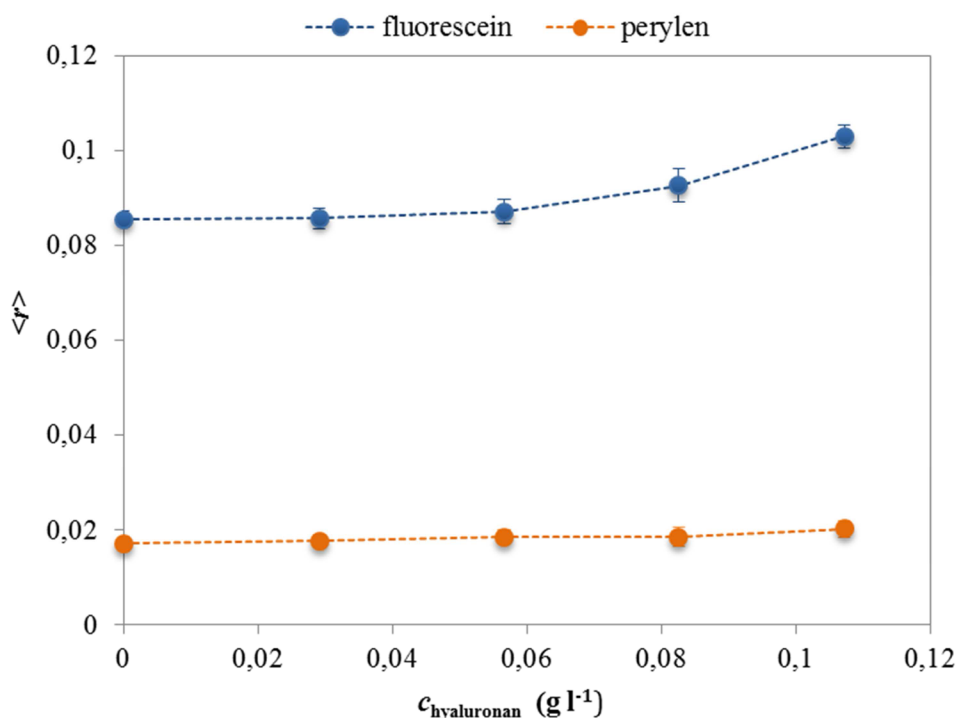
10.2.2 Stacionární anizotropie

Na obr. 54 a 55 jsou v grafech vyneseny závislosti stacionární anizotropie fluorescence perylenu a fluoresceinu v 2mM roztoku kationtového tenzidu na koncentraci hyaluronanu ve vzorku, která byla zvyšována postupně přidávkou tohoto biopolymeru do systému. Hodnoty anizotropie příslušející molekulám perylenu vypovídají o mikroviskozitních změnách hydrofobních jader micel, anizotropie fluoresceinu pak zobrazuje strukturální změny odehrávající se na micelárním povrchu. Získané hodnoty anizotropie fluorescence pro jednotlivé případy jsou shrnuty v tab. 7.

U obou tenzidů má naměřená anizotropie fluorescence perylenu nízkou hodnotu v rozmezí 0,016–0,020, což značí vysokou fluiditu prostředí micelárního jádra, v němž se molekuly perylenu nachází. Pro srovnání, nejvyšší možná anizotropie perylenu v případě nulového rotačního pohybu má hodnotu 0,35 [1], v případě neomezeného rotačního pohybu perylenu se anizotropie fluorescence limitně blíží nule. Vlivem přidávků hyaluronanu do systému dochází pouze k velmi nepatrnému nárůstu anizotropie fluorescence perylenu, který by souvisel se strukturálními změnami jádra.



Obr. 54: Stacionární anizotropie fluorescence perylenu (červeně) a fluoresceinu (modře) v závislosti na koncentraci hyaluronanu postupně přidávaného do 2mM roztoku septonexu.



Obr. 55: Stacionární anizotropie fluorescence perylenu (oranžově) a fluoresceínu (modře) v závislosti na koncentraci hyaluronanu postupně přidávaného do 2mM roztoku CTAB.

Tab. 7: Hodnoty stacionární anizotropie fluorescence perylenu a fluoresceínu v 2 mM micelárním prostředí septonexu a CTAB po přidavcích hyaluronanu do systému.

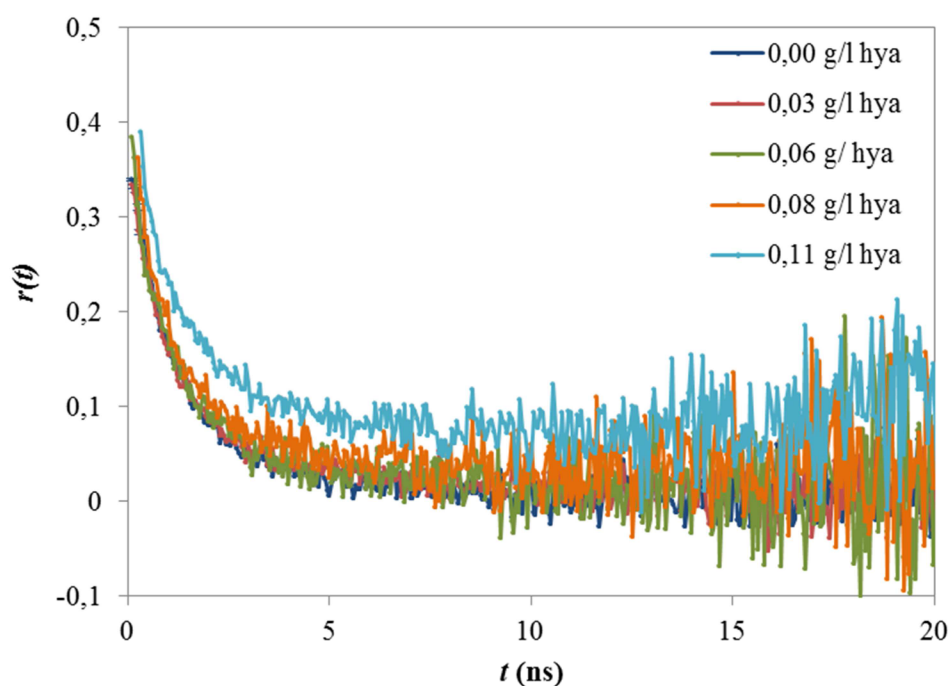
$c_{\text{hya}} \text{ (g/l)}$	Septonex		CTAB	
	$\langle r_{\text{flu}} \rangle$	$\langle r_{\text{per}} \rangle$	$\langle r_{\text{flu}} \rangle$	$\langle r_{\text{per}} \rangle$
0	0,074 ± 0,003	0,015 ± 0,002	0,085 ± 0,002	0,017 ± 0,003
0,03	0,075 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,086 ± 0,002	0,018 ± 0,002
0,06	0,077 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,087 ± 0,003	0,019 ± 0,002
0,08	0,081 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,093 ± 0,004	0,019 ± 0,002
0,11	0,084 ± 0,003	0,018 ± 0,002	0,103 ± 0,003	0,020 ± 0,002

Na rozdíl od perylenu, u fluoresceínu dochází k výraznějšímu nárůstu anizotropie s rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorku, což značí významnější ovlivnění struktury micelárního povrchu díky interakcím s řetězcí hyaluronanu, než je tomu v případě hydrofobního jádra. U septonexu je nárůst anizotropie méně znatelný oproti vzorkům s CTAB, celkově i naměřené hodnoty anizotropie v rámci koncentrační řady se septonexem jsou nižší.

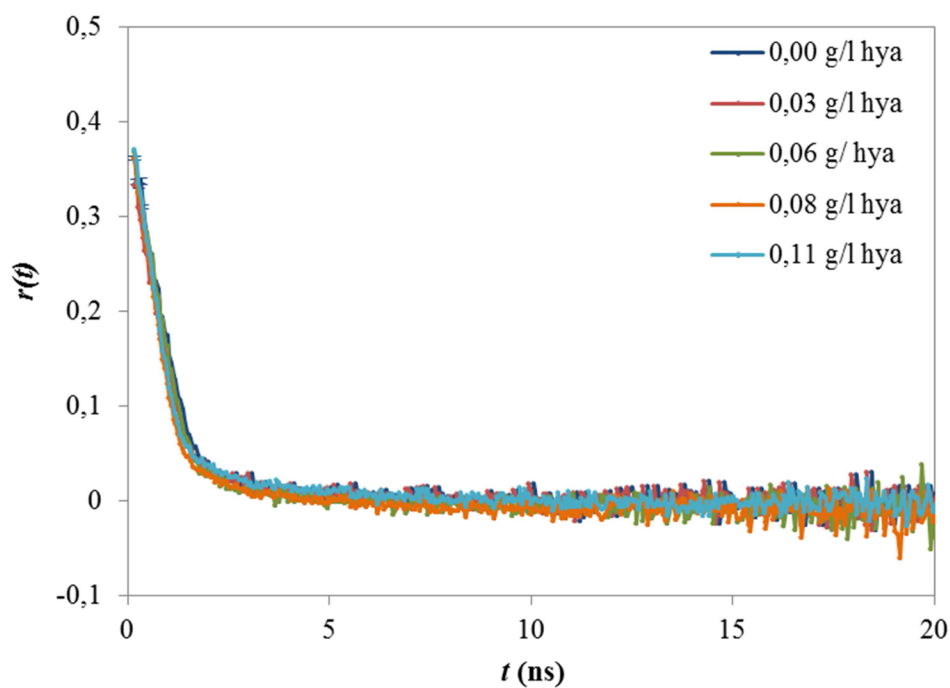
10.2.3 Časově rozlišená anizotropie

Časově rozlišené měření anizotropie fluorescence potvrdilo získané výsledky v rámci stacionárního měření anizotropie. Na obr. 56 a 57 se nachází naměřené poklesy anizotropie

fluorescence fluoresceinu a perylenu v rámci řady se septonexem. Vyhodnocené rotační korelační doby (čas, za který se molekula fluoroforu otočí o 1 radián) jsou shrnuty v tab. 8.



Obr. 56: Vyhasínací křivka anizotropie fluorescence fluoresceinu v prostředí 2mM septonexu obsahujícím různé přísavky hyaluronanu.



Obr. 57: Vyhasínací křivka anizotropie fluorescence perylenu v prostředí 2mM septonexu obsahujícím různé přísavky hyaluronanu.

U vyhasínacích křivek anizotropie fluorescence fluoresceinu při zvyšující se koncentraci hyaluronanu v systému dochází k posunu směrem k vyšším hodnotám anizotropie $r(t)$, kdežto u vzorků s perylenem k viditelnému posunu vyhasínacích křivek anizotropie nedochází, ačkoliv se hodnoty zjištěných rotačních korelačních dob perylenu mírně zvyšují. Celkově vyhodnocené rotační korelační doby korespondují se získanými výsledky v rámci stacionárního měření, kdy u perylenu dochází pouze k téměř nezatelnému omezení rotačního pohybu a u fluoresceinu je pak toto omezení pohybu výraznější.

S ohledem na závěry z měření FRET ve stejném systému, naměřené hodnoty anizotropie fluorescence obou sond spíše odpovídají situaci, ve které vlivem interakcí vzniká struktura podobná perlovému náhrdelníku, kdy dochází k formování menších vázaných micely na řetězci hyaluronanu. Malé změny v anizotropii a rotačním korelačním čase perylenu korespondují s ovlivněním mikroprostředí hydrofobního jádra, u něhož dojde ke zmenšení vlivem celkového zmenšení micely, tím pádem i k mírnému omezení rotačního pohybu perylenu. Interakce micel s hyaluronanem pak vedou k výraznějšímu ovlivnění okolí fluoresceinu, tedy micelárního povrchu, kdy vlivem přítomnosti hyaluronanu dochází ke zvýšení rigidity prostředí micelárního povrchu, které ústí v omezování rotačního pohybu fluoresceinu.

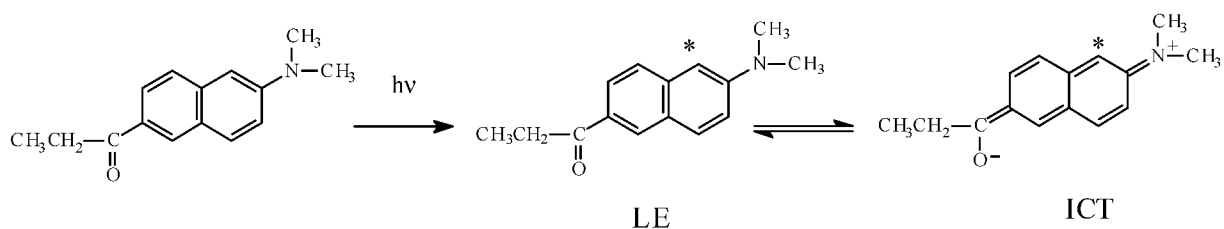
Tab. 8: Hodnoty rotační korelační doby perylenu a fluoresceinu v 2mM micelárním prostředí septonexu a CTAB po přidání hyaluronanu do systému.

c_{hya} (g/l)	Septonex		CTAB	
	$\tau_{r,\text{fluo}}$ (ns)	$\tau_{r,\text{per}}$ (ns)	$\tau_{r,\text{fluo}}$ (ns)	$\tau_{r,\text{per}}$ (ns)
0	$1,28 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,02$
0,03	$1,30 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02$
0,06	$1,32 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,04$	$1,51 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,03$
0,08	$1,37 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,02$
0,11	$1,41 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04$

11 ČASOVĚ ROZLIŠENÁ SPEKTRA PRODANU V RŮZNÝCH PROSTŘEDÍCH

Tato kapitola disertační práce se zabývá studiem fotofyzikálního chování prodanu v různých prostředích se zaměřením se na kationtové micelární systémy septonexu a jejich interakci s hyaluronanem.

Prodan, 6-propionyl-2-dimethylaminonaftalen je fluorescenční sonda citlivá na polaritu a přítomnost vodíkových můstků (viz kapitola 2.1.3). Jeho absorpční a emisní spektra vykazují silný posun s vlastnostmi prostředí. Obecně se excitovaná molekula prodanu může vyskytovat ve dvou různých stavech. Prvním z nich je tzv. LE stav (*locally excited*), který může přejít na energeticky chudší tzv. ICT stav (*intramolecular charged transferred*). V nepolárních prostředích dochází zpravidla k emisi záření z LE stavu, v polárních pak díky silné interakci s rozpouštědlem ze stavu ICT.



Obr. 58: Struktura molekuly prodanu – LE stav (lokálně excitovaný) a ICT stav (intramolekulární přenos náboje).

V rámci této práce byly studovány rozdíly ve fotofyzikálním chování prodanu v různých prostředích. Nejprve byly zkoumány možné interakce prodanu se samotným hyaluronanem a molekulami septonexu při nízkých koncentracích, tj. za nepřítomnosti micel v systému. Následovalo měření fluorescenčních charakteristik prodanu v micelárním systému septonexu a také v micelárním roztoku septonexu s přidávkem hyaluronanu.

11.1 Experimentální část

11.1.1 Příprava vzorků

Pro tyto experimenty byly připraveny vzorky, v nichž byl prodan rozpuštěn v různých vodných roztocích – voda, roztok hyaluronanu (340 kDa) o koncentraci 0,1 g/l, 0,4 mM roztok septonexu, 2 mM roztok septonexu a 2 mM roztok septonexu s hyaluronanem (340 kDa, 0,1 g/l). Koncentrace prodanu ve vzorku byla zvolena na $5 \cdot 10^{-6}$ M, při této koncentraci by nemělo docházet ke tvorbě agregátů sondy, ale zároveň umožňuje relativně rychlý sběr dat. Vzorky byly připraveny standardním postupem.

11.1.2 Měření

Měření emisních spekter a vyhasínacích křivek fluorescence probíhalo na přístroji FluroCube. Pro excitaci byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 372 nm s šířkou pulzu 1,1 ns. Rozsah TAC byl nastaven na 50 ns, coaxial delay na 65 ns a sync delay na 0 ns. Polarizátory byly nastaveny na magický úhel $54,75^\circ$. Emisní spektrum bylo měřeno rychlostí 1 nm/1 ns.

Vyhasínací křivky fluorescence byly sbírány přes celé emisní spektrum prodanu s krokem 5 nm.

11.1.3 Vyhodnocení dat

Vyhasínací křivky fluorescence byly vyhodnoceny v programu DAS6 pomocí globální analýzy, která umožňuje současné proložení všech naměřených vyhasínacích křivek pro daný vzorek základní 1-5 exponenciální funkcí (rovnice 41) za předpokladu, že soubor vyhasínacích křivek fluorescence odpovídá stejnému základnímu modelu rozpadu fluorescence se sdílenými parametry dob života.

Dekonvoluce stacionárních emisních spekter (rozložení na jednotlivé fluorescenční komponenty) byla provedena na základě stanovených dob života různých forem prodanu τ_i a jejich relativních (frakčních) amplitud f_i , které byly spočítány dle rovnice (42).

Časově rozlišená spektra (TRES) pak byla ze získaných parametrů rekonstruována dle vztahu:

$$I_f(\lambda, t) = I_{SS}(\lambda) \frac{\sum_i f_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i(\lambda)}}}{\sum_i f_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}, \quad (53)$$

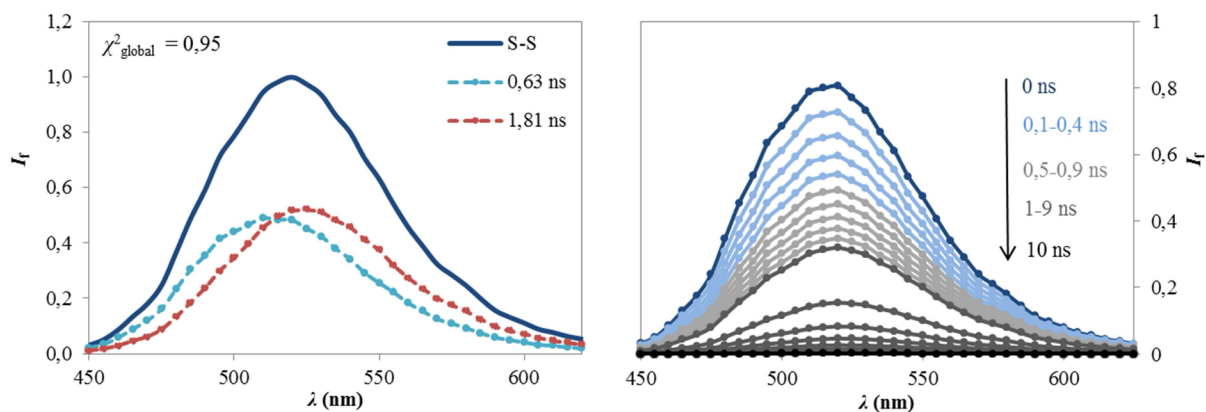
kde I_{SS} představuje stacionární intenzitu fluorescence, τ_i je doba života excitovaného stavu a f_i je její příslušná relativní amplituda.

11.2 Výsledky a diskuze

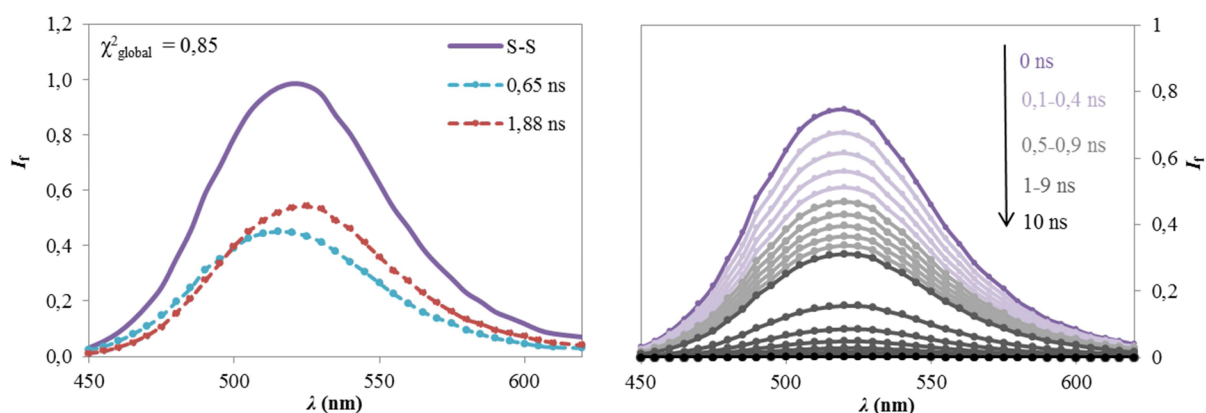
11.2.1 Interakce prodanu s hyaluronanem a septonexem pod CMC

Jako základ studia micelárních systémů septonexu a jejich interakcí s hyaluronanem pomocí prodanu jako fluorescenční sondy bylo potřeba zjistit, zda molekuly prodanu interagují se samotným hyaluronanem nebo s molekulami septonexu v systému pod kritickou micelární koncentrací. Z toho důvodu byl proveden soubor měření vyhasínacích křivek fluorescence prodanu ve vodném prostředí, ve vodném roztoku hyaluronanu a v 0,3 mM roztoku septonexu (kritická micelární koncentrace septonexu byla stanovena na 0,83 mM, viz kapitola 6). Na obr. 59, 60 a 61 jsou zobrazena získaná časově rozlišená spektra TRES a rozložená emisní spektra na jednotlivé formy prodanu.

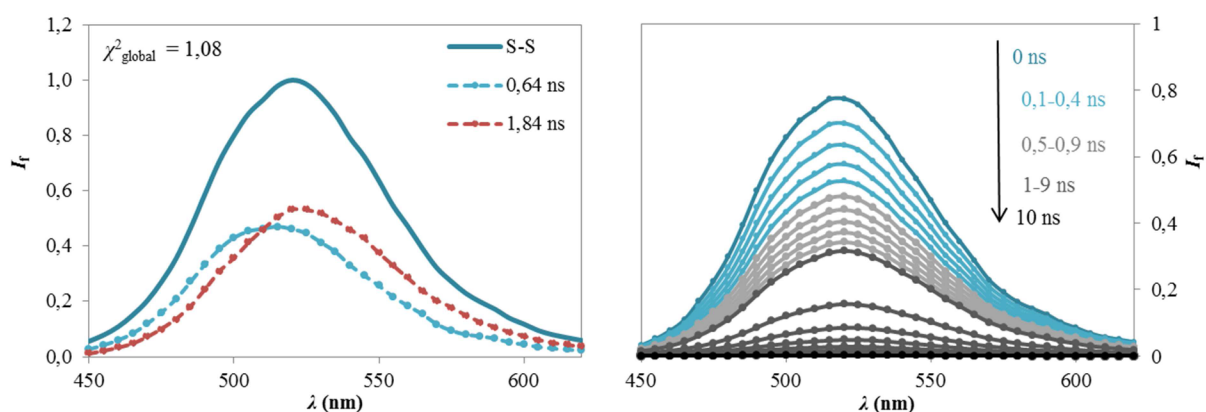
Obecně, v aprotických polárních rozpouštědlech, ke kterým patří voda, prodan emituje z ICT stavu a vykazuje dvě doby života, z nichž kratší ($\tau_1 \sim 0,6$ ns) přísluší komplexům, které vytváří molekuly prodanu s molekulami vody díky vodíkovým můstkům [95]. Tento jev byl v rámci získaných výsledků potvrzen. Dekonvolucí emisního spektra prodanu ve vodě byly stanoveny dvě jeho emisní formy, jejichž doby života mají hodnoty $\tau_1 = (0,63 \pm 0,03)$ ns a $\tau_2 = (1,81 \pm 0,04)$ ns. Emisní maximum první formy má hodnotu $\lambda_1 = (510 \pm 2,5)$ nm, druhá forma prodanu má nejvýraznější emisi při $\lambda_2 = (525 \pm 2,5)$ nm. Časově rozlišené spektrum (TRES) prodanu ve vodě ukazuje pouze jeden emisní pík s $\lambda_{max} = (520 \pm 2,5)$ nm, u něhož nedochází k posunu s časem.



Obr. 59: Dekonvoluce emisního spektra (vlevo) a časově rozlišená spektra TRES (vpravo) prodanu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} M$ ve vodném prostředí.



Obr. 60: Dekonvoluce emisního spektra (vlevo) a časově rozlišená spektra TRES (vpravo) prodanu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} M$ v 0,1 g/l roztoku hyaluronanu (340 kDa).



Obr. 61: Dekonvoluce emisního spektra (vlevo) a časově rozlišená spektra TRES (vpravo) prodanu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} M$ v 0,3 mM roztoku septonexu ($c_{CMC} = 0,83 mM$).

Velmi podobné výsledky byly naměřeny taktéž pro prodan ve vodném roztoku hyaluronanu a ve vodném roztoku septonexu pod jeho kritickou micelární koncentrací. V případě roztoku hyaluronanu mají zjištěné doby života forem prodanu v systému hodnoty $\tau_1 = (0,65 \pm 0,02) ns$ a $\tau_2 = (1,88 \pm 0,05) ns$, u roztoku septonexu pak $\tau_1 = (0,64 \pm 0,03) ns$ a $\tau_2 = (1,84 \pm 0,03) ns$. Polohy jednotlivých emisních maxim odpovídají vzorkům s čistým vodným prostředím. Stejně je tomu tak i v případě časově rozlišených spekter. Jediný drobný

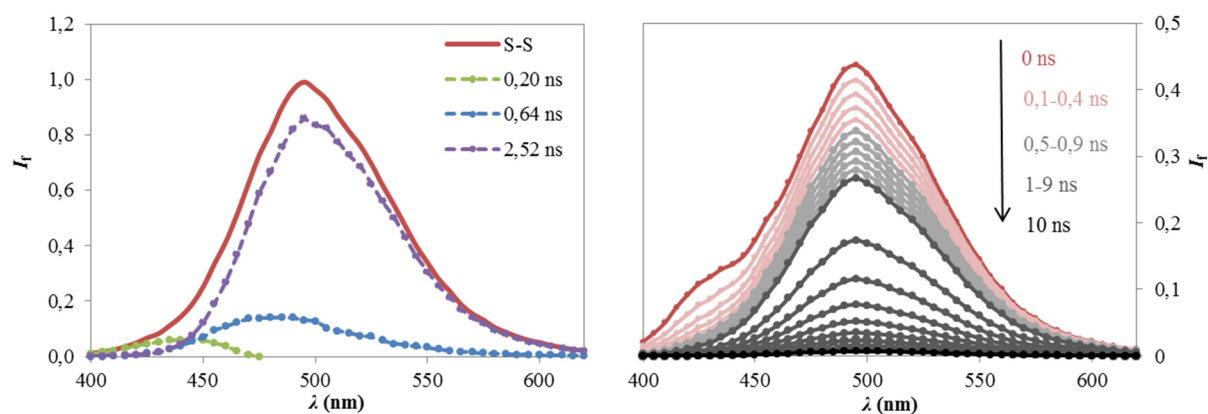
rozdíl oproti čisté vodě spočívá v malém útlumu emisní formy prodanu, která vytváří s molekulami komplexy přes vodíkovou vazbu, což je pravděpodobně způsobeno přítomností dalších látek (hyaluronanu, septonexu) ve vzorku. Celkově lze ale říci, že s nejvyšší pravděpodobností nedochází k žádným interakcím mezi prodanem a samotným hyaluronanem, ani prodanem a jednotlivými molekulami septonexu v roztoku pod CMC.

11.2.2 Prodan v micelárním roztoku septonexu

V micelárním roztoku septonexu byly zjištěny tři různé doby života odpovídající jednotlivým formám prodanu. Na modré straně spektra, s maximem emise okolo 440 nm, má první forma prodanu dobu života $\tau_1 = (0,20 \pm 0,04)$ ns. Z polohy tohoto lokálního emisního maxima a příslušné délky doby života lze předpokládat, že se jedná o molekuly prodanu emitující z LE stavu, které jsou solubilizovány v hydrofobním jádře micel septonexu.

Druhá forma prodanu vykazuje maximum emise při vlnové délce okolo 480 nm a přísluší jí doba života $\tau_2 = (0,64 \pm 0,03)$ ns. Bathochromní posun emise společně s prodloužením doby života signalizuje vyšší polaritu mikroprostředí, v němž se tento emisní druh prodanu nachází. Pravděpodobně se bude jednat o prostředí palisádové vrstvy micely, která se nachází mezi hydrofobním jádrem a polárními hlavami molekul tenzidů, odkud budou molekuly prodanu emitovat z LE stavu.

Třetí emisní druh prodanu, nalezený v micelárním prostředí septonexu, má odlišný charakter oproti dvěma předchozím formám prodanu lokalizovaných uvnitř micelárních agregátů. Jeho emise je nejvíce posunutá směrem k červené oblasti spektra (maximum má okolo 495 nm), je dominantní, a zjištěná doba života má výrazně vyšší hodnotu oproti předchozím případům, tj. $\tau_3 = (2,52 \pm 0,03)$ ns. S největší pravděpodobností se jedná o molekuly prodanu nacházející se na hydratovaném povrchu micelárních agregátů, u nichž vlivem interakcí s molekulami vody dochází k přenosu náboje, díky kterému pak tyto molekuly prodanu emitují z energeticky chudšího stavu ICT.



Obr. 62: Dekonvoluce emisního spektra (vlevo) a časově rozlišená spektra TRES (vpravo) prodanu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 2mM roztoku septonexu ($c_{CMC} = 0,83$ mM).

Časově rozlišená spektra prodanu v micelárním roztoku septonexu vykazují dva píky, z nichž první, nacházející se na modré straně spektra, se v delších časech po excitaci vytrácí. U dominantního píku se poloha jeho maxima s časem po excitaci nemění. Tento průběh TRES odpovídá teoretickému modelu dvou stavů, který bývá vhodný pro popis reakcí

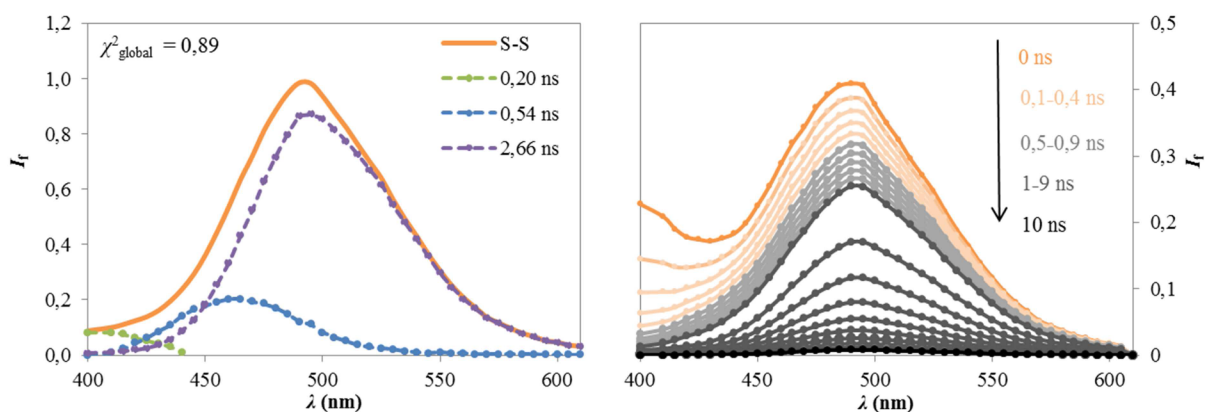
v excitovaném stavu, a také odpovídá situaci, kdy dochází k vnitřnímu přenosu náboje, což je tento konkrétní případ.

11.2.3 Prodan v micelárním roztoku septonexu s přidavkem hyaluronanu

Po přidavku hyaluronanu do 2mM roztoku septonexu byly při časově rozlišeném měření opět nalezeny tři doby života prodanu, stejně jako v případě čistého micelárního prostředí. První, nejkratší z nich, příslušející molekulám prodanu lokalizovaných v hydrofobním jádře agregátů emitujících z LE stavu, má hodnotu $\tau_1 = (0,20 \pm 0,05)$ ns. Maximum emise této formy prodanu je oproti čistému micelárnímu roztoku posunuto více na modrou stranu spektra. Prostřední doba života, přisouzená molekulám prodanu v oblasti palisádové vrstvy, se oproti systému bez hyaluronanu lehce zkrátila a má hodnotu $\tau_2 = (0,54 \pm 0,06)$ ns. Stejně jako u první formy prodanu, dochází i tomto případě, vlivem přidavku hyaluronanu, k posunu emise více na modrou stranu spektra. U třetí, dominantní formy prodanu, zůstává maximum emise, stejně jako u čistého 2mM septonexu, na hodnotě $\lambda_{\max} = (495 \pm 2,5)$ nm. Příslušná doba života má hodnotu $\tau_3 = (2,66 \pm 0,04)$ ns.

U časově rozlišených spekter je oproti čistému micelárnímu prostředí zvýrazněna emise na modrém okraji spektra, která se s rostoucím časem po excitaci vytrácí. Tento pík odpovídá molekulám prodanu nacházejícím se uvnitř micelárních agregátů emitujících z LE stavu. Stejně jako v čistém micelárním roztoku, nedochází u dominantního píku k posunu s časem po excitaci vzorku. Tento dominantní pík náleží molekulám prodanu lokalizovaným na povrchu agregátů emitujícím z ICT stavu.

Z těchto výsledků lze usuzovat buď na omezení kontaktu molekul prodanu lokalizovaných na povrchu agregátů s molekulami vody, který vede k přechodu ze stavu LE do ICT nebo opět ke vzniku většího počtu menších micelárních agregátů v podobě struktury perlového náhrdelníku, v nichž se molekuly prodanu mohou solubilizovat do hydrofobního prostředí, které preferují, což by také vysvětlilo zvýraznění emise na modré straně spektra.



Obr. 63: Dekonvoluce emisního spektra (vlevo) a časově rozlišená spektra TRES (vpravo) prodanu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 2mM roztoku septonexu s hyaluronanem o koncentraci 0,11 g/l.

12 ZÁVĚR

Cílem této disertační práce bylo rozšíření použitelných stacionárních a časově rozlišených pokročilých fluorescenčních technik dostupných na školícím pracovišti, které lze využít pro studium vlastností kationtových micelárních systémů a jejich interakcí biopolymery. Tyto metody pak aplikovat na micelární systémy septonexu a CTAB, posléze na studium interakcí mezi těmito systémy a hyaluronanem.

Nejprve byla v rámci práce vypracována literární rešerše, ve které jsou shrnuty základní poznatky z oblasti interakce kationtových tenzidů s hyaluronanem a vhodné fluorescenční metody pro studium vlastností micelárních systémů. Na základě rešerše pak byly vybrány fluorescenční metody použité v této práci.

Jelikož v odborné literatuře nebylo doposud podrobněji komentováno agregační chování septonexu ve vodném prostředí, byla z měření emisního polaritního indexu pyrenu vyhodnocena kritická micelární koncentrace septonexu. Micelární agregační číslo pak bylo stanoveno pro 2, 5, 10 a 25mM roztok tenzidu pomocí stacionárního a časově rozlišeného měření zhášení fluorescence pyrenu cetylpyridinium chloridem. Kvůli srovnání výsledků byly stejným způsobem stanoveny agregační parametry i pro CTAB. Kritická micelární koncentrace septonexu byla stanovena na 0,833 mM, pro CTAB má určená CMC hodnotu 0,938 mM. Hodnoty agregačních čísel se při zvyšující se koncentraci tenzidu zvětšovaly, což poukazovalo na probíhající micelární růst i po překročení kritické micelární koncentrace až do zhruba desetkrát větší koncentrace než je hodnota CMC daného tenzidu. Pro oba tenzidy byly hodnoty agregačního čísla určené pomocí časově rozlišeného zhášení fluorescence vyšší než v případě stacionárního měření, čemuž odpovídali i hodnoty nalezené pro CTAB v literatuře naměřené daným způsobem. Také se ukázalo, že micely septonexu jsou tvořeny menším počtem molekul tenzidů ve srovnání s CTAB. Nižší hodnota kritické micelární koncentrace a agregačního čísla septonexu oproti CTAB souvisí s jeho objemnější polární hlavou.

Dále byly studovány změny základního fluorescenčního chování fluoresceinu a prodanu v koncentrační škále septonexu od velmi nízkých koncentrací pod CMC až po několikanásobně vyšší koncentrace než CMC. U obou sond byl sledován posun emisního maxima, u fluoresceinu byla měřena i stacionární anizotropie fluorescence. Z posunu emisního maxima prodanu a anizotropie fluorescence fluoresceinu v závislosti na koncentraci septonexu byly vyhodnoceny parametry micelizace septonexu korespondující s výsledky získanými z měření emisního polaritního indexu pyrenu.

Rozsáhlá kapitola této práce se zabývá Försterovým přenosem energie mezi perylenem a fluoresceinem v micelárním prostředí septonexu a CTAB, který byl studován pomocí stacionárního i časově rozlišeného měření fluorescence. Pro donor-akceptorový pár perylen-fluorescein byl určen Försterův poloměr na 4,9 nm. Výsledky ze stacionárního měření odpovídají tzv. *cage* systému, kdy jsou molekuly donoru a akceptoru seskupeny pospolu, nikoliv pevně, ale nacházejí se ve stejném „uzavřeném“ prostředí, což odpovídá situaci, při které přenos energie probíhá mezi molekulou perylenu, která je solubilizována v hydrofobním jádře micely a molekulou fluoresceinu na micelárním povrchu. Z časově rozlišeného měření byla vyhodnocována efektivita přenosu energie, která souvisí se vzdáleností mezi donorem

a akceptorem a vázaná frakce, jejíž hodnota v sobě zahrnuje počet vzniklých donor-akceptor párů v systému po excitaci daného vzorku. Efektivita přenosu energie nabývala pro oba micelární systémy přibližně stejných hodnot, z čehož lze usuzovat, že se vzdálenost mezi perylenem a fluoresceinem v rámci septonexu a CTAB micel nelišila. Vázaná frakce pak pro micelární systém septonexu vykazovala výrazně nižší hodnoty než u CTAB. Celkově byl tak přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v prostředí CTAB výraznější než u septonexu, což bylo pravděpodobně způsobeno vhodnější vzájemnou orientací emisních a absorpčních přechodových momentů donoru a akceptoru. Také byl studován vliv postupných přídavek hyaluronanu do systému na probíhající FRET a z něj byly usuzovány možné interakce mezi hyaluronanem a tenzidy. S rostoucí koncentrací hyaluronanu v systému docházelo ke snižování efektivity přenosu energie, což značí zvětšující se vzdálenost mezi donorem a akceptorem, a zároveň docházelo k nárůstu hodnot vázané frakce, ve které se promítá počet vznikajících donor-akceptor párů. Na základě získaných dat nelze se stoprocentní jistotou rozhodnout, k jaké formaci tyto interakce hyaluronan-micela vedou, vzhledem k jistému omezení přesnosti stanovení vzdáleností mezi donor-akceptor párem vycházející ze samotného principu měření FRET. Vyhodnoceny byly dvě nejpravděpodobnější varianty. První z nich je fúze několika micel do jedné větší, druhou možností je vytvoření tzv. struktury perlového náhrdelníku, kdy jsou na řetězci hyaluronanu formovány menší micelární agregáty.

Následující kapitola práce shrnuje poznatky získané pomocí stacionárního a časově rozlišeného měření anizotropie fluorescence perylenu a fluoresceinu, pomocí nichž byly sledovány strukturní změny micelárních systémů septonexu a CTAB po postupných přídavek hyaluronanu. S přihlédnutím na výsledky FRET u stejných systémů, získaná anizotropní data pravděpodobně podporují formaci struktury perlového náhrdelníku oproti fúzi micel do jedné větší.

Poslední kapitola výsledků pak pojednává o fotofyzikálním chování prodanu v různých prostředích, kterými jsou voda, roztok septonexu pod i nad CMC, roztok hyaluronanu a micelární roztok septonexu s hyaluronanem. Změny ve fotofyzikálním chování prodanu byly komentovány na základě rozložení (dekonvoluce) emisního spektra prodanu v daném prostředí a získaných časově rozlišených spekter. Ve vodném prostředí vykazoval prodan dvě doby života, $\tau_1 = (0,63 \pm 0,03)$ ns a $\tau_2 = (1,81 \pm 0,04)$ ns, jak bylo předpokládáno. Shodné výsledky byly získány jak pro vodný roztok hyaluronanu, tak i roztok septonexu pod CMC. Lze tedy říci, že s nejvyšší pravděpodobností mezi prodanem a hyaluronanem, stejně tak mezi prodanem a molekulami septonexu (pod CMC), nedochází k vzájemným interakcím. Při dekonvoluci emisního spektra prodanu v micelárním roztoku septonexu pak byly nalezeny tři rozdílné emisní formy prodanu – první z nich, s nejkratší dobou života emitující na modré straně spektra byla přisouzena molekulám prodanu solubilizovaných v hydrofobním jádře micel. Další emisní druh odpovídá molekulám prodanu, které jsou s vysokou pravděpodobností lokalizovány v palisádové vrstvě micel. Poslední forma prodanu, s nejdelší dobou života, jejíž emise je dominantní a posunutá do červené oblasti spektra, by měla odpovídat molekulám prodanu nacházejícím se na povrchu micelárních agregátů. Přídavek hyaluronanu do systému pak vede v krátkých časech po excitaci vzorku ke zvýraznění emise na modré straně spektra, která odpovídá molekulám prodanu emitujícím z lokálně-

excitovaného stavu. Ze získaných výsledků lze usuzovat buď na zvýšení rigidity povrchu agregátů, která omezuje intramicelární přenos náboje u molekul prodanu, jež jsou v této oblasti lokalizovány, anebo lze získané výsledky opět interpretovat na základě vzniku většího počtu menších micelárních agregátů navázaných na řetězce hyaluronanu, v nichž se molekuly prodanu mohou solubilizovat do hydrofobního prostředí, ze kterého emitují.

13 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.
- [3] NAKAJIMA, Akira. Solvent effect on the vibrational structures of the fluorescence and absorption spectra of pyrene. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1971, **44**(12), 3272-3277. DOI: 10.1246/bcsj.44.3272. ISSN 0009-2673.
- [4] DONG, Dao a Mitchell WINNIK. The Py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with E T and Y values. *Photochemistry and Photobiology*. 1982, **35**(1), 17-21. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb03805.x. ISSN 0031-8655.
- [5] WILHELM, Manfred, Cheng ZHAO, Yongcai WANG, Renliang XU, Mitchell WINNIK, Jean MURA, Gerard RIESS a Melvin CROUCHER. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules*. 1991, **24**(5), 1033-1040. DOI: 10.1021/ma00005a010. ISSN 0024-9297.
- [6] ASTAFIEVA, Irina, Xing ZHONG a Adi EISENBERG. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*. 1993, **26**(26), 7339-7352. DOI: 10.1021/ma00078a034. ISSN 0024-9297.
- [7] MOHANAMBE, L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, **110**(29), 14345-14354. DOI: 10.1021/jp061695e. ISSN 1520-6106.
- [8] GONÇALVES, Catarina, José MARTINS a Francisco GAMA. Self-Assembled Nanoparticles of Dextrin Substituted with Hexadecanethiol. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(2), 392-398. DOI: 10.1021/bm060993e. ISSN 1525-7797.
- [9] MRAVEC, Filip, Martina KLUČÁKOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Fluorescence Spectroscopy Study of Hyaluronan-Phospholipid Interactions. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. 2011, **14**(1), 235-255. DOI: 10.1016/B978-0-12-387720-8.00008-X.
- [10] BAINS, Gursharan, Arti PATEL a Vasanthi NARAYANASWAMI. Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules*. 2011, **16**(12), 7909-7935. DOI: 10.3390/molecules16097909. ISSN 1420-3049.

- [11] TOPEL, Önder, Burçin ÇAKIR, Leyla BUDAMA a Numan HODA. Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids*. 2013, **177**(1), 40-43. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.10.013. ISSN 01677322.
- [12] PIÑEIRO, Lucas, Mercedes NOVO a Wajih AL-SOUFI. Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015, **215**(1), 1-12. DOI: 10.1016/j.cis.2014.10.010. ISSN 00018686.
- [13] KALYANASUNDARAM, K. a J. THOMAS. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society*. 1977, **99**(7), 2039-2044. DOI: 10.1021/ja00449a004. ISSN 0002-7863.
- [14] DOMINGUEZ, Ana, Aurora FERNANDEZ, Noemi GONZALEZ, Emilia IGLESIAS a Luis MONTENEGRO. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*. 1997, **74**(10), 1227-1231. DOI: 10.1021/ed074p1227. ISSN 0021-9584.
- [15] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. CARNERO RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **258**(1), 116-122. DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00082-6. ISSN 00219797.
- [16] MITSIONIS, Anastasios a Tiverios VAIMAKIS. Estimation of AOT and SDS CMC in a methanol using conductometry, viscometry and pyrene fluorescence spectroscopy methods. *Chemical Physics Letters*. 2012, **547**(1), 110-113. DOI: 10.1016/j.cplett.2012.07.059. ISSN 00092614.
- [17] KHAN, Tapan a Parkson CHONG. Studies of Archaeobacterial Bipolar Tetraether Liposomes by Perylene Fluorescence. *Biophysical Journal*. 2000, **78**(3), 1390-1399. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76692-6. ISSN 00063495.
- [18] BAUMGART, Tobias, Geoff HUNT, Elaine FARKAS, Watt WEBB a Gerald FEIGENSON. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes: note II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2007, **1768**(9), 2182-2194. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.05.012. ISSN 00052736.
- [19] LAPINSKI, Monique a G.J. BLANCHARD. Interrogating the role of liposome size in mediating the dynamics of a chromophore in the acyl chain region of a phospholipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2008, **153**(2), 130-137. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.03.005. ISSN 00093084.

- [20] VAN ZANDVOORT, M., H. GERRITSEN, G. VAN GINKEL, Y. LEVINE, R. TARRONI a C. ZANNONI. Distribution of Hydrophobic Probe Molecules in Lipid Bilayers. 2. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Study of Perylene in Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997, **101**(20), 4149-4154. DOI: 10.1021/jp9634159. ISSN 1520-6106.
- [21] KOMAROMY-HILLER, Gabor a Ray VON WANDRUSZKA. Anisotropy Changes of a Fluorescent Probe during the Micellar Growth and Clouding of a Nonionic Detergent. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, **177**(1), 156-161. DOI: 10.1006/jcis.1996.0016. ISSN 00219797.
- [22] RUIZ, Cristóbal. Fluorescence Anisotropy of Probes Solubilized in Micelles of Tetradecyltrimethylammonium Bromide: Effect of Ethylene Glycol Added. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, **221**(2), 262-267. DOI: 10.1006/jcis.1999.6555. ISSN 00219797.
- [23] QUAGLIOTTO, Pierluigi, Nadia BARBERO, Claudia BAROLO, Katuscia COSTABELLO, Leonardo MARCHESE, Salvatore COLUCCIA, Kuppuswamy KALYANASUNDARAM a Guido VISCARDI. Characterization of monomeric and gemini cationic amphiphilic molecules by fluorescence intensity and anisotropy. *Dyes and Pigments*. 2009, **82**(2), 124-129. DOI: 10.1016/j.dyepig.2008.12.002. ISSN 01437208.
- [24] MCCARROLL, Matthew, Alan JOLY, Zheming WANG, Donald FRIEDRICH a Ray VON WANDRUSZKA. Time-Resolved Fluorescence Anisotropies in Mixed Surfactant Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999, **218**(1), 260-264. DOI: 10.1006/jcis.1999.6414. ISSN 00219797.
- [25] BARKLEY, Mary. Fluorescence decay studies of anisotropic rotations of small molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1981, **75**(7), 3581-. DOI: 10.1063/1.442468. ISSN 00219606.
- [26] CHRISTENSEN, Ronald, Rodney DRAKE a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence anisotropy of perylene. *The Journal of Physical Chemistry*. 1986, **90**(22), 5960-5967. DOI: 10.1021/j100280a100. ISSN 0022-3654.
- [27] PISTON, David, Timothy BILASH a Enrico GRATTON. Compartmental analysis approach to fluorescence anisotropy: perylene in viscous solvents. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, **93**(10), 3963-3967. DOI: 10.1021/j100347a019. ISSN 0022-3654.
- [28] SZUBIAKOWSKI, Jacek, Aleksander BALTER, Wiesław NOWAK, Andrzej KOWALCZYK, Krzysztof WIŚNIEWSKI a Małgorzata WIERZBOWSKA. Anisotropic reorientation of perylene and 3,9-dibromoperylene in glycerol: fluorescence anisotropy decay and quantum-mechanical study. *Chemical Physics*. 1996, **208**(2), 283-296. DOI: 10.1016/0301-0104(96)00104-8. ISSN 03010104.

- [29] SEKO, Toshihiro, Kazuhito OGURA, Yasuyuki KAWAKAMI, Hiroaki SUGINO, Hideki TOYOTAMA a Jiro TANAKA. Excimer emission of anthracene, perylene, coronene and pyrene microcrystals dispersed in water. *Chemical Physics Letters*. 1998, **291**(3-4), 438-444. DOI: 10.1016/S0009-2614(98)00629-0. ISSN 00092614.
- [30] MACGREGOR, Robert a Gregorio WEBER. Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy. *Nature*. 1986, **319**(6048), 70-73. DOI: 10.1038/319070a0. ISSN 0028-0836.
- [31] CHONG, Parkson, Sarah CAPES a Patrick WONG. Effects of hydrostatic pressure on the location of PRODAN in lipid bilayers: a FT-IR study. *Biochemistry*. 1989, **28**(21), 8358-8363. DOI: 10.1021/bi00447a014. ISSN 0006-2960.
- [32] PARASASSI, Tiziana, Ewa KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *Journal of Fluorescence*. 1998, **8**(4), 365-373. DOI: 10.1023/A:1020528716621. ISSN 10530509.
- [33] HUTTERER, Rudi, Andreas PARUSEL a Martin HOF. Solvent relaxation of prodan and patman: a useful tool for the determination of polarity and rigidity changes in membranes. *Journal of Fluorescence*. 1998, **8**(4), 389-393. DOI: 10.1023/A:1020532817530. ISSN 10530509.
- [34] KRASNOWSKA, Ewa, Luis BAGATOLLI, Enrico GRATTON a Tiziana PARASASSI. Surface properties of cholesterol-containing membranes detected by Prodan fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2001, **1511**(2), 330-340. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00286-3. ISSN 00052736.
- [35] DEMCHENKO, Alexander, Yves MÉLY, Guy DUPORTAIL a Andrey KLYMCHENKO. Monitoring Biophysical Properties of Lipid Membranes by Environment-Sensitive Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*. 2009, **96**(9), 3461-3470. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.02.012. ISSN 00063495.
- [36] SENGUPTA, Bidisa, Jayanti GUHARAY a Pradeep SENGUPTA. Characterization of the fluorescence emission properties of prodan in different reverse micellar environments. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2000, **56**(7), 1433-1441. DOI: 10.1016/S1386-1425(00)00245-6. ISSN 13861425.
- [37] NOVAIRA, Mercedes, M. BIASUTTI, Juana SILBER a N. CORREA. New Insights on the Photophysical Behavior of PRODAN in Anionic and Cationic Reverse Micelles: From Which State or States Does It Emit?. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, **111**(4), 748-759. DOI: 10.1021/jp065528q. ISSN 1520-6106.
- [38] ADHIKARY, Ramkrishna, Charles BARNES a Jacob PETRICH. Solvation Dynamics of the Fluorescent Probe PRODAN in Heterogeneous Environments: Contributions from the Locally Excited and Charge-Transferred States. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, **113**(35), 11999-12004. DOI: 10.1021/jp905139n. ISSN 1520-6106.

- [39] AGAZZI, Federico, Javier RODRIGUEZ, R. FALCONE, Juana SILBER a N. CORREA. PRODAN Dual Emission Feature To Monitor BHDC Interfacial Properties Changes with the External Organic Solvent Composition. *Langmuir*. 2013, **29**(11), 3556-3566. DOI: 10.1021/la304951f. ISSN 0743-7463.
- [40] KARUKSTIS, Kerry a James MCDONOUGH. Characterization of the Aggregates of N - Alkyl- N -methylpyrrolidinium Bromide Surfactants in Aqueous Solution. *Langmuir*. 2005, **21**(13), 5716-5721. DOI: 10.1021/la047015l. ISSN 0743-7463.
- [41] AICART, Emilio, Patricia DEL BURGO, Oscar LLORCA a Elena JUNQUERA. Electrochemical, Microscopic, and Spectroscopic Characterization of Prevesicle Nanostructures and Vesicles on Mixed Cationic Surfactant Systems. *Langmuir*. 2006, **22**(9), 4027-4036. DOI: 10.1021/la053474q. ISSN 0743-7463.
- [42] WEBER, Gregorio a Fay FARRIS. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry*. 1979, **18**(14), 3075-3078. DOI: 10.1021/bi00581a025. ISSN 0006-2960.
- [43] BECKER, W. *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. 1. New York: Springer, 2005. Springer series in chemical physics, v. 81. ISBN 978-354-0260-479.
- [44] INFELTA, P., M. GRATZEL a J. THOMAS. Luminescence decay of hydrophobic molecules solubilized in aqueous micellar systems. Kinetic model. *The Journal of Physical Chemistry*. 1974, **78**(2), 190-195. DOI: 10.1021/j100595a021. ISSN 0022-3654.
- [45] TACHIYA, Masanori. Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles. *Chemical Physics Letters*. 1975, **33**(2), 289-292. DOI: 10.1016/0009-2614(75)80158-8. ISSN 00092614.
- [46] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [47] HIEMENZ, Paul a Raj RAJAGOPALAN. *Principles of colloid and surface chemistry*. 3rd ed., rev. and expanded. Boca Raton: Taylor, 1997. ISBN 08-247-9397-8.
- [48] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. / . Hoboken, NJ: John Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [49] TEHRANI-BAGHA, Ali a Krister HOLMBERG. Solubilization of Hydrophobic Dyes in Surfactant Solutions. *Materials*. 2013, **6**(2), 580-608. DOI: 10.3390/ma6020580. ISSN 1996-1944.
- [50] MEYER, Karel a John PALMER. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*. 1934, **107**(-), 629-634.

- [51] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, **98**(8), 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. ISSN 0009-2665.
- [52] COWMAN, Mary a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(5), 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. ISSN 00086215.
- [53] SCOTT, J., C. CUMMINGS, A. BRASS a Y. CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, **274**(3), 699-705. DOI: Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A., & Chen, Y.
- [54] HASCALL, V. a T. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: *Glycoforum* [online]. Glycoforum, 1997 [cit. 2016-10-12]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [55] SCOTT, J. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. In: *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2016-10-12]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [56] LEE, Janet a Andrew SPICER. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*. 2000, **12**(5), 581-586. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00135-6. ISSN 09550674.
- [57] SCHMIDT, Karl-Hermann, Elisabeth GÜNTHER a Harry COURTNEY. Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos. *Medical Microbiology and Immunology*. 1996, **184**(4), 169-173. DOI: 10.1007/BF02456131. ISSN 0300-8584.
- [58] DEANGELIS, P. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 1999, **56**(7-8), 670-682. DOI: 10.1007/s000180050461. ISSN 1420-682x.
- [59] TOOLE, Bryan. Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in Cell*. 2001, **12**(2), 79-87. DOI: 10.1006/scdb.2000.0244. ISSN 10849521.
- [60] REHM, Bernd. *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Wymondham: Caister Academic, 2009. ISBN 19-044-5536-0.
- [61] STERN, Robert. *Hyaluronan in Cancer Biology*. 1st ed. Burlington: Elsevier, 2009. ISBN 978-008-0921-082.
- [62] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, **93**(4), 1478-1483. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654.

- [63] THALBERG, Kyrre. a Bjoern. LINDMAN. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*. 1991, **7**(2), 277-283. DOI: 10.1021/la00050a013. ISSN 0743-7463.
- [64] 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, **94**(10), 4289-4295. DOI: 10.1021/j100373a075. ISSN 0022-3654.
- [65] THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, **95**(15), 6004-6011. DOI: 10.1021/j100168a053. ISSN 0022-3654.
- [66] THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, **95**(8), 3370-3376. DOI: 10.1021/j100161a073. ISSN 0022-3654.
- [67] THALBERG, Kyrre, Jan VAN STAM, Cecilia LINDBLAD, Mats ALMGREN a Bjoern LINDMAN. Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, **95**(22), 8975-8982. DOI: 10.1021/j100175a101. ISSN 0022-3654.
- [68] HERSLOEF, Aasa, Lars SUNDELOEF a Katarina EDSMAN. Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, **96**(5), 2345-2348. DOI: 10.1021/j100184a061. ISSN 0022-3654.
- [69] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, **391**(1-3), 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757.
- [70] MONDEK, Jakub a Miloslav PEKAŘ. The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration. *Carbohydrate Polymers*. 2015, **129**(1), 168-174. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.060. ISSN 01448617.
- [71] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, **30**(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463.

- [72] PILGROVÁ, Tereza, Tereza VENEROVÁ, Filip MRAVEC a Miloslav PEKAŘ. Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **112**, 241-249. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.176. ISSN 01418130.
- [73] HANSSON, Per, Bengt JÖNSSON, Cecilia STRÖM a Olle SÖDERMAN. Determination of Micellar Aggregation Numbers in Dilute Surfactant Systems with the Fluorescence Quenching Method. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2000, **104**(15), 3496-3506. DOI: 10.1021/jp992444r. ISSN 1520-6106.
- [74] FRINDI, M., B. MICHELS a R. ZANA. Ultrasonic absorption studies of surfactant exchange between micelles and bulk phase in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants with a short alkyl chain. 3. Surfactants with a sugar head group. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, **96**(20), 8137-8141. DOI: 10.1021/j100199a058. ISSN 0022-3654.
- [75] REGEV, Oren a Raoul ZANA. Aggregation Behavior of Tyloxapol, a Nonionic Surfactant Oligomer, in Aqueous Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999, **210**(1), 8-17. DOI: 10.1006/jcis.1998.5776. ISSN 00219797.
- [76] RAY, G., I. CHAKRABORTY, S. GHOSH, S. MOULIK a R. PALEPU. Self-Aggregation of Alkyltrimethylammonium Bromides (C 10 -, C 12 -, C 14 -, and C 16 TAB) and Their Binary Mixtures in Aqueous Medium: A Critical and Comprehensive Assessment of Interfacial Behavior and Bulk Properties with Reference to Two Types of Micelle Formation. *Langmuir*. 2005, **21**(24), 10958-10967. DOI: 10.1021/la051509g. ISSN 0743-7463.
- [77] DAR, Aijaz, Ashesh GARAI, Akhil DAS a Soumen GHOSH. Rheological and Fluorescence Investigation of Interaction between Hexadecyltrimethylammonium Bromide and Methylcellulose in the Presence of Hydrophobic Salts. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2010, **114**(15), 5083-5091. DOI: 10.1021/jp911545j. ISSN 1089-5639.
- [78] ZANA, R., W. BINANA-LIMBELE, N. KAMENKA a B. LINDMAN. Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-cationic surfactant interactions: electrical conductivity, self-diffusion and time-resolved fluorescence quenching investigations. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, **96**(13), 5461-5465. DOI: 10.1021/j100192a050. ISSN 0022-3654.
- [79] ZANA, Raoul, Jörn FRASCH, Michel SOULARD, Bénédicte LEBEAU a Joël PATARIN. Fluorescence Probing Investigations of the Mechanism of Formation of Organized Mesoporous Silica. *Langmuir*. 1999, **15**(8), 2603-2606. DOI: 10.1021/la981603f. ISSN 0743-7463.

- [80] VETHAMUTHU, Martin, Mats ALMGREN, Emad MUKHTAR a Pratap BAHADUR. Fluorescence quenching studies of the aggregation behavior of the mixed micelles of bile salts and cetyltrimethylammonium halides. *Langmuir*. 1992, **8**(10), 2396-2404. DOI: 10.1021/la00046a010. ISSN 0743-7463.
- [81] LI, W., Y.-C. HAN, J.-L. ZHANG a B.-G. WANG. Effect of ethanol on the aggregation properties of cetyltrimethylammonium bromide surfactant. *Colloid Journal*. 2005, **67**(2), 159-163. DOI: 10.1007/s10595-005-0075-7. ISSN 1061-933X.
- [82] ALARGOVA, R., I. KOCHIJASHKY, M. SIERRA a R. ZANA. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir*. 1998, **14**(19), 5412-5418. DOI: 10.1021/la980565x. ISSN 0743-7463.
- [83] AGUIAR, J, J. MOLINA-BOLÍVAR, J. PEULA-GARCÍA a C. CARNERO RUIZ. Thermodynamics and Micellar Properties of Tetradecyltrimethylammonium Bromide in Formamide–Water Mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002, **255**(2), 382-390. DOI: 10.1006/jcis.2002.8678. ISSN 00219797.
- [84] KOMAROMY-HILLER, Gabor a Ray VON WANDRUSZKA. Anisotropy Changes of a Fluorescent Probe during the Micellar Growth and Clouding of a Nonionic Detergent. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, **177**(1), 156-161. DOI: 10.1006/jcis.1996.0016. ISSN 00219797.
- [85] NICHIFOR, Marieta, Sonia LOPES, Margarida BASTOS a Antonio LOPES. Self-Aggregation of Amphiphilic Cationic Polyelectrolytes Based on Polysaccharides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, **108**(42), 16463-16472. DOI: 10.1021/jp047267v. ISSN 1520-6106.
- [86] SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intramolecular energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence*. 1996, **69**(4), 179-186. DOI: 10.1016/S0022-2313(96)00116-0. ISSN 00222313.
- [87] AYDIN, B, M ACAR, M ARIK a Y ONGANER. The fluorescence resonance energy transfer between dye compounds in micellar media. *Dyes and Pigments*. 2009, **81**(2), 156-160. DOI: 10.1016/j.dyepig.2008.10.002. ISSN 01437208.
- [88] KARUKSTIS, Kerry, April FRAZIER, D. MARTULA a Jennifer WHILES. Characterization of the Microenvironments in AOT Reverse Micelles Using Multidimensional Spectral Analysis. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, **100**(26), 11133-11138. DOI: 10.1021/jp9609949. ISSN 0022-3654.
- [89] LISSI, E., E. ABUIN, M. RUBIO a A. CERÓN. Fluorescence of Prodan and Laurdan in AOT/Heptane/Water Microemulsions: Partitioning of the Probes and Characterization of Microenvironments †. *Langmuir*. 2000, **16**(1), 178-181. DOI: 10.1021/la990720n. ISSN 0743-7463.

- [90] FUGUET, Elisabet, Clara RàFOLS, Martí ROSÉS a Elisabeth BOSCH. Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **548**(1-2), 95-100. DOI: 10.1016/j.aca.2005.05.069. ISSN 00032670.
- [91] MODARESSI, Ali, Hocine SIFAUI, Beata GRZESIAK, Roland SOLIMANDO, Urszula DOMANSKA a Marek ROGALSKI. CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, **296**(1-3), 104-108. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.09.031. ISSN 09277757.
- [92] OREMUSOVÁ, Jarmila, Zuzana VITKOVÁ a Petra HERDOVÁ. Influence of Alcohols on Micellar and Release Balances of Cationic Surfactant – Carbethopendecinium Bromide (Septonex). *Tenside Surfactants Detergents*. 2014, **51**(4), 339-347. DOI: 10.3139/113.110316. ISSN 0932-3414.
- [93] BHATTACHARYA, Subhash, Hari DAS a Satya MOULIK. Quenching of fluorescence of 2-anthracene sulphonate by cetylpyridinium chloride in micellar solutions of Tweens, Triton X-100, sodium dodecylsulphate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1993, **71**(3), 257-262. DOI: 10.1016/1010-6030(93)85007-U. ISSN 10106030.
- [94] MOULIK, Satya, Md. HAQUE, Pijush JANA a Akhil DAS. Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, **100**(2), 701-708. DOI: 10.1021/jp9506494. ISSN 0022-3654.
- [95] VEQUI-SUPLICY, Cíntia, Kaline COUTINHO a M. TERESA LAMY. Optical characterization of Prodan aggregates in water medium. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013, **15**(28), 11800-. DOI: 10.1039/c3cp51776d. ISSN 1463-9076.

14 PŘEHLED ZKRATEK A SYMBOLŮ

14.1 Zkratky

A	akceptor
ADC	analogově-digitální převodník (<i>analog-to-digital convertor</i>)
AO	akridinová oranž
AOT	1,4-bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný
CAC	kritická agregační koncentrace
CFD	diskriminátor konstantní funkce (<i>constant function discriminator</i>)
CMC	kritická micelární koncentrace
C_n MPB	<i>N</i> -alkyl- <i>N</i> -methylpyrrolidinium bromid s n počtem uhlíků v alkylovém řetězci
CPC	cetylpyridinium chlorid
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
C_n TAB	alkyltrimethylamonium bromid s n počtem uhlíků v alkylovém řetězci
D	donor
DA	donor-akceptorový pár
DPB	1,6-difenylbuta-1,3-dien
DTAB	dodecyltrimethylamonium bromid
EG	ethylen glykol
EmPI	emisní polaritní index pyrenu
Ex:Mo	poměr intenzity fluorescence excimeru a monomeru pyrenu
ExPI	excitační polaritní index pyrenu
EmPI	emisní polaritní index pyrenu
fluo	fluorescein
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
HAS1, HAS2, HAS3	hyaluronansyntázy
HH	horizontálně-horizontálně (orientace polarizátorů)
HV	horizontálně-vertikálně (orientace polarizátorů)
hya	hyaluronan
IC	vnitřní konverze

ICS	mezisystémový přechod
ICT	intramolekulární přenos náboje
LE	lokálně excitovaný stav
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
NMR	nukleární magnetická rezonance
nr	nezářivý přechod
O/V	emulze olej ve vodě
per	perylen
PGA	programovatelný zesilovač (<i>programmable gain amplifier</i>)
PSS	polystyrensulfonát
r	zářivý přechod
S	singlet
SDS	dodecylsírán sodný
SPTX	septonex
SSFQ	stacionární zhášení fluorescence (<i>steady-state fluorescence quenching</i>)
T	triplet
TAC	převodník času na amplitudu (<i>time-to-amplitude convertor</i>)
TCSPC	metoda časově korelovaného čítání fotonů (<i>time-correlated single photon counting</i>)
TNS	2-(p-toluidinno)naftalen-6-sulfonát
TRES	časově rozlišená fluorescenční spektra (<i>time-resolved emission spectra</i>)
TRFQ	časově rozlišené zhášení fluorescence (<i>time-resolved fluorescence quenching</i>)
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
VH	vertikálně-horizontálně (orientace polarizátorů)
VV	vertikálně-vertikálně (orientace polarizátorů)
WD	diskriminátor (<i>window discriminator</i>)

14.2 Symbols

A	korekční faktor pozadí (vyhodnocení TCSPC měření)
A_{exc}	absorbance vzorku při excitační vlnové délce
A_1	horní limita Boltzmannovy funkce
A_2	dolní limita Boltzmannovy funkce
A_λ	absorbance při dané emisní vlnové délce
b_i	normalizovaná amplituda (TCSPC měření)
B_i	před-exponenciální faktor (amplituda, vyhodnocení TCSPC měření)
c	koncentrace
C	počet molekul zhášedce na micelu (vyhodnocení agregačního čísla)
E	efektivita Försterova přenosu energie
f_i	frakční intenzita fluorescence (viz kap. 2.5.1.) nebo frakční (relativní) amplituda (viz kap. 5.4.2)
$G(\lambda_{\text{em}})$	G-faktor pro danou emisní vlnovou délku
I	intenzita fluorescence v daném případě
i_{F}	intenzita fluorescence
I_{SS}	intenzita stacionární fluorescence
I_{T}	totální intenzita fluorescence
I_0	intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášedce v systému
$i(t)$	totální časově rozlišená intenzita fluorescence
$I_{\lambda, \text{kor.}}$	korigovaná intenzita fluorescence pro danou vlnovou délku
I_{\parallel}	intenzita fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
I_{\perp}	intenzita fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
$i_{\parallel}(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
$i_{\perp}(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
J	integrál spektrálního překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru
K_{eq}	rovnovážná konstanta statického zhášení
k_{nr}^{S}	rychlostní konstanta nezářivého přechodu ze stavu S_1 do stavu S_0
K_{P}	Perrinova konstanta
k_{q}	rychlostní konstanta bimolekulárního zhášení
K_{q}	rovnovážná konstanta dynamického zhášení

k_{rS}	rychlostní konstanta zářivého přechodu ze stavu S_1 do stavu S_0
K_{SV}	Stern-Volmerova konstanta
n	index lomu nebo počet molekul
N_A	Avogadrova konstanta
N_{ag}	agregační číslo micely
N_{DA}	vázaná frakce
$\langle p \rangle$	polarizační stupeň
P_n^S	pravděpodobnost, že micela obsahuje n solubilizovaných molekul S
r	anizotropie fluorescence
$\langle r \rangle$	průměrná, resp. stacionární anizotropie fluorescence
r_{DA}	vzdálenost mezi donorem a akceptorem
R_S	poloměr efektivní sféry
r_0	fundamentální anizotropie
R_0	Försterův poloměr
R^2	koeficient spolehlivosti
r_∞	limitní anizotropie
$r(t)$	okamžitá, resp. časově rozlišená hodnota anizotropie fluorescence
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
t	čas
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
V_P	objem efektivní sféry
x_{CMC1}	kritická micelární koncentrace odpovídající inflexnímu bodu Boltzmannovy funkce
x_{CMC2}	kritická micelární koncentrace odpovídající bodu $x_0 + 2\Delta x$
x_0	inflexní bod
α_j	amplituda odpovídající době života excitovaného stavu τ_j
β	úhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly
Δx	strmost poklesu Boltzmannovy funkce
ϵ	molární absorpční koeficient

θ	úhel mezi dipólovým momentem přechodu molekuly a rovinou polarizace excitujícího záření
κ	orientační faktor přechodových momentů donoru a akceptoru
λ_{em}	emisní vlnová délka
λ_{exc}	excitační vlnová délka
λ_{max}	vlnová délka maximální emise
τ	průměrná doba života
τ_i	doba života i -té složky směsi
τ_r	zářivá doba života (kap. 2.1.2), rotační korelační čas (kap. 10)
τ_s	doba života excitovaného stavu S_1
ϕ_F	kvantový výtěžek fluoroforu
χ^2	parametr správnosti proložení TCSPC dat
*	excitovaný stav
[]	koncentrace

15 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

15.1 Článek v impaktovaném časopise (Příloha 2)

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Fluorescence study of aggregation behavior of cationic surfactant carbethopendecinium bromide and its comparison with cetyltrimethylammonium bromide. *Scientific Reports*. 2018. (v redakčním řízení)

15.2 Mezinárodní konference

15.2.1 Příspěvek indexovaný v databázi Web of Science (Příloha 3)

HOLÍNKOVÁ, P.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Fluorescence study of microviscosity of hyaluronan hydrogels containing hydrophobic nanodomains during fourteen days of ageing. In *NANOCON 2015 Conference Proceedings*. Ostrava: Tanger Ltd., 2015. p. 408-412. ISBN: 978-80-87294-63-5.

15.2.2 Příspěvky

HOLÍNKOVÁ, P.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Hydrophobic nanodomains in hyaluronan-surfactant system: a fluorescence anisotropy study. In *NANOCON 2016 Conference Proceedings*. 1st edition, 2017. Ostrava: TANGER Ltd., 2016. p. 444-448. ISBN: 978-80-87294-71-0.

15.2.3 Abstrakty

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Fluorescence anisotropy study of microstructural changes of hyaluronan-cetyltrimethylammonium bromide hydrogel. 20th European Symposium on Polymer Spectroscopy ESOPS 20. Dresden, Germany: Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V., 2016. p. 65-65. ISBN: 978-3-9816007-4-2.

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Fluorescence study of photophysical behaviour of Prodan in different solutions. The 15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence, Abstracts. 1. Leuven, Belgium: Department of Chemistry, Faculty of Science, KU Leuven, Belgium, 2017. p. 260-260.

15.2.4 Postery

7th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (Nanocon 2015, Brno, Česká republika)

20th European Symposium on Polymer Spectroscopy (ESOPS 2016, Drážďany, Německo)

8th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (Nanocon 2016, Brno, Česká republika)

15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF 2017, Bruggy, Belgie)

15.3 Studentské konference

15.3.1 Příspěvky

HOLÍNKOVÁ, P.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Hyaluronan-cetyltrimethylammonium bromide interactions in aqueous and physiological solution studied by fluorescence techniques. In *Chemie je život 2014 - Sborník příspěvků*. 1. Brno: 2014. p. 229-234. ISBN: 978-80-214-5078-3.

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Fluorescence study of effect of hyaluronan addition to micelle solution of cetyltrimethylammonium bromide. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2015, Sborník příspěvků*. první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2015. p. 244-250. ISBN: 978-80-214-5290-9.

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Fluorescence probe study of interactions between cationic micelles and negatively charged polyelectrolyte. In *XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists*. Brno: Masaryk University, 2016. p. 154-156. ISBN: 978-80-210-8267-0.

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Time-resolved fluorescence of Prodan in micellar solution of cetyltrimethylammonium bromide. In *Sborník příspěvků*, 23.3.2017, *Studentská konference Chemie je život*. první, 2017. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2017. p. 153-157. ISBN: 978-80-214-5489-7.

15.3.2 Abstrakty

HOLÍNKOVÁ, P.; PEKAŘ, M. Aggregation behaviour of hyaluronan-cationic surfactant system studied by fluorescent hydrophobic probes. *Book of abstracts*. Brno: Masaryk University, 2017. p. 57-57. ISBN: 978-80-210-8580-0.

15.3.3 Přednášky

Studentská odborná konference Chemie je život 2014 (Brno, Česká republika)

Studentská odborná konference Chemie je život 2015 (Brno, Česká republika)

Studentská odborná konference Chemie je život 2017 (Brno, Česká republika)

15.3.4 Postery

XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists (2016, Brno, Česká republika)

XVII. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists (2017, Brno, Česká republika)

16 PŘÍLOHY

16.1 Obsazenost micel fluorofory – Poissonova statistika (ke kapitole 9)

Tab. P1: Pravděpodobnost obsazení micely CTAB molekulami fluoresceinu nebo peryleny.

CTAB ($c_{\text{CTAB}} = 2 \text{ mM}$, $N_{\text{ag}} = 35$, $c_{\text{CMC}} = 0,938 \text{ mM}$)								
$c_{\text{fluo}}; \mu\text{M}$	$\frac{[\text{fluo}]}{[\text{micely}]}$	P_1^F	P_2^F	P_3^F	P_4^F	P_5^F	P_0^F	$(1 - P_0^F)$
5	0,159	0,140	0,012	0,001	0,000	0,000	0,848	0,152
10	0,318	0,237	0,039	0,004	0,000	0,000	0,719	0,281
15	0,477	0,302	0,075	0,012	0,002	0,000	0,610	0,390
20	0,636	0,341	0,112	0,025	0,004	0,001	0,517	0,483
25	0,794	0,361	0,149	0,041	0,008	0,001	0,439	0,561
30	0,953	0,368	0,182	0,060	0,015	0,003	0,372	0,628
35	1,112	0,364	0,210	0,081	0,023	0,005	0,316	0,684
40	1,271	0,353	0,233	0,102	0,034	0,009	0,268	0,732
45	1,430	0,337	0,250	0,123	0,046	0,014	0,227	0,773
50	1,589	0,317	0,261	0,144	0,059	0,019	0,192	0,808
$c_{\text{per}}; \mu\text{M}$	$\frac{[\text{fluo}]}{[\text{micely}]}$	P_1^P	P_2^P	P_3^P	P_4^P	P_5^P	P_0^P	$(1 - P_0^P)$
1	0,033	0,032	0,001	-	-	-	0,967	0,033
CTAB ($c_{\text{CTAB}} = 2 \text{ mM}$, $N_{\text{ag}} = 63$, $c_{\text{CMC}} = 0,938 \text{ mM}$)								
$c_{\text{fluo}}; \mu\text{M}$	$\frac{[\text{fluo}]}{[\text{micely}]}$	P_1^F	P_2^F	P_3^F	P_4^F	P_5^F	P_0^F	$(1 - P_0^F)$
5	0,290	0,220	0,033	0,003	0,000	0,000	0,743	0,257
10	0,579	0,328	0,097	0,019	0,003	0,000	0,553	0,447
15	0,869	0,365	0,163	0,048	0,011	0,002	0,411	0,589
20	1,159	0,362	0,215	0,085	0,025	0,006	0,305	0,695
25	1,449	0,337	0,250	0,123	0,046	0,014	0,227	0,773
30	1,738	0,300	0,267	0,158	0,071	0,025	0,169	0,831
35	2,028	0,260	0,270	0,187	0,097	0,040	0,125	0,875
40	2,318	0,221	0,262	0,208	0,123	0,058	0,093	0,907
45	2,607	0,185	0,247	0,220	0,147	0,078	0,069	0,931
50	2,897	0,153	0,227	0,224	0,166	0,099	0,052	0,948
$c_{\text{per}}; \mu\text{M}$	$\frac{[\text{fluo}]}{[\text{micely}]}$	P_1^P	P_2^P	P_3^P	P_4^P	P_5^P	P_0^P	$(1 - P_0^P)$
1	0,059	0,056	0,002	-	-	-	0,942	0,058

Tab. P2: Pravděpodobnost obsazení micely CTAB alespoň jednou molekulou fluoresceinu zároveň s alespoň jednou molekulou peryleny.

$c_{\text{fluo}}; \mu\text{M}$	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
$P^P \cdot P^F$	0,005	0,009	0,013	0,016	0,018	0,020	0,022	0,024	0,025	0,026
$P^P \cdot P^F$	0,015	0,026	0,034	0,040	0,045	0,048	0,050	0,052	0,054	0,055

Tab. P3: Pravděpodobnost obsazení micely septonexu molekulami fluoresceinu nebo perylenu.

Septonex ($c_{SPTX} = 2 \text{ mM}$, $N_{ag} = 29$, $c_{CMC} = 0,833 \text{ mM}$)								
$c_{fluo}; \mu\text{M}$	$\frac{[fluo]}{[micely]}$	P_1^F	P_2^F	P_3^F	P_4^F	P_5^F	P_0^F	$(1 - P_0^F)$
5	0,025	0,110	0,007	0,000	0,000	0,000	0,883	0,117
10	0,124	0,194	0,024	0,002	0,000	0,000	0,780	0,220
15	0,249	0,257	0,048	0,006	0,001	0,000	0,689	0,311
20	0,373	0,302	0,075	0,012	0,002	0,000	0,608	0,392
25	0,497	0,334	0,104	0,021	0,003	0,000	0,537	0,463
30	0,621	0,354	0,132	0,033	0,006	0,001	0,474	0,526
35	0,746	0,364	0,159	0,046	0,010	0,002	0,419	0,581
40	0,870	0,368	0,183	0,061	0,015	0,003	0,370	0,630
45	0,994	0,366	0,204	0,076	0,021	0,005	0,327	0,673
50	1,118	0,359	0,223	0,092	0,029	0,007	0,289	0,711
$c_{per}; \mu\text{M}$	$\frac{[fluo]}{[micely]}$	P_1^P	P_2^P	P_3^P	P_4^P	P_5^P	P_0^P	$(1 - P_0^P)$
1	0,025	0,025	-	-	-	-	0,975	0,025
Septonex ($c_{SPTX} = 2 \text{ mM}$, $N_{ag} = 45$, $c_{CMC} = 0,833 \text{ mM}$)								
$c_{fluo}; \mu\text{M}$	$\frac{[fluo]}{[micely]}$	P_1^F	P_2^F	P_3^F	P_4^F	P_5^F	P_0^F	$(1 - P_0^F)$
5	0,193	0,159	0,015	0,001	0,000	0,000	0,825	0,175
10	0,386	0,262	0,051	0,006	0,001	0,000	0,680	0,320
15	0,578	0,324	0,094	0,018	0,003	0,000	0,561	0,439
20	0,771	0,357	0,138	0,035	0,007	0,001	0,462	0,538
25	0,964	0,368	0,177	0,057	0,014	0,003	0,381	0,619
30	1,157	0,364	0,210	0,081	0,023	0,005	0,314	0,686
35	1,350	0,350	0,236	0,106	0,036	0,010	0,259	0,741
40	1,542	0,330	0,254	0,131	0,050	0,016	0,214	0,786
45	1,735	0,306	0,266	0,154	0,067	0,023	0,176	0,824
50	1,928	0,280	0,270	0,174	0,084	0,032	0,145	0,855
$c_{per}; \mu\text{M}$	$\frac{[fluo]}{[micely]}$	P_1^P	P_2^P	P_3^P	P_4^P	P_5^P	P_0^P	$(1 - P_0^P)$
1	0,039	0,037	0,001	-	-	-	0,962	0,038

Tab. P4: Pravděpodobnost obsazení micely septonexu alespoň jednou molekulou fluoresceinu zároveň s alespoň jednou molekulou perylenu.

$c_{fluo}; \mu\text{M}$	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
$P^P \cdot P^F$	0,003	0,005	0,008	0,010	0,011	0,013	0,014	0,015	0,016	0,017
$P^P \cdot P^F$	0,007	0,012	0,017	0,020	0,023	0,026	0,028	0,030	0,031	0,032

16.2 Manuskript článku pro impaktovaný časopis Scientific Reports

Fluorescence Study of Aggregation Behavior of Cationic Surfactant Carbethopendecinium Bromide and Its Comparison With Cetyltrimethylammonium Bromide

Petra Holínková¹, Miloslav Pekař^{1*}

¹Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, Brno 612 00, Czech Republic

*pekar@fch.vut.cz

Abstract

The aggregation behaviour of the cationic surfactant carbethopendecinium bromide (Septonex) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in aqueous solution was investigated by steady-state and time-resolved fluorescence experiments. Values of critical micelle concentration were obtained from the pyrene emission polarity index. The micellar aggregation numbers for four different concentrations of both surfactants were determined by steady-state and time-resolved fluorescence quenching methods, using pyrene as a probe and cetylpyridinium chloride as a quencher. The obtained results for Septonex were compared with the aggregation parameters of CTAB. Also, the concentration dependence of the micelle aggregation number was analyzed.

Keywords

Septonex, CTAB, critical micelle concentration, aggregation number, pyrene emission polarity index

Introduction

Carbethopendecinium bromide (produced also under the trade name Septonex) is a quaternary ammonium surfactant. It is approved for pharmaceutical applications and used in several antiseptic and disinfectant products as an active substance. From the structural point of view, cf. Fig. 1a, Septonex is related to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and tetradecyltrimethylammonium bromide. However, in comparison to its structural relatives, there is less information in literature on the aggregation behavior of Septonex despite of its relevance for pharmaceutical products. CTAB (Fig. 1b) was also used in this study to evaluate the effect of small changes in surfactant structure on its basic properties.

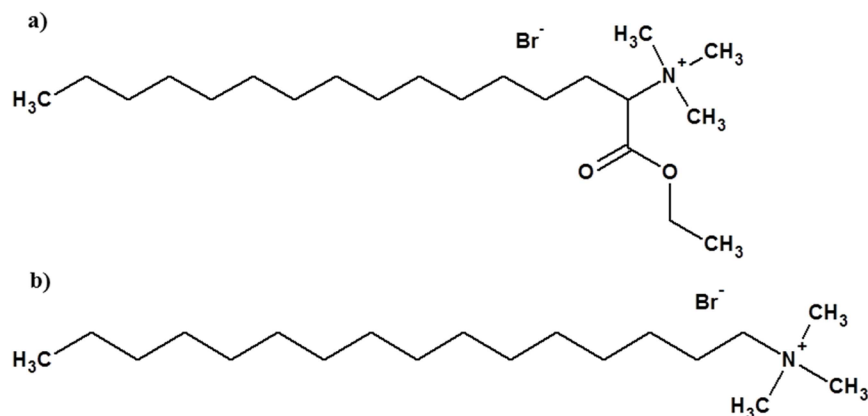


Fig. 1: Structure of a) Septonex and b) CTAB.

Greksáková¹ et al. determined the Septonex critical micelle concentration by UV spectrophotometry, while Čermáková² et al. employed surface tension measurement using the method of maximum bubble pressure. The temperature effect on the Septonex critical micelle concentration was studied by Oremusová³ et al. in the range 15-50 °C. The critical micelle concentration was found to increase slightly with temperature. A similar temperature-effect study was published by Vojteková⁴ et al., who also investigated the effect of various potassium salts. As expected, the Septonex critical micelle concentration decreased in the presence of these electrolytes. Septonex was also mentioned in a study which examined the relationships between the structure, lipophilicity, and antimicrobial activity of quaternary ammonium bolaamphiphiles⁵. It was used as a reference substance only and only its minimum inhibition concentrations towards three types of microorganisms were reported.

In general, surfactants in aqueous solution self-associate into micelles above the critical micelle concentration (CMC) which is one of several important parameters of surfactant aggregation behaviour. Another important parameter is the aggregation number (N_{ag}), which corresponds to the number of surfactant monomers per micelle. There is no information on the aggregation number for Septonex micelles although this number belongs to basic characteristics of any surfactant.

Both of these micellar aggregation parameters can be studied by fluorescence probe methods. Pyrene is very often used to study the aggregation behaviour of surfactants.^{6,7,8,9,10,11,12,13,14,15} Its molecule is highly hydrophobic and only slightly soluble in pure water. The emission spectrum of pyrene shows characteristic vibronic bands around 370–400 nm, whose absolute and relative intensities, width, and position depend sensitively on the polarity of its microenvironment. The ratio of the fluorescence intensities of the first and third vibronic bands (emission polarity index EmPI, pyrene 1:3 ratio, I_I/I_{III}) increases with the increasing polarity of the pyrene vicinity⁹. It is well known that plots of the pyrene emission polarity index as a function of the total surfactant concentration around CMC show a typical sigmoidal decrease¹⁰. Below the CMC the values of EmPI correspond to the polar environment. With an increasing concentration of surfactant, the values of EmPI decrease, indicating that the pyrene molecules sense a more hydrophobic environment. Above the CMC, the pyrene molecules are

incorporated in the hydrophobic region of the micellar aggregate and the EmPI values are low and roughly constant.

Zana et al. considered two approaches for obtaining CMC values from pyrene emission spectra^{16,17}. According to the first approach, the CMC can be obtained from the inflection point of EmPI plots. According to the second option, the CMC can be obtained from the interception of the rapidly varying parts and nearly horizontal parts of EmPI plots at high surfactant concentrations. Subsequently, Aguiar et al. proposed a straightforward procedure to determine these two points (x_{CMC1} and x_{CMC2})¹⁰. The EmPI plots can be adequately described by a decreasing sigmoid of the Boltzmann type:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (1)$$

where the variable y corresponds to the EmPI value, the independent variable x is the total concentration of surfactant, A_1 and A_2 are the upper and lower limits of the sigmoid, respectively, x_0 is the inflection point of the sigmoid, and Δx is directly related to the independent variable range where the abrupt change in the dependent variable occurs. Thus, the point x_{CMC1} corresponds to the inflection point of the sigmoid and the point x_{CMC2} can be calculated as:

$$x_{\text{CMC2}} = x_0 + 2\Delta x. \quad (2)$$

Aguiar¹⁰ et al. established a criterion to choose between the x_{CMC1} and x_{CMC2} values. When the ratio $x_0/\Delta x$ is higher than 10 (typically for ionic surfactant), then the x_{CMC2} value is more accurate than the x_{CMC1} .

The aggregation number can be determined using fluorescence quenching techniques^{6,11,12,13,14,18,19,20,21}. In steady-state fluorescence quenching (SSFQ) experiments the investigated micellar system is continuously illuminated and the spectrum of the emitted light is recorded, this spectrum carrying the information about the properties of this system²¹. If we assume only dynamic quenching and consider the simplest situation, which means an immobile probe and quencher (the residence times for the probe and quencher in a micelle are much longer than the fluorescence lifetime of the probe), and we use a fluorescence probe concentration much smaller than the micelle concentration [micelles], increasing the quencher concentration [Q] such that the ratio [Q]/[micelles] varies between 0–2, then the ratio of the fluorescence intensities measured in the absence and in the presence of the quencher (F_0 and F_Q , respectively) is given by the equation²¹

$$\frac{F_0}{F_Q} = \exp\left(\frac{[Q]}{[\text{micelles}]}\right). \quad (3)$$

The main conditions assumed in deriving eq. 3 are that (i) the kinetic ratio of the rate constant for intramicellar quenching k_q and the rate constant for intramicellar probe fluorescence decay k must be far higher than 1 and (ii) the distribution of probes and quenchers between micelles obey Poisson's statistics. Then, the plot of $\ln(F_0/F_Q)$ against [Q] at constant surfactant concentration [S] permits the determination of the micelle aggregation number $N_{\text{ag,SS}}$ from²¹

$$N_{\text{ag,ss}} = \frac{[S] - [\text{CMC}]}{[\text{micelles}]}, \quad (4)$$

In time-resolved fluorescence quenching (TRFQ) experiments, the probe is excited by a very short pulse of light. Then the fluorescence decay is recorded using a TCSPC (time-correlated single photon counting) apparatus. Ideally in the absence of quencher the fluorescence decay of the probe is single exponential. In the presence of quencher the decay curves are no longer single exponential and obey the equation^{22,23}:

$$F(t) = F(0) \exp \left\{ -\frac{t}{\tau_0} - C[1 - \exp(-k_Q t)] \right\}, \quad (5)$$

where $F(t)$ and $F(0)$ are the fluorescence intensities at time t and zero following excitation, τ_0 is the probe lifetime in the micellar environment without quencher, k_Q is the rate constant for quenching, and C corresponds to the ratio $[Q]/[\text{micelles}]$. If experiments are performed correctly, the value of the aggregation number can be obtained from²¹

$$N_{\text{ag,TR}} = C \frac{[S] - [\text{CMC}]}{[Q]}. \quad (6)$$

Generally, steady-state measurement is much easier to perform and to analyse than measurement using the time-resolved method; however, steady-state measurement is based on more restrictive assumptions²¹.

In this paper we studied the aggregation behaviour of Septonex and CTAB, i.e. their critical micelle concentrations and aggregation numbers, by means of steady-state and time resolved fluorescence measurements with a pyrene fluorescent probe and compared the results for these two compounds.

Results and discussion

Determination of critical micelle concentration

The values of CMC for Septonex and CTAB were evaluated on the basis of the dependence of the pyrene emission polarity index EmPI on surfactant concentration. From Fig. 2 it seems obvious that EmPI data for both surfactants are well fitted by a Boltzmann-type sigmoid. Table 1 presents the fitting parameters for the studied systems, including the regression-square coefficient (r^2) and the CMCs obtained from literature.

As already mentioned, there are two options for determining the CMC value – the use of x_{CMC1} and the use of x_{CMC2} . Because the ratio $x_0/\Delta x$ was greater than 10 for both surfactants, we decided to consider x_{CMC2} as the critical micellar concentration for further use. In addition, x_{CMC2} values were closer to the CMC values published in literature than x_{CMC1} values. Also the determined CMC value of Septonex is in good agreement with the results of other authors. The CMC of Septonex is slightly lower than that of CTAB, although Septonex has a shorter alkyl chain which should generally increase the CMC value. The lower CMC value of Septonex than CTAB is thus caused by the bulkier polar head group of Septonex, which probably reduces the repulsion of the identical charges of ammonium groups.

Table 1: Fitting parameters of pyrene EmPI data to Eq. (1) for the investigated surfactants. x_0 is the centre of the sigmoid, Δx is a time constant, r^2 is the regression-square coefficient, and CMC is the value of the critical micelle concentration from literature.

Surfactant	Δx	r^2	$x_0 = x_{\text{CMC1}}/\text{mmol dm}^{-3}$	$x_{\text{CMC2}}/\text{mmol dm}^{-3}$	CMC/ mmol dm^{-3}
Septonex	0.037	0.9940	0.759	0.833	0.77 ¹ , 0.79 ² , 0.81 ^{3,24}
CTAB	0.046	0.9960	0.845	0.938	0.91 ²⁵ , 0.92 ¹¹ , 0.97 ²⁶

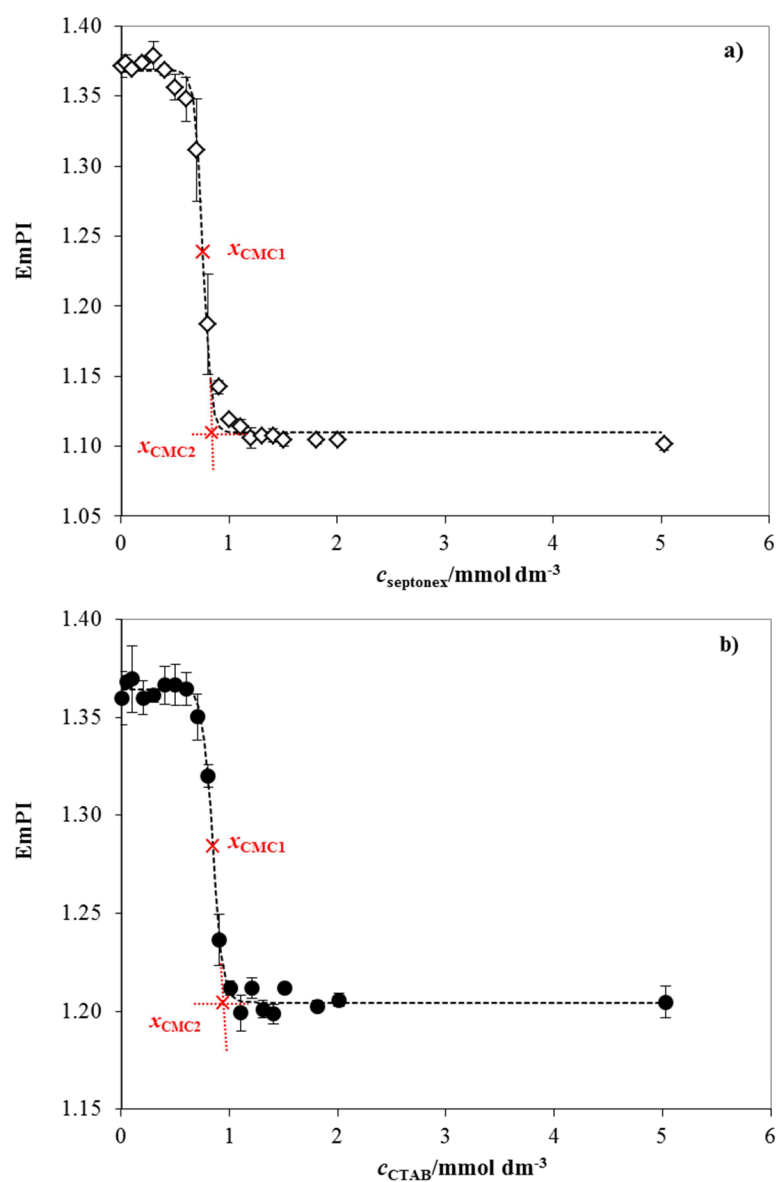


Fig. 2: Plots of EmPI versus surfactant concentration for a) Septonex and b) CTAB.

Determination of micellar aggregation number

The values of the aggregation numbers for Septonex and CTAB in aqueous solution at four different concentrations above the CMC were investigated by steady-state and time-resolved fluorescence quenching methods. From SSFQ measurements, the logarithm of the ratio of pyrene fluorescence intensities (383 nm) measured in the absence and in the presence of the quencher (F_0 and F_Q , respectively) was evaluated against the concentration of quencher CPC at a constant concentration of surfactant. In TRFQ measurements, the parameter C was plotted against CPC concentration. These plots for Septonex are shown in Fig. 3. As can be seen, all of the observed dependencies exhibit a linear trend. The same applies in case of CTAB. The aggregation numbers were calculated from the slopes of these plots. Table 2 lists the values of the aggregation numbers ($N_{\text{ag,SSFQ}}$ and $N_{\text{ag,TRFQ}}$) for the investigated Septonex and CTAB aqueous solutions. Figure 4 shows the concentration dependence of the aggregation number of Septonex and CTAB micelles. As follows from Tab. 2 and Fig. 4, the values of the aggregation numbers determined by TRFQ measurement are substantially higher than in the case of the SSFQ method, and our results for CTAB are in good agreement with the results of other authors. According to Alargova et al., $N_{\text{ag,TRFQ}}$ is larger than $N_{\text{ag,SSFQ}}$ for many micellar systems²¹. The differences between these values increase with N_{ag} and the microviscosity of the micellar aggregates. Generally, SSFQ measurement is much easier to perform and the results much easier to analyse; however, the SSFQ method is based on more restrictive assumptions than the TRFQ method. Thus, different results may be related to the different theoretical-mathematical bases (models) used to evaluate results of steady-state and time-resolved fluorescence quenching measurements. For instance, the steady-state evaluation suppose a specific distribution of the probe and quencher molecules (Poisson distribution) in micelles whereas the Infelta-Tachiya theory (time-resolved fluorescence quenching) is free of this assumption and evaluates the concentration ratio quencher:micelle directly from the lifetimes of the free and quenched probes.

Table 2: The values of N_{ag} for the investigated Septonex and CTAB aqueous solutions at 25 °C according to steady-state (SSFQ) and time-resolved (TRFQ) fluorescence quenching; comparison with published data (CTAB).

$c_{\text{surfactant}}/\text{mmol dm}^{-3}$	Septonex		CTAB	
	$N_{\text{ag,SSFQ}}$	$N_{\text{ag,TRFQ}}$	$N_{\text{ag,SSFQ}}$	$N_{\text{ag,TRFQ}}$
2	28.7	45.5	34.8	62.7
5	38.6	64.0	46.0; 46 ¹⁸	91.0; 92 ¹⁹
10	45.7	79.0	57.3; 54 ²⁰	101.1; 102 ⁶
25	48.4	82.6	61.5	102.9; 108 ¹⁴

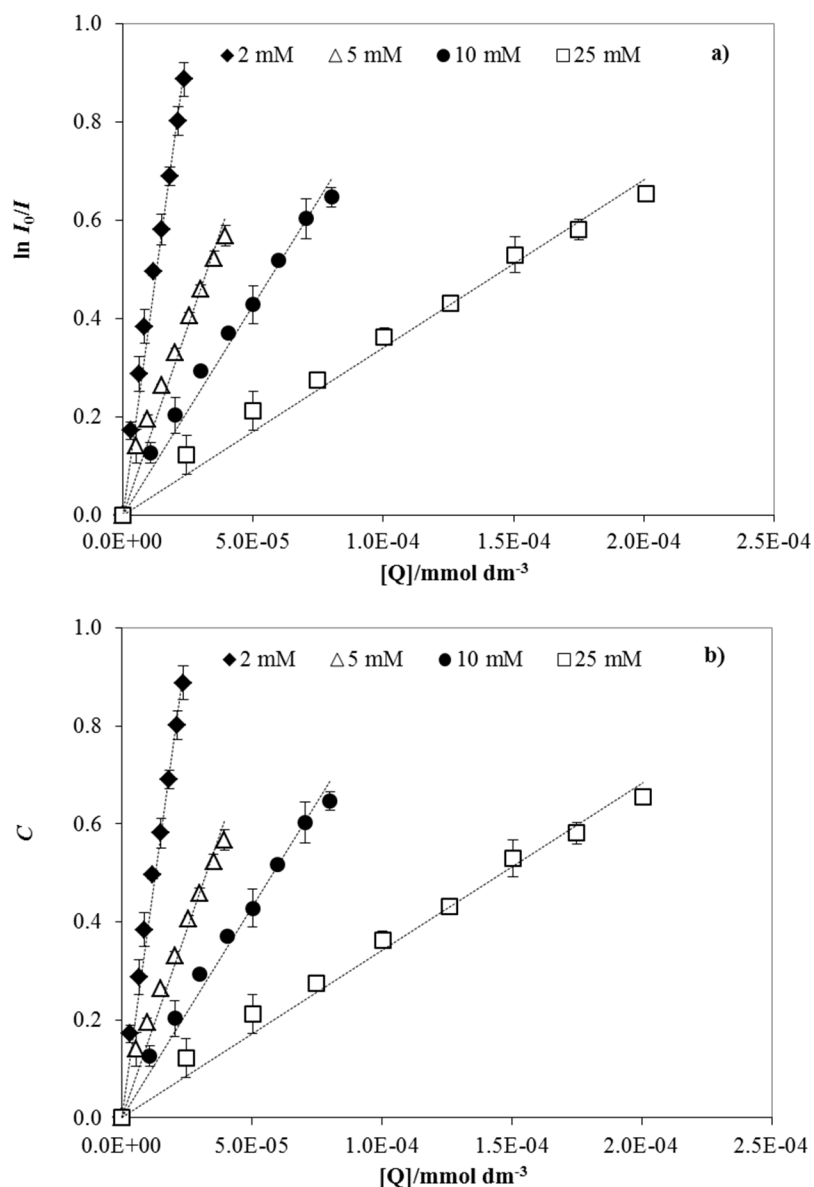


Fig. 3: The plots of a) $\ln F_0/F_Q$ and b) C against concentration of CPC for four different Septonex concentrations above CMC (2, 5, 10 and 25 mM).

In the literature, aggregation numbers for single-chain ionic surfactants are often reported as single values at concentrations above the CMC. However, as can be seen in Fig. 4, N_{ag} increases with an increasing concentration of surfactant, which indicates micellar growth. This increase in N_{ag} is significant up to a concentration ten times higher than the CMC and then it is mitigated, which indicates a roughly constant micellar size at a high surfactant concentration. Thus, the presence of a sufficient amount of surfactant molecules in solution is necessary to form micelles of a stable, finalized dimension (number of constituents) which is often overlooked. For this reason, it is always important to specify the particular concentration of surfactant at which the aggregation number was measured.

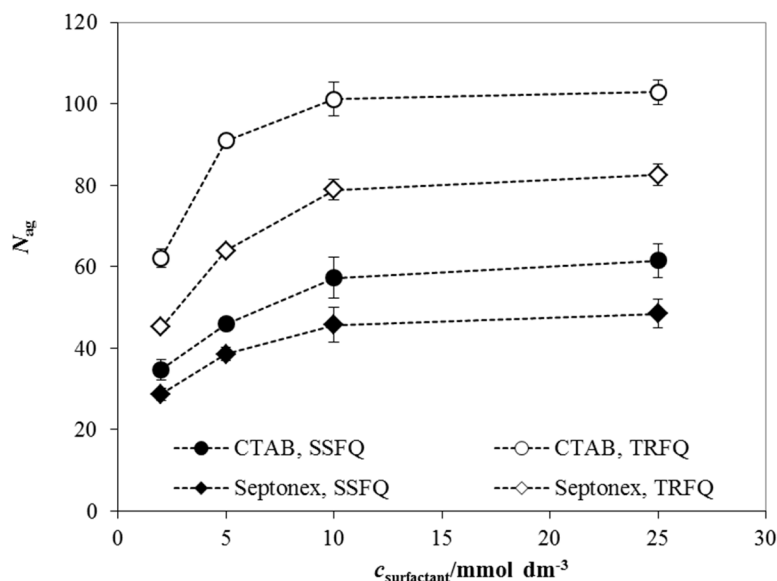


Fig. 4: The concentration dependence of the micellar aggregation number N_{ag} of the surfactants Septonex and CTAB. SSFQ – steady-state fluorescence quenching, TRFQ – time-resolved fluorescence quenching.

The comparison of N_{ag} values suggests that Septonex micelles are created by a smaller number of surfactant molecules than the micelles of the similar quaternary ammonium surfactant CTAB at the same concentrations. This is because of the different structure of the polar head group in Septonex and the shorter length of its alkyl chain. Bulkier polar head group occupies more space, therefore, due to the steric effects Septonex micelles are formed by a smaller number of surfactant molecules than CTAB micelles.

Conclusion

The aggregation behaviour of Septonex and CTAB in aqueous solution was investigated by steady-state and time-resolved fluorescence methods using a pyrene fluorescent probe. Their critical micelle concentrations were evaluated from plots of the pyrene emission polarity index against surfactant concentration. The micellar aggregation numbers for four concentrations of these surfactants were determined. The aggregation numbers from time-resolved fluorescence quenching were larger than those obtained from steady-state fluorescence measurement. In addition, the concentration dependence of the micellar aggregation number was clearly evident. The aggregation number increases up to a certain surfactant concentration above the CMC, which signals micellar growth. Generally, Septonex micelles are formed by a smaller number of surfactant monomers than in the case of CTAB; also, the CMC of Septonex is lower than that of CTAB. This phenomenon is caused by bulkier polar head group of Septonex than CTAB.

Experimental methods

Materials

The cationic surfactant carbethopendecinium bromide (Septonex, Czech Pharmacopoeia quality) was purchased from GBNchem, Czech Republic, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, purity $\geq 99.0\%$) from Sigma-Aldrich, Czech Republic. Experiments were carried out using pyrene (purity $\geq 99.0\%$, Fluka, Czech Republic) as a fluorescent probe and hexadecylpyridinium chloride monohydrate (CPC; purity $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich, Czech Republic) as a quencher. All chemicals were of the best available quality and used as received without further purification. Deionised water was used throughout this study (PURELAB Option R7/15; ELGA, Great Britain).

Preparation of samples

A stock solution of pyrene was prepared in acetone. Stock solutions of CTAB, Septonex, and CPC were prepared in water. An appropriate amount of pyrene stock solution was added to glass vials and the acetone was evaporated under reduced pressure. Subsequently, the surfactant stock solution, CPC stock solution, and water were added. All samples were stirred overnight at laboratory temperature.

Samples for the determination of CMC were prepared with a constant concentration of pyrene (2×10^{-6} M), and with increasing concentrations of cationic surfactant ranging from 0.01 to 5 mM.

Aggregation numbers were estimated for 2, 5, 10 and 25 mM Septonex and CTAB solutions. The pyrene concentration was kept at a low level such that $c_{\text{pyrene}}/c_{\text{micelle}} > 0.1$. The molar concentration ratio $c_{\text{CPC}}/c_{\text{micelle}}$ was varied between 0–1.5.

Measurements

Absorption spectra with a wavelength range of 300–530 nm were recorded on a Varian Cary UV-VIS spectrophotometer. Fluorescence spectra were measured on a Fluorolog spectrofluorimeter (Horiba Scientific). Emission spectra were recorded between 360–530 nm with the excitation wavelength set to 336 nm. Because of the inner filter effect, the correction of emission spectra was made according to the equation²⁷:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{0.5(A_{\text{ex}}+A_{\text{em}})}, \quad (7)$$

where F_{corr} and F_{obs} are the corrected and observed fluorescence intensities, respectively, and A_{ex} and A_{em} are the values of the absorbance at the excitation and emission wavelengths, respectively.

Time-resolved fluorescence measurements were performed using a FluoroCube TCSPC spectrometer (Horiba Scientific). For excitation, a 329 nm NanoLED diode was used. Fluorescence decays were collected at 383 nm, which correspond to the third emission peak in the pyrene emission spectra.

All measurements were performed at 25 ± 1 °C.

References

1. Greksáková, O., Oremusová, J., Vojteková, M. & Kopecký, F. Spectrophotometric study of the effect of univalent electrolytes on critical micelle concentrations of [1-(ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium, 1-hexadecylpyridinium, and dimethylbenzyl-dodecylammonium bromides. *Chem. Papers* 48, 300-305 (1994).
2. Čermáková, L., Rosendorfová, J. & Malát, M. Determination of critical micelle concentration of 1-carbethoxypentadecyltrimethylammonium bromide. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* vol. 45, 210-213 (1980).
3. Oremusová, J. & Greksáková, O. Micellization parameters of cationic surfactants consisting of the [1-(ethoxycarbonyl)-pentadecyl]-trimethylammonium ion and various anions. *Detergents* 40, 35-39 (2003).
4. Vojteková, M., Kopecký, F., Greksáková, O. & Oremusová, J. Effect of Addition of KX Type Electrolytes and Temperature on the Critical Micellar Concentrations of 1-Cetylpyridinium and Carbethopendecinium Bromides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* vol. 59, 99-105 (1994).
5. Pavlíková, M., Lacko, I., Devínský, F. & Mlynářčík, D. Quantitative Relationships Between Structure, Aggregation Properties and Antimicrobial Activity of Quaternary Ammonium Bolaamphiphiles. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* vol. 60, 1213-1228 (1995).
6. Hansson, P., Jönsson, B., Ström, C. & Söderman, O. Determination of Micellar Aggregation Numbers in Dilute Surfactant Systems with the Fluorescence Quenching Method. *The Journal of Physical Chemistry B* vol. 104, 3496-3506 (2000).
7. Kalyanasundaram, K. & Thomas, J. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society* 99, 2039-2044 (1977).
8. Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E. & Montenegro, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education* 74, 1227-1231 (1997).
9. Piñeiro, L., Novo, M. & Al-Soufi, W. Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science* 215, 1-12 (2015).
10. Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J. & Carnero Ruiz, C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* 258, 116-122 (2003).
11. Ray, G., Chakraborty, I., Ghosh, S., Moulik, S. & Palepu, R. Self-Aggregation of Alkyltrimethylammonium Bromides (C 10 -, C 12 -, C 14 -, and C 16 TAB) and Their Binary Mixtures in Aqueous Medium: A Critical and Comprehensive Assessment of Interfacial Behavior and Bulk Properties with Reference to Two Types of Micelle Formation. *Langmuir*

- vol. 21, 10958-10967 (2005).
12. Dar, A., Garai, A., Das, A. & Ghosh, S. Rheological and Fluorescence Investigation of Interaction between Hexadecyltrimethylammonium Bromide and Methylcellulose in the Presence of Hydrophobic Salts. *The Journal of Physical Chemistry A* vol. 114, 5083-5091 (2010).
 13. Zana, R., Frasch, J., Soulard, M., Lebeau, B. & Patarin, J. Fluorescence Probing Investigations of the Mechanism of Formation of Organized Mesoporous Silica. *Langmuir* vol. 15, 2603-2606 (1999).
 14. Vethamuthu, M., Almgren, M., Mukhtar, E. & Bahadur, P. Fluorescence quenching studies of the aggregation behavior of the mixed micelles of bile salts and cetyltrimethylammonium halides. *Langmuir* vol. 8, 2396-2404 (1992).
 15. Moulik, S., Haque, M., Jana, P. & Das, A. Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States. *The Journal of Physical Chemistry* vol. 100, 701-708 (1996).
 16. Frindi, M., Michels, B. & Zana, R. Ultrasonic absorption studies of surfactant exchange between micelles and bulk phase in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants with a short alkyl chain. 3. Surfactants with a sugar head group. *The Journal of Physical Chemistry* vol. 96, 8137-8141 (1992).
 17. Regev, O. & Zana, R. Aggregation Behavior of Tyloxapol, a Nonionic Surfactant Oligomer, in Aqueous Solution. *Journal of Colloid and Interface Science* vol. 210, 8-17 (1999).
 18. Li, W., Han, Y., Zhang, J. & Wang, B. Effect of ethanol on the aggregation properties of cetyltrimethylammonium bromide surfactant. *Colloid Journal* vol. 67, 159-163 (2005).
 19. Zana, R., Binana-Limbele, W., Kamenka, N. & Lindman, B. Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-cationic surfactant interactions: electrical conductivity, self-diffusion and time-resolved fluorescence quenching investigations. *The Journal of Physical Chemistry* vol. 96, 5461-5465 (1992).
 20. Bhattacharya, S., Das, H. & Moulik, S. Quenching of fluorescence of 2-anthracene sulphonate by cetylpyridinium chloride in micellar solutions of Tweens, Triton X-100, sodium dodecylsulphate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* vol. 71, 257-262 (1993).
 21. Alargova, R., Kochijashky, I., Sierra, M. & Zana, R. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir* vol. 14, 5412-5418 (1998).
 22. Infelta, P., Gratzel, M. & Thomas, J. Luminescence decay of hydrophobic molecules solubilized in aqueous micellar systems. Kinetic model. *The Journal of Physical Chemistry* vol. 78, 190-195 (1974).

23. Tachiya, M. Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles. *Chemical Physics Letters* vol. 33, 289-292 (1975).
24. Oremusová, J., Vitková, Z. & Herdová, P. Influence of Alcohols on Micellar and Release Balances of Cationic Surfactant – Carbethopendecinium Bromide (Septonex). *Tenside Surfactants Detergents* vol. 51, 339-347 (2014).
25. Fuguet, E., Ràfols, C., Rosés, M. & Bosch, E. Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Analytica Chimica Acta* vol. 548, 95-100 (2005).
26. Modaressi, A., Sifaoui, H., Grzesiak, B., Solimando, R., Domanska, U. & Rogalski, M. CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* vol. 296, 104-108 (2007).
27. Lakowicz, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2006).

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgement

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 16-12477S); and by the Materials Research Centre (project No. LO1211 from the National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

Author information

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, Brno 612 00, Czech Republic

Miloslav Pekař & Petra Holínková

Contributions

P.H. designed and performed the experiments, analysed data and wrote the first draft of manuscript and M. P. provided supervision and made a critical review of the manuscript.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

Corresponding author

Correspondence to Miloslav Pekař.

16.3 Příspěvek ve sborníku indexovaný v databázi Web of Science



Oct 14th – 16th 2015, Brno, Czech Republic, EU

FLUORESCENCE STUDY OF MICROCVISCOSITY OF HYALURONAN HYDROGELS CONTAINING HYDROPHOBIC NANODOMAINS DURING FOURTEEN DAYS OF AGEING

HOLÍNKOVÁ Petra, MRAVEC Filip, PEKAŘ Miloslav

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry,

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, xcucekajova@fch.vutbr.cz

Abstract

This paper deals with the fluorescence study of microviscosity changes of hydrogel composed by hyaluronan and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) during fortnight-ageing. The steady state anisotropy values obtained in the experiments were used to estimate the microviscosity of the corresponding hydrogel regions. Two different fluorescent probes were used, perylene for hydrophobic domains and rhodamine 6G for hydrophilic region. It is observed that the microviscosity in the hydrophobic domains of hydrogel is roughly constant, indicating that these domains do not undergo significant structural changes during ageing. However, the microviscosity of hydrophilic parts gradually decreases, which indicates structural changes in the nearby area of rhodamine molecules.

Keywords: fluorescence anisotropy, microviscosity, hyaluronan, CTAB, hydrogels

1. INTRODUCTION

The hydrogel is three-dimensional cross-linked networks of any water soluble polymer, which comprises a wide range of chemical compositions and bulk physical properties [1]. Their structure is able to absorb large amount of water which makes them permeable to oxygen, nutrients and other water-soluble metabolites [2]. Hydrogels can be formulated in a variety of physical forms like nanoparticles or films, therefore hydrogels are commonly used in experimental medicine and clinical practise. For example, hydrogels can be used in regenerative medicine [3], for tissue engineering [4-5] or like a drug or cancer carrier [6].

The hydrogels could degrade or eventually disintegrate and dissolve or they may be chemically stable. They are called 'reversible', or 'physical' gels when their networks are held together by molecular entanglements, or secondary forces like ionic and hydrophobic forces or H-bonding [7-8].

We prepared the hydrogel which was composed of hyaluronan and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide, wherein the molecules of surfactant provide physical crosslinking of hyaluronan chains and create the hydrophobic nanodomains, in which the hydrophobic drugs can be solubilized. Hyaluronan is a naturally occurring linear polysaccharide that is composed of two subunits, D-glucuronate and N-acetyl-D-glucosamine linked by $\beta(1-3)$ and $\beta(1-4)$ bonds which are connected to unbranched chain [9]. This substance is commonly in the connective tissues of vertebrates from an umbilical cord, vitreous to the synovial fluid in the joints [10]. As a component of the extracellular matrix, hyaluronan plays an important role in the migration and proliferation of cells and the immune response of the organism, facilitates wound healing and acts as a lubricant and shock absorber in the synovial fluid. Its specific biological activity is influenced by its molecular weight, length and circumstances in which it is synthesized [11].

In this paper, we report the results of study of fluorescence anisotropy of perylene and rhodamine 6G solubilized in different regions of this hydrogel. Experimental data are used to estimate microviscosity around the probes during fourteen days of ageing.

2. MAIN TEXT

2.1 Materials, preparation of samples

Hyaluronan of high molecular weight (750–1000 kDa) was purchased from Contipro Biotech s. r. o., Czech Republic. Cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) of the best available purity was purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Fluorescence probes, perylene and rhodamine 6G were also used without further purification. Stock solution of hyaluronan in 0.15 M NaCl was prepared in concentration 5.0 g·l⁻¹ by slowly adding solid hyaluronan into solution of sodium chloride under stirring, followed by 24 h stirring in closed vessel to ensure complete dissolution. Stock solution of CTAB in 0.15 M NaCl was prepared in concentration 200 mmol·l⁻¹. Stock solutions of fluorescence probes were prepared in a volatile solvent - perylene was dissolved in acetone and rhodamine 6G was blended in ethanol. Water used to prepare all solutions was doubly distilled (Millipore).

Gelation was carried out in glass tubes, at first, the stock solution of perylene/rhodamine was added to the tubes and then the acetone/ethanol was evaporated. The final concentration of this probe in samples was 1×10^{-6} mol·l⁻¹. Then a certain amount of solutions of CTAB were added to these tubes and mixed on vortex mixer. Then the samples were left on a shaker for 24 hours at room temperature. Next day, the same amount of solution of hyaluronan as solution of CTAB was added to tubes, samples were again mixed on a vortex mixer and left for a further 24 hours on a shaker at room temperature. Individual samples were blended three times. The fluorescence spectra, lifetime and steady-state anisotropy of fluorescence were measured after 1, 7 and 14 days after preparation of these samples, wherein they were stored complete with the supernatant at room temperature in the dark.

2.2 Instrumentation

The steady-state measurements of anisotropy were carried out on a luminescence spectrophotometer Fluorolog (HORIBA Jobin Yvon) with 150-W xenon lamp as the excitation. Measurements were realized in L-format instrumental configuration and an automatic interchangeable wheel with Glan-Thompson polarizers.

The value of fluorescence anisotropy was determined as

$$r = \frac{I_V - GI_H}{I_V + GI_H}, \quad (1)$$

where the subscripts of the fluorescence intensity values (I) refer to horizontal (H) and vertical (V) orientation of polarizers. The G factor (instrumental correcting factor) was automatically determined by the software supplied by the manufacturer. The integration time was chosen to 2 s. The anisotropy measurement on the one sample was carried out five times and the result was average value of anisotropy. Individual samples were blended three times, so all anisotropy values of the probes in the hydrogels presented in this work are the mean values of evaluated anisotropy values for individual samples. For samples with perylene, the excitation wavelength was set to 389 nm and emission was elected to 475 nm, for samples containing rhodamine, the excitation wavelength was set to 455 nm and emission was set to 560 nm. Temperature of the sample chamber was set on 25 °C. The gels were applied between the two quartz glasses, which has been placed diagonally into a standard cuvette.

The lifetime was measured on TCSPC lifetime spectrofluorometer Fluorocube from HORIBA Jobin Yvon. The samples containing perylene were excited by the NanoLED diode 389 nm (pulse width 1.2 ns) and the emission was observed at 475 nm. The samples with rhodamine 6G were excited by the NanoLED diode 455 nm with pulse width 1.2 ns and the emission monochromator was set on 560 nm. The lifetime was measured at orientation of polarizers in magic angle and peak preset was set to 10 000 counts. Temperature of the sample chamber was set on 25 °C. The gels were applied to a special cuvette for solid samples.

Average lifetime was calculated according to equation

$$\tau = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i \quad (2)$$

where α_i is pre-exponential factor (0–1) and τ_i is corresponding lifetime.

2.3 Methods

The microviscosity of environment was evaluated by determining the equivalent viscosity, i.e. viscosity of homogeneous environment from which the fluorescent probe is given the same response as in the measurement of the microenvironment. For this purpose the calibration curves were measured - the dependence of the fluorescence anisotropy to the viscosity of homogeneous environment. This homogenous environment was consisted of a mixture of glycerol and water. The values of viscosity of this mixture were determined from article [12].

Following equation, which was obtained by fitting the calibration data with a linear curve, were used to calculate microviscosity of different parts of hyaluronan gels.

Hydrophobic domains (perylene): $y = 0.000578 x + 0.017584$

Hydrophilic parts (rhodamine): $y = 0.001433 x + 0.103345$

2.4 Results and discussion

Hydrophobic nanodomains during fortnight-ageing

Important property of the carrier system is the ability to incorporate hydrophobic molecules of drugs. Therefore, it is important the presence of hydrophobic domains in its structure. In the studied gel composed by hyaluronan and CTAB hydrophobic domains are formed aggregates of entrapped molecules of surfactant, which also serves as a physical crosslinking hyaluronan chains.

In hydrogels, the perylene has two lifetimes – short-time fraction (2%) has lifetime $\tau_1 = (3.38 \pm 0.15)$ ns and long-time fraction (98%), which correspond to molecules of perylene incorporated to hydrophobic environment, has lifetime $\tau_2 = (5.66 \pm 0.01)$ ns. The average lifetime has been calculated to $\tau = (5.61 \pm 0.02)$ ns. The value of these lifetimes during the fortnight-ageing gel has not changed.

The following table 1 shows the obtained value of steady-state anisotropy of fluorescence of perylene and calculated values of microviscosity. As we can see, the values are not changed during ageing, which indicates that hydrophobic domains do not undergo significant structural changes during this time.

Table 1 Steady-state anisotropy of fluorescence of perylene, incorporated in hydrogel, during fortnight-ageing and calculated values of microviscosity of perylene surroundings.

Ageing gel [day]	Steady-state anisotropy of fluorescence	Microviscosity [mPa·s]
1	0.029 ± 0.002	19.8 ± 1.4
7	0.0293 ± 0.0017	20.3 ± 1.2
14	0.0291 ± 0.0013	19.9 ± 0.9

The following table 2 shows the obtained value of steady-state fluorescence anisotropy of rhodamine and calculated values of microviscosity of its surrounding. Relatively high anisotropy values were measured. The values of anisotropy/microviscosity decreased during ageing, suggesting that the hydrophilic parts around the molecules of rhodamine are subject to changes – its surrounding has been more and more fluid.

Table 2 Steady-state anisotropy of fluorescence of rhodamine 6G during fortnight-ageing of hydrogel and calculated values of microviscosity of rhodamine surroundings.

Ageing gel [day]	Steady-state anisotropy of fluorescence	Microviscosity [mPa·s]
1	$0,216 \pm 0,011$	79 ± 5
7	$0,202 \pm 0,019$	69 ± 4
14	$0,190 \pm 0,011$	60 ± 3

Time development of values of microviscosity of individual hydrogel parts is shown on Fig. 1. The roughly constant values of microviscosity of hydrophobic domains do not indicate structural changes of perylene surroundings, against it the values of microviscosity of hydrophilic region nearby molecules of rhodamine decreased by about 25 percent during ageing.

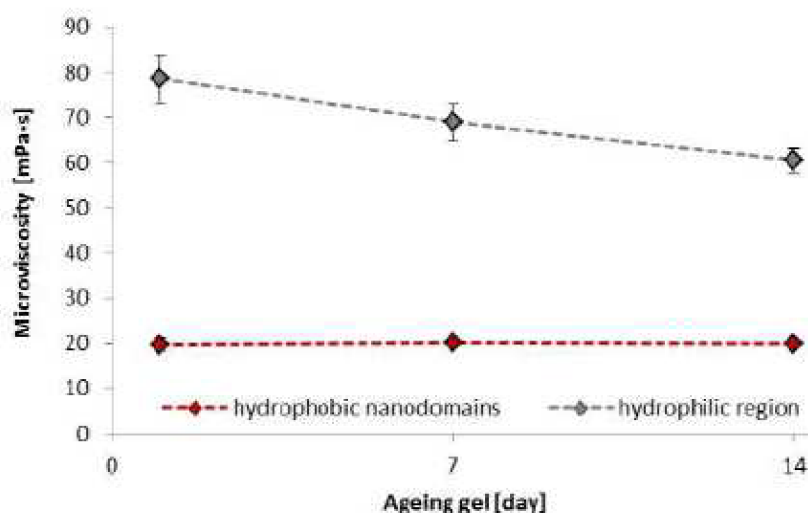


Fig. 1 Microviscosity of hydrophobic nanodomains and hydrophilic region of hyaluronan hydrogel determined first, seventh and fourteenth day of ageing.

3. CONCLUSION

Using analysis of photophysical response of two different fluorescence probes dissolved in different region of hydrogel composed of hyaluronan and cationic surfactant CTAB, we have obtained information about its microstructural changes during fortnight-ageing. From steady-state measurement of fluorescence anisotropy the microviscosity of different region of hydrogel has been estimated as a function of the days of ageing. The microviscosity of hydrophobic nanodomains has not changed during ageing, so we can these domains describe as a structural stable. Whereas the microviscosity of hydrophilic region, in terms surrounding of rhodamine molecules, decreased by about 25 percent, which probably indicates some microstructural changes in this area of hyaluronan hydrogel.

REFERENCES

- [1] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, vol. 49, issue 8, s. 1 993–2 007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- [2] SHU, Xiao Zheng, et al. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, 25.7: 1339-1348.
- [3] SLAUGHTER, Brandon V., et al. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*, 2009, 21.32-33: 3307-3329.
- [4] LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 2001, 101.7: 1869-1880.
- [5] KUMAR, MNV Ravi, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 2004, 104.12: 6017-6084.
- [6] VINOGRADOV, Serguei V.; BRONICH, Tatiana K.; KABANOV, Alexander V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced drug delivery reviews*, 2002, 54.1: 135-147.
- [7] CAMPOCCIA, Davide, et al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 1998, 19.23: 2101-2127.
- [8] PRESTWICH, Glenn D., et al. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, 1998, 53.1: 93-103.
- [9] HARGITTAI, István, Magdolna HARGITTAI a Bryan TOOLE. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, vol. 19, issue 5, s. 697-717.
- [10] GARG, H.G, CH.A. HALES. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. ISBN 00-804-4382-6.
- [11] STERN, Robert, Tracey J. BROWN a Natalie K. THOMAS. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie*. 2005, vol. 53, issue 7, v-360.
- [12] SEGUR, J. B. a Helen E. OBERSTAR. Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Industrial*. 1951, vol. 43, issue 9, s. 2117-2120. DOI: 10.1021/ie50501a040. [V]