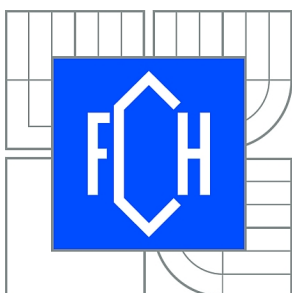




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE VE STUDIU AGREGAČNÍHO CHOVÁNÍ KOLOIDŮ

FLUORESCENCE QUENCHING IN STUDY OF AGGREGATION BEHAVIOR OF COLLOIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. BARBORA SRHOLCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0415/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Barbora Srholcová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Zhášení fluorescence ve studiu agregačního chování koloidů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma využití zhášení fluorescence ve studiu agregačního chování koloidů ve vodných roztocích. Zvláštní důraz věnovat stanovení agregačního čísla.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodnou kombinaci fluorescenční sonda-zhášeč a realizovat experimenty zaměřené na stanovení agregačního tenzidů v prostředí hyaluronanu.
3. Prozkoumat ovlivnění agregačního čísla a průběhu zhášení v interakci tenzidů s hyaluronanem.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití komplexů tenzid-hyaluronan v z hlediska systémů pro cílenou distribuci léčiv.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Barbora Srholcová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na zkoumání agregátů hyaluronan-tenzid z hlediska stanovení agregačního čísla. Pomocí fluorescenční spektroskopie byla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace (CMC) cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) ve třech různých rozpouštědlech (voda, fosfátový pufr a fyziologický roztok). Dále byl zkoumán vliv přídavku nativního hyaluronanu na hodnotu CMC. Bylo zjištěno, že největší vliv na hodnotu CMC má rozpouštědlo, zatímco přídavek hyaluronanu ovlivňuje CMC jen nepatrně.

Pomocí zhášení fluorescence bylo zjištěno agregační číslo (*Nagg*) CTAB a vliv přídavku nativního hyaluronanu na hodnotu agregačního čísla. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren a jako zhášeče byly použity jód a cetylpyridiniumchlorid (CPC). Tenzid byl rozpuštěn ve třech různých rozpouštědlech (voda, fosfátový pufr a fyziologický roztok). Bylo zjištěno, že na hodnotu agregačního čísla má výrazný vliv nejen přídavek hyaluronanu ale i použité rozpouštědlo. Při použití 10 mM CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku byla hodnota *Nagg* 119 ± 4 , zatímco v pufru byla tato hodnota poloviční. Dále bylo zjištěno, že ve většině případů, přídavek hyaluronanu snižuje hodnotu agregačního čísla.

ABSTRACT

This work focuses on examination of hyaluronan-surfactant aggregates in term of determination of aggregate number. The value of critical micellar concentration (CMC) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in three different solvents (water, phosphate buffer and physiological solution). Next the effect of the native hyaluronan supplement on the value of CMC was examined. It was found out that the solvent has the biggest effect on the value of CMC whilst the hyaluronan supplement affects CMC only a little.

The aggregate number (*Nagg*) CTAB and the effect of the native hyaluronan supplement were determined out by means of fluorescence quenching. Pyrene was used as a fluorescence probe. Iodine and cetylpyridinium chloride (CPC) were used as quenchers. Surfactant was dissolved in three different solvents (water, phosphate buffer and physiological solution). Not only the hyaluronan supplement but also the used solvent has the strong effect on the value of the aggregate number. When using 10mM CTAB dissolved in physiological solution the value of *Nagg* was 119 ± 4 while the value was half in buffer. Then we found out that in most cases the hyaluronan supplement reduces the value of the aggregate number.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, zhášení fluorescence, pyren, hyaluronan, cetyltrimethylamonium bromid, kritická micelární koncentrace, agregační číslo, micely

KEYWORDS

Fluorescence, quenching of fluorescence, pyrene, hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, critical micellar concentration, aggregation number, micelles

SRHOLCOVÁ, B. *Zhášení fluorescence ve studiu agregačního chování koloidů*. Brno: Vysoké učení technického v Brně, Fakulta chemická, 2010. 71 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. A dále svému konzultantovi Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za pomoc a trpělivost, kterou se mnou měl.

OBSAH

1	Úvod	9
2	Teoretická část	11
2.1	Tenzidy	11
2.1.1	Dělení tenzidů	11
2.1.2	Micely	12
2.2	Fluorescenční sondy	13
2.2.1	Pyren	13
2.3	Hyaluronan	14
2.3.1	Struktura hyaluronanu v roztoku	15
2.3.2	Využití hyaluronanu	16
2.4	Molekulová absorpční spektroskopie v UV–VIS oblasti	16
2.5	Fluorescenční spektroskopie	17
2.5.1	Zhášení fluorescence	19
2.5.2	Zhášeče fluorescence	20
2.5.3	Přehled o intermolekulárních deexcitačních procesech excitačních molekul vedoucích k zhášení fluorescence	20
2.5.4	Dynamické zhášení	21
2.5.5	Statické zhášení	22
2.5.6	Určení statického a dynamického zhášení	23
2.5.7	Využití zhášečů v praxi	24
2.5.8	Fotoindukovaný přenos elektronů	24
2.5.9	Tvorba excimerů a exciplexů	24
2.5.10	Fotoindukovaný protonový transfěr	25
2.5.11	Přenos excitované energie	27
2.6	Agregační číslo	28
3	Současný stav problematiky	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Materiály	32
4.2	Příprava zásobních roztoků	33
4.2.1	Zásobní roztoky pyrenu	33
4.2.2	Zásobní roztok jódu	33
4.2.3	Zásobní roztoky tenzidů	33
4.2.4	Zásobní roztok azidu sodného	33
4.2.5	Zásobní roztok pufru (pH=7)	33
4.2.6	Zásobní roztok fyziologického roztoku	33
4.2.7	Zásobní roztoky hyaluronanu	33
4.3	Příprava vzorků k měření	34
4.3.1	Příprava vzorků ke zjištění agregačního čísla	34
4.3.2	Příprava vzorků ke zjištění kritické micelární koncentrace	36
4.4	Měření vzorků	37

5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1	Určení kritické micelární koncentrace	43
5.2	Určení agregačního čísla.....	48
5.2.1	Rozpouštědlo - voda.....	49
5.2.2	Rozpouštědlo - pufr.....	51
5.2.3	Rozpouštědlo – fyziologický roztok	53
5.2.4	Použití CPC.....	55
5.2.5	Srovnání <i>Nagg</i>	60
6	ZÁVĚR	62
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
8	SEZNAM SYMBOLŮ	69
9	PŘÍLOHY	71

1 ÚVOD

Hyaluronan je polysacharid vyskytující se v mnoha tkáních lidského těla jako je kůže, chrupavka, sklivec, pupeční šňůra a oční rohovka [1]. Průměrný 70 kg muž má v těle zhruba 15 mg hyaluronanu. V kloubní chrupavce zodpovídá především za její pružnost. V kůži má několik funkcí. Nejen že napomáhá hydrataci kůže, ale je zapojen i do oprav a ochrany tkání, kdy například při vystavení kůže UVB paprsky nastane větší produkce i degradace HYA a tím dojde k zachycení paprsků, které by se jinak dostaly do hlubší vrstvy kůže.

Hyaluronan je látka tělu vlastní, není cytotoxická, imunogenní ani tetatogenní. Hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech [2]. Například má schopnost interagovat s buněčnými receptory. Patří mezi nezbytnou komponentu extracelulární matrix. Je to výborný humektant, lubrikant a biologicky aktivní látka. Její biologické vlastnosti jsou závislé na molekulové hmotnosti (vysoká Mr: humektant, lubrikant, tkáňová hydratace [3], nízká Mr: regulační molekula). Jako přirozená součást těla může být využita v biomedicíně a to i při léčbě některých zhoubných nádorových onemocnění. První biomedicínský produkt hyaluronanu, Healon, byl vyvinut v roce 1980 společností Pharmacia pro oční chirurgii [4]. Další významné využití HYA je při léčbě osteoartritidy [5], [6], kde se do kloubního pouzdra aplikují injekce s roztokem obsahující hyaluronan.

Hlavním cílem této práce je objasnění agregačních vlastností kationaktivního tenzidu CTAB bez a v přítomnosti hyaluronanu. Jednou z používaných metod poskytujících informace o micelárních systémech je fluorescence a fluorescenční zhášení solubilizované sondy v micelle [7]. V nejjednodušších případech je zhášení fluorescence popsáno pomocí Stern-Volmerovy rovnice [8], ve které je poměr intenzit fluorescence za nepřítomnosti zhášeče k intenzitě fluorescence v přítomnosti zhášeče lineární funkcí koncentrace zhášeče. Odchytky od linearity mohou být způsobeny nasycením roztoku nebo „superlinearitou“. V případě nasycení se zhášeč nedostane ke všem molekulám fluoroforu. Zhášení tak neprobíhá v celém systému. „Superlinearita“ je častější a obvykle nastává kvůli rychlému rozdělení zhášeče do prostoru obsahující fluorofor [9]. Zhášení může být použito na zjištění pozice sondy v micelle a ke studiu různých asociačních vlastností zhášeče s micelou (CMC, *Nagg*, polarita média) [10], [11]. Další metodou na zjištění agregačního chování koloidů, a to především zjištění agregačního čísla a kritické micelární koncentrace, může být steady-state fluorescenčního zhášení. Tato metoda vyžaduje použití hydrofobní fluorescenční sondy, které vykazují různé fluorescenční charakteristiky závislé na vlastnostech solubilizovaného média [12].

Pro tuto práci jsme použili kationaktivní tenzid CTAB ve třech rozpouštědlech (voda, fosfátový pufr o $\text{pH} = 7$ a fyziologický roztok). Jako jednoduchý model fyziologického roztoku jsme použili 0,15 M roztok NaCl. V první části jsme pomocí fluorescenční spektroskopie s využitím pyrenu jako fluorescenčních sondy sledovali vliv přídavku nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu na kritickou micelární koncentraci tenzidu v různých rozpouštědlech. V druhé části jsme se zabývali studiem agregačního čísla CTAB bez hyaluronanu a s použitím nativního hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech za použití metody zhášení fluorescence. Hlavním cílem práce je získat parametry pro charakterizaci micelárních vlastností s ohledem na jejich možné využití jako cílených nosičů léčiv.

V posledních letech je nosičům léčiv věnována velká pozornost a to hlavně v onkologii, kde je při léčbě vystaven léčivu celý organismus a tím je způsobena systémová cytotoxicita. Při použití nosiče by se mělo léčivo dostat přímo k tumoru a tím by se měly minimalizovat vedlejší účinky na celý organismus, jako je například leukopenie, vypadávání vlasů, akutní poškození ledvin, chronická neurotoxicita, nevolnost [13] a anemie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tenzidy

Tenzidy jsou obecně látky, jejichž molekula se skládá z polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) části. Nepolární část obvykle tvoří dlouhý uhlovodíkový řetězec, zatímco polární část je tvořena výrazně polární skupinou, jako je například karboxylová skupina $-\text{COOH}$ a sulfonová skupina $-\text{SO}_3\text{H}$ [14].

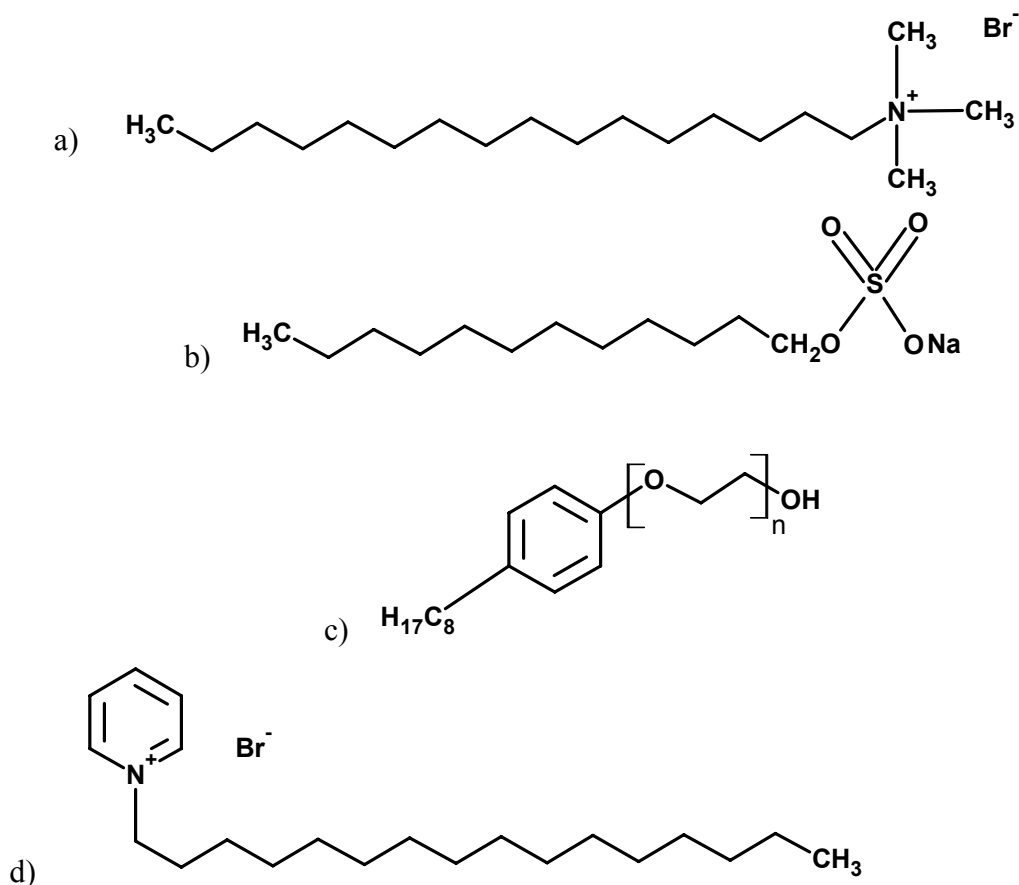
Jsou to povrchově aktivní látky (PAL), které snižují povrchovou či mezifázovou energii a proto se samovolně koncentrují na mezifázovém rozhraní. Jelikož tenzidy snižují povrchové napětí rozpouštědel, usnadňují tak rozpouštění a odstraňování nečistot. Proto se často používají v čistících a pracích prostředcích [15]. Ve vodě mají schopnost samovolně agregovat a vytvářet micely [7].

2.1.1 Dělení tenzidů

Tenzidy se dělí podle náboje na ionogenní a neionogenní. Ionogenní se pak ještě dělí na kation/aniontové a amfotermní.

Mezi kationtové tenzidy patří například decylamonium bromid, cetylpyridinium bromid (CPB) a cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) [16]. Aniontové tenzidy jsou dodecylsulfát sodný (SDS) [17], kyselina cholová a decylsulfát sodný. Jako amfotermní tenzid je znám 3-(dodecyldimethylamonio)-1-propanosulfonát nebo 1-(trimethylamonio)tetradekanoát.

Mezi neionogenní tenzidy pak řadíme polyoxyethylen(23)dodekanol (Brij 35), polyoxyethylen(3)dekanol a polyoxyethylen(9,5)oktylfenol (Triton X-100). Na obrázku 1 můžeme vidět přehled několika jmenovaných tenzidů



Obr. 1 Chemická struktura: a) CTAB, b) SDS, c) TritonX-100, d) CPB

2.1.2 Micely

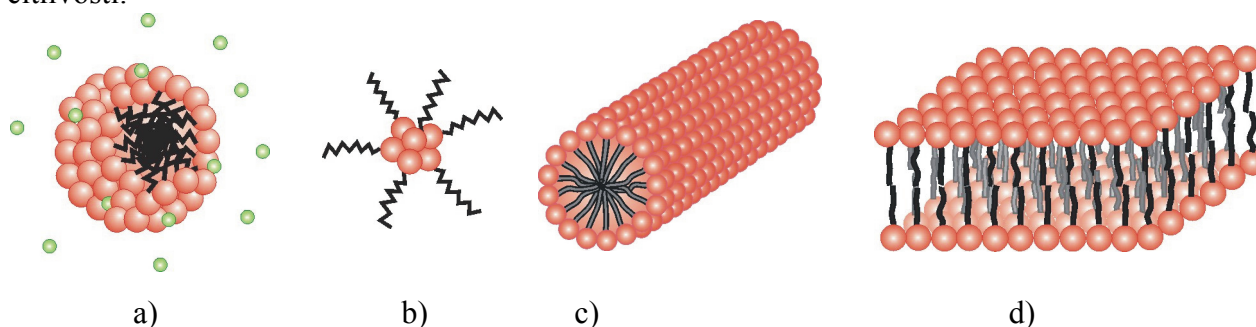
Micely jsou koloidní částice jejichž tvar závisí na struktuře a koncentraci tenzidu v roztoku. Jejich povrch je tvořen strukturami, jejichž interakce s rozpouštědlem je energeticky výhodná, a vnitřní část je tvořena strukturami, jejichž interakce s rozpouštědlem je nevýhodná. Ve vodném prostředí je tedy povrch micely hydrofilní a vnitřní část hydrofobní [18]. V nepolárním prostředí se mohou tvořit tzv. inverzní micely s obráceným uspořádáním polárních a nepolárních částí. Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, molekulární struktuře PAL a na charakteru mezimolekulárních sil [19].

Kritická koncentrace tvorby micel (CMC) je koncentrace tenzidu, při níž dochází k nasycení povrchu a začínají se tvořit micely. Při koncentracích vyšších než je CMC, jsou micely stabilní. CMC je daná zejména strukturou tenzidu a je pro každý tenzid charakteristická. Je ovlivněna především teplotou a vlastnostmi rozpouštědla. CMC neionogenních tenzidů bývá zpravidla nižší než CMC ionogenních tenzidů [19].

Micelární roztoky jsou mikroheterogenní systémy a molekulové sondy jsou velmi dobré nástroje k zjištění micelární struktury v různých regionech systému [20].

Charakteristické vlastnosti micel se snažíme objasnit kvůli pochopení různých chemických a biologických procesů [21]. Hlavní vlastností micelárního systému je jejich kapacita solubilizace molekul, které jsou jinak ve vodě nerozpustné [7]. To lze vysvětlit tak, že ve vodném prostředí do sebe micela absorbují hydrofobní molekulu. Tyto solubilizované molekuly jsou pak rozděleny mezi dvě fáze (vodná fáze a micelární fáze) [22]. Měření

fluorescence je nejlepší a nejpoužívanější metoda k určení těchto vlastností díky její vysoké citlivosti.



Obr. 2 a) klasická micela, b) obrácená micela, c) válcovitá micela, d) laminární micela [19]

2.2 Fluorescenční sondy

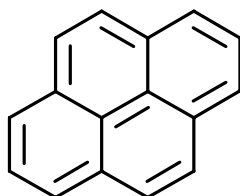
Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se obecně dělí na tři skupiny. První skupinou jsou vnitřní sondy, jsou však vhodné pouze pro úzký okruh zkoumání. Dále jsou to vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Poslední dvě zmíněné skupiny jsou hojně využívány, ale vzhledem k obtížnosti syntézy některých kovalentně vázaných sond, je většina výzkumů prováděna s nekovalentně asociujícími sondami. Tyto chemosenzory jsou stále více oblíbené pro jejich snadné použití v roztoku [16].

To jestli je sonda hydrofobní, hydrofilní nebo amfifilní, je základním znakem fluorescenční sondy. Díky silnému vlivu okolního prostředí na fluorescenci jsou fluorescenční sondy často používány při zkoumání chemických, biochemických a biologických systémů.

Jsou vhodné pro jejich citlivost a selektivitu pomocí jejichž změn jdou stanovit některé vlastnosti v systému. Volba vhodné sondy ve fluorescenční spektroskopii je velice důležitá, jelikož právě její vlastnosti nám umožní získat tyto potřebné informace.

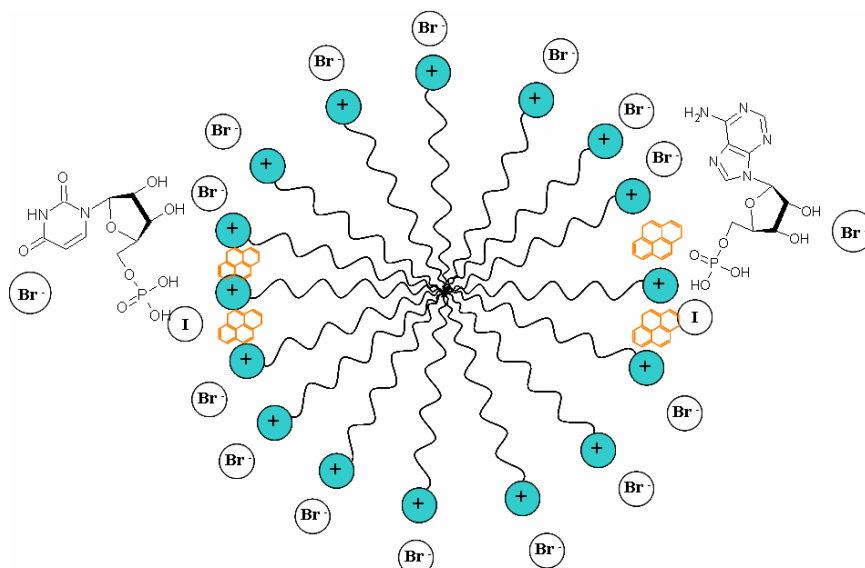
2.2.1 Pyren

Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík, jehož molekula se skládá ze čtyř kondenzovaných benzenových jader v aromatickém systému. Je hydrofobní povahy. Patří mezi nejpoužívanější neutrální fluorescenční sondy [23]. Je velmi výhodné použít pyren pro agregační studie, kromě hodnoty kritické micelární koncentrace systému nám umožní stanovit i polaritu micelárního jádra.



Obr. 3 Pyren

Jeho emisní spektrum tvoří 5 píků, které přísluší jednotlivým vibračním přechodům [24]. Poměr intenzit fluorescence prvního a třetího píku, I_1/I_3 , udává míru polaritu v mikroheterogenních systémech [25]. S rostoucí polaritou se bude zvyšovat intenzita prvního píku a intenzita třetího píku zůstane nezměněna.

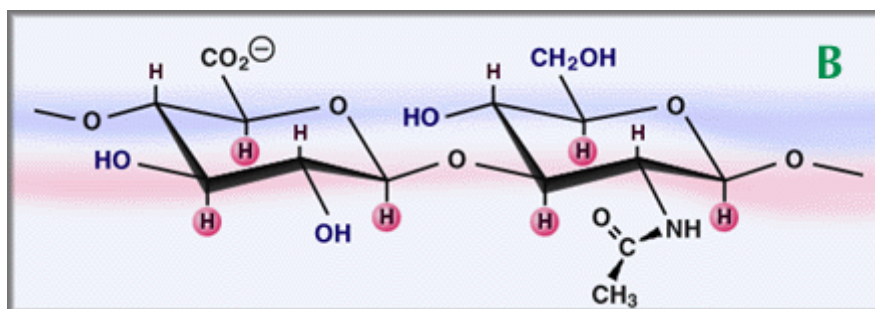


Obr. 4 Pyren v micelle tvořené CTAB; zhášení pyrenu pomocí nukleotidů [26]

2.3 Hyaluronan

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer popsali proceduru pro osamostatnění nového glykosaminoglykanu z hovězího sklívce. Prokázali, že tato substance obsahovala kyselinu uronovou a aminocukr, ale neobsahovala sulfoester. Pojmenovali ji „kyselina hyaluronová“, ze spojení slov hyaloid (sklivec) a uronové kyseliny. Dnes je tato makromolekula nejčastěji označována jako hyaluronan, a to proto, že existuje v živém organismu ve formě polyamidu a ne ve formě kyseliny [27], [1].

Hyaluronan je polysacharid s polyanionickým charakterem [28]. Je to lineární nerozvětvený polymer [29], který se skládá z opakujících se jednotek D-glukorové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu [30], které jsou spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou [31]. Je to lineární nerozvětvený polymer. Počet opakujících se disacharidických jednotek v konečné molekule hyaluronanu může dosáhnout hodnoty 10 000 a více. Má široké rozmezí molekulových hmotností (stovky kDa až desítky MDa).



Obr. 5 Struktura hyaluronanu, kde růžové zbarvení představuje hydrofobní, nepolární, oblast, zatímco modré zbarvení představuje polární oblast molekuly

Je přítomný v páteři obratlovců, u strunatců, v kapsulích některých druhů bakterií *Streptococcus* a v kohoutích hřebincích. Je to významný prvek skeletu lidského oka [32] a kloubního mazu. Také se vyskytuje v chrupavkách, kde v nepřítomnosti dalších složek

vyplňuje objem tkáně. Dále se vyskytuje v nižší koncentraci v matrici dalších pojivých tkání. Největší množství hyaluronanu se však vyskytuje v kůži a v pupeční šňůře.

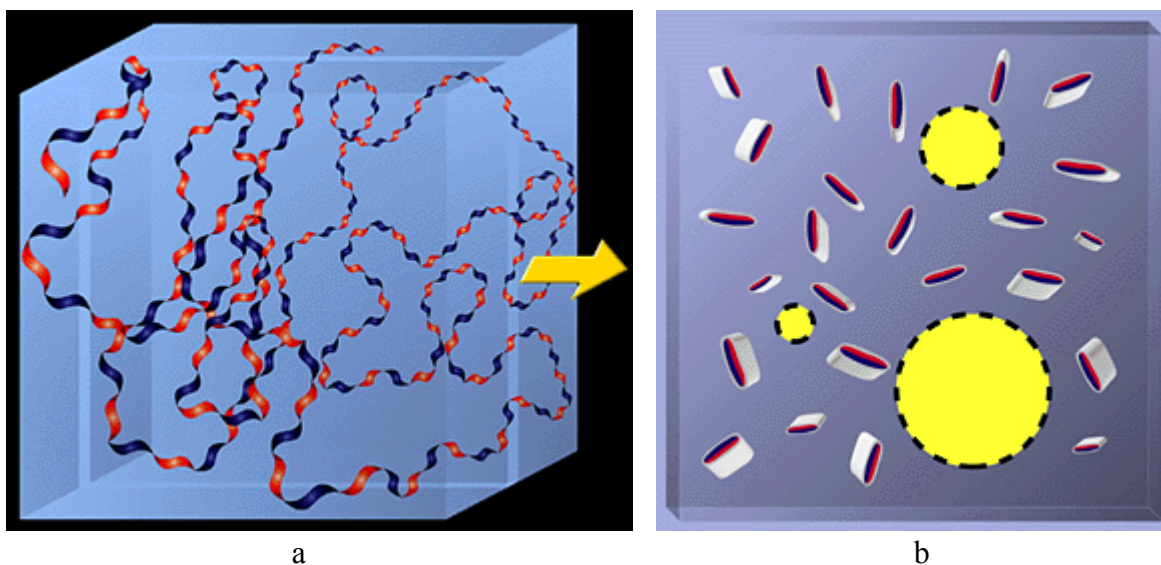
Ve fyziologickém roztoku je páteř molekuly hyaluronanu stabilizována kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a vzájemným ovlivněním s rozpouštědlem. Axiální vodíky tvoří nepolární, relativně hydrofobní fázi, zatímco rovinné řetězce tvoří polární, hydrofilní fázi, tím vytváří zkroucenou stuhovitou strukturu.

Velmi zajímavá a důležitá je doménová struktura hyaluronanu. Malé molekuly jako je voda, živiny a elektrolyt, se mohou volně šířit rozpouštědlem uvnitř domény. Zatímco velké molekuly, jako proteiny, budou částečně vyjmuty z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti v roztoku. Jak je ukázáno na obrázku 6b, síť hyaluronanu v doméně dovoluje čím dál tím méně prostoru pro molekuly větší než je on sám. To vede k pomalejšímu rozptylu makromolekul skrz síť a k jejich nižší koncentraci v síti v porovnání s úseky tvořenými okolním hyaluronanem. Zajímavé je, že řetězce hyaluronanu jsou stále v pohybu. Proto statisticky mohou existovat všechny velikosti pórů sítě, jen s různou pravděpodobností. Což znamená, že v zásadě mohou přes hyaluronovou síť projít všechny molekuly, ale s různými mírami zpoždění v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [27].

2.3.1 Struktura hyaluronanu v roztoku

Zajímavou vlastností hyaluronanu rozpuštěného v roztoku je jeho extrémně vysoká viskozita a to i při nízkých koncentracích [33]. Řetězce hyaluronanu obsahují dva typy vazeb. První, sacharidové jednotky, které relativně udržují svůj tvar. Mezi těmito rigidními jednotkami existují glykosidické vazby, které se k sobě vážou přes kyslík. A na každém glykosidickém můstku existuje několik konfigurací. Pokud toto vynásobíme počtem můstků v dlouhém řetězci, dostaneme enormní množství tvarů molekuly. Molekula vypadá jakoby byla náhodně uspořádaná, ale není.

Struktura je dvojnásobná spirála (ne dvojšroubovice, která obsahuje dva řetězce), kde hraje důležitou roli ve stabilizaci struktury voda. Tato „pásková“ struktura ukazuje mírné zakřivení v průmětu i v prostorové projekci [34].



Obr. 6 Struktura hyaluronanu v roztoku [27]

Význam této sekundární struktury je, že spirála obsahuje hydrofobní část skládající se z osmi jednotek CH (uhlíkatých jednotek), která má zhruba stejnou velikost jako kyselina oktanová. Proto má hyaluronan vlastnosti vysoce hydrofilního materiálu, ale současně obsahuje hydrofobní domény charakteristické pro lipidy, což znamená, že má hyaluronan amfifilní charakter [34].

2.3.2 Využití hyaluronanu

Vysoká kapacita zádrže vody a vysoká viskoelastická dělá z hyaluronanu jedinečný biologický materiál, který je vhodný pro různé lékařské, farmaceutické a kosmetické aplikace. V současné době se s hyaluronanem setkáváme i v běžném životě. Například díky své velké zádrži vody je hyaluronan obsažen v kosmetických produktech k tomu, aby udržel kůži mladou a svěží.

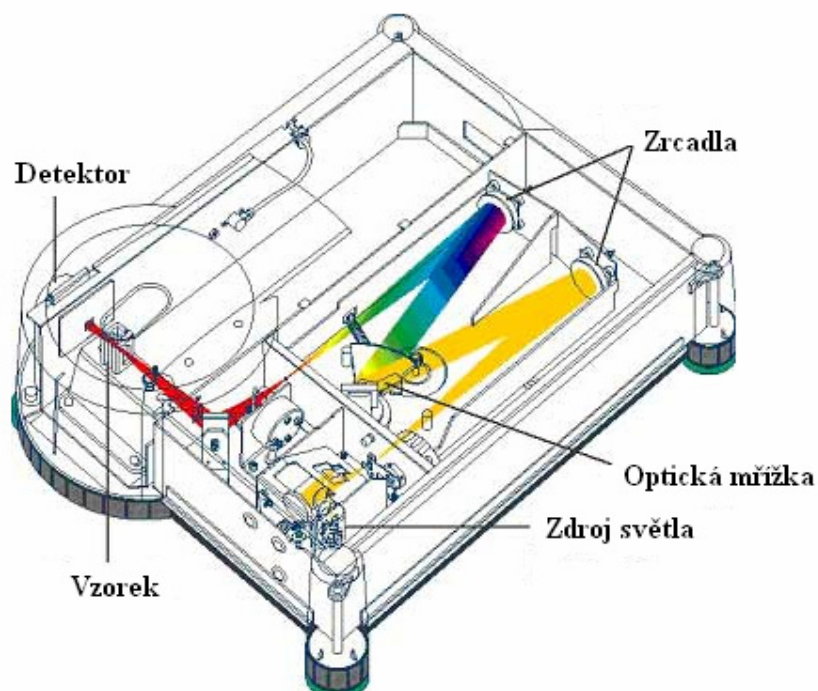
Jednou z nejúspěšnějších aplikací hyaluronanu v lékařství je jeho použití při léčbě kloubních zánětů [35]. HYA potlačuje degradaci chrupavky a vydání proteoglykanu z extracelulární matrix v tkáních chrupavky a dále chrání povrch chrupavky a redukuje vnímání bolesti.

Jako další typická aplikace hyaluronanu v lékařství je v oftalmologii [28] při operaci šedého zákalu. Při operaci je viskoelastický materiál použit pro udržení operativního prostoru a chrání rohovou vrstvu a další tkáň oka. Tím dovolí bezpečnou implantaci nové čočky a sníží riziko poškození rohovky [36].

Hyaluronan může také fungovat jako nosič pro různá léčiva, což se začíná využívat při léčbě rakoviny.

2.4 Molekulová absorpční spektroskopie v UV–VIS oblasti

Tato optická metoda patří mezi nejstarší fyzikálně-chemické metody. Vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností. Sleduje absorpci elektromagnetického záření v intervalu od 200 nm do 800 nm [37]. Paprsek prochází kyvetou, s určitou tloušťkou, naplněnou měřeným roztokem a měří se prošlé záření. Absorpční spektra v roztoku mají charakter pásů (nevýrazných píků) [38].

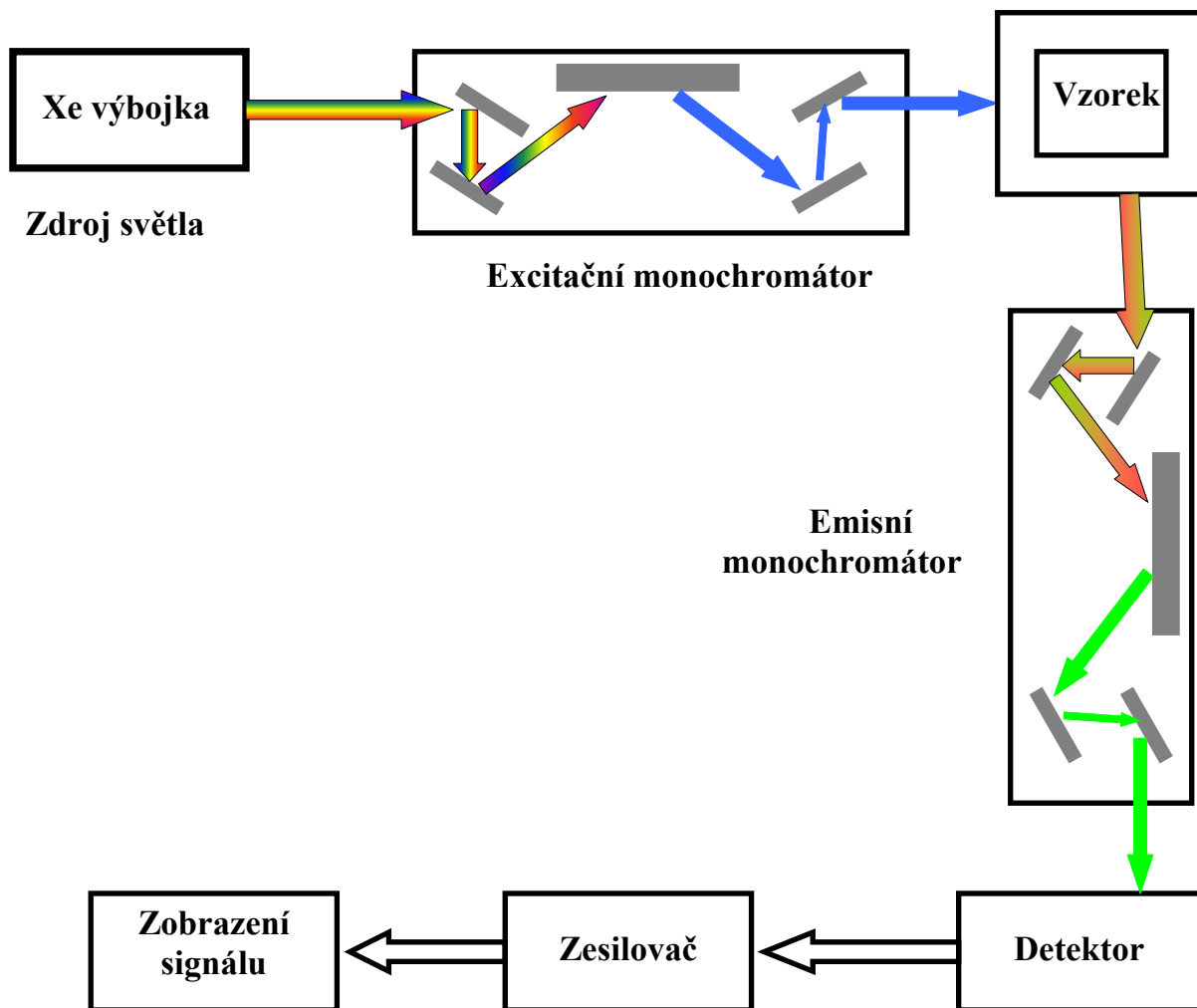


Obr. 7 Základní uspořádání pro absorpční spektroskopii

Tato metoda může být využita i pro korekci dat získaných na fluorimetru.

2.5 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescence je spektroskopická metoda spojená s přechodem elektronů na nižší vibrační hladinu základního stavu S_0 . Dochází k ní při přechodu molekuly z nulové vibrační hladiny excitovaného singletového stavu S_1 na různé vibrační hladiny základního stavu S_0 . Tento přechod vyžaduje stejnou energii, jako byla excitační energie při přechodu na nižší hladinu excitovaného stavu. V excitovaném singletovém stavu je elektron v excitovaném orbitalu spárován opačným spinem k druhému elektronu v orbitalu základního stavu, proto je návrat do základního stavu spinově dovolený a probíhá rychle emisí fotonu. Doba života fluorescence je přibližně 10 ns.



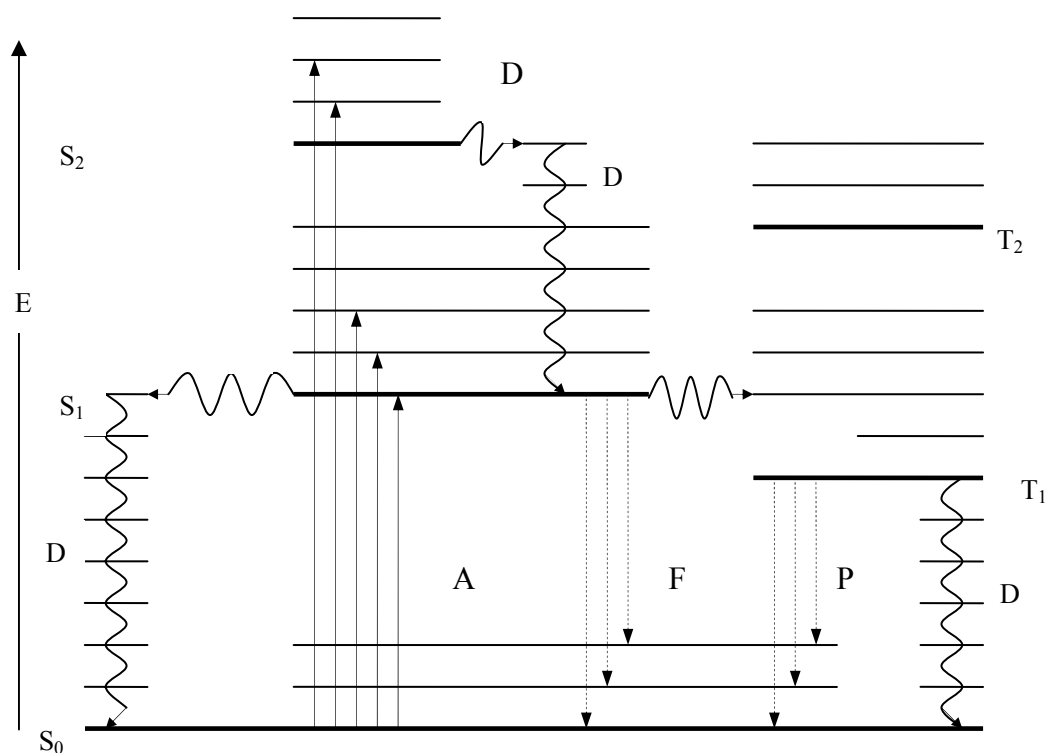
Obr. 8 Základní uspořádání pro fluorescenční spektroskopii

Energie emitovaného záření ve formě fluorescence je menší nebo rovna absorbované energii. Díky tomu je fluorescenční spektrum dané látky posunuto k vyšším vlnovým délkám oproti absorpčnímu spektru [39].

Procesy, které se vyskytují mezi absorbovaným a emisním světlem jsou obvykle ilustrovány Jabloňski diagramem. Singletové stavy jsou zobrazené v diagramu jako S_0 , S_1 a S_2 . V každé z těchto energetických hladin může fluorofor excitovat v několika vibračních energetických hladinách, označených 0, 1, 2 atd.

Pohlčení elektronu nastává u molekul s nižší vibrační energií.

Nákres Jabloňského diagramu ukazuje, že vysílání energie je menší než její pohlčení. Z toho důvodu fluorescence nastává při nižších energiích nebo při delších vlnových délkách [40].



Obr. 9 Jablonského diagram, kde *A* představuje absorbci magnetického záření, *F* vyjadřuje fluorescenci a *P* je fosforescence, *D* představuje nezářivé přechody a *E* energii

Molekuly ve stavu S_1 a S_2 můžou podstoupit rotaci, při které se změny na tripletový stav T_1 a T_2 . Vysílání elektronu z tripletového stavu je nazýváno fosforescencí a je posunutě k větším vlnovým délkám vzhledem k fluorescenci. Konverze mezi S_1 a T_1 je nazývána mezisystémovým přechodem. Přechod od T_1 zpět do singletového základního stavu je spinově zakázaný. V tomto případě má elektron v excitovaném orbitalu stejně orientovaný spin jako elektron v orbitalu základního stavu. Emise světla je tu pomalá. Doba života fosforescence se pohybuje v řádu milisekund až sekund [39].

Fluorescenční spektra nám poskytují klíč k určení pozic sondy v micelle. Je známo, že pozice sondy je důležitá k interpretaci výsledků zhášení fluorescence [9].

2.5.1 Zhášení fluorescence

Bimolekulární deaktivací mechanismy, které zahrnují přenos energie z jedné molekuly na druhou, charakterizují zhášení fluorescence [41]. Tento proces nastane, pokud je zhášec v blízkosti fluoroforu a objevují se tu dva hlavní mechanismy: elektronová výměna a nábojový transport [42]. Mechanismus zhášení závisí nejen na fluoroforu a zhášeci, ale i na vlastnostech rozpouštědla [43].

Zhášení fluorescence může být vysvětleno pomocí vibrační relaxace prvního elektronového excitovaného singletového stavu. Deaktivace z excitovaného stavu je řízena soupeřením mezi zářivými a nezářivými procesy. Rychlostní konstanta fluorescence pro fluorofor je generována prostředím molekuly [44].

Kolizní zhášení nastává, pokud je excitovaný stav fluoroforu deaktivovaný na kontaktu s nějakou další molekulou, zhášecem. V tomto případě je fluorofor vrácen zpět do základního stavu a jeho molekuly se postupem času chemicky nemění [40].

Zhášení fluorescence může nastat i díky mezimolekulové interakci mezi aromatickými chromofory, kde změna síly vazby vyvolá excitaci, při které vznikají nové vibrační režimy, které pojí excitované stavy se stavy základními [45].

Za zhášení můžou být i mylně považovány optické vlastnosti systému (vzorek, květa, etc.): například vysoká optická hustota nebo kalnost vzorku může být příčinou snížení intenzity fluorescence.

Fluorescenční zhášení solubilizované sondy v micelle je jednou z nejpoužívanějších metod ke zjištění informací o struktuře a dynamických vlastnostech micelárního systému [7]. Zhášení neutrální nebo nabitou molekulou může být použito pro rozsáhlé zjištění lokace sondy v molekule a ke studiu různých asociačních vlastností zhášeče s molekulou [10].

2.5.2 Zhášeče fluorescence

Zhášeče se používají ke snížení intenzity fluorescence v systému. Vhodný zhášeč je ten, který neovlivňuje tvar spektra, ale pouze snižuje intenzitu fluorescence s jeho zvyšující se koncentrací. Jeho molekulová a elektronová struktura je ve zhášečím mechanismu velmi podstatná (udává pozici zhášeče v micelle) [43].

Jedním z nejvýznamnějších kolizních zhášečů je molekulový kyslík, který zháší téměř všechny známé fluorofory. Fluorofor se díky kyslíku dostává do tripletového stavu. V tomto stavu se pak postupně snižuje intenzita fluorescence.

Aromatické a alifatické aminy jsou účinné zhášeče u nesubstituovaných aromatických uhlovodíků (například fluorescence anthracenu je účinně zhášena diethylanilinem). V tomto případě je příčinou zhášení fluorescence tvorba excitovaného komplexu.

Zhášení může nastat i při přidavku těžkých atomů, jako je bróm, chlór a jód nebo při přidavku halogenidových sloučenin, například jodbenzen. Tento typ zhášení charakterizoval v roce 1926 Perrin [42]. Zhášení může nastat dvěma různými způsoby:

- a) těžký atom je přítomný ve fluorescenční molekule (interní efekt těžkých atomů)
- b) těžký atom kovu je obsažen v molekule zhášeče (externí efekt těžkých atomů) [40].

Chlór je dobrým zhášečem pro indol, karbazol a jejich deriváty [2bc], jód dobře zháší intenzitu fluorescence pyrenu [43].

2.5.3 Přehled o intermolekulárních deexcitačních procesech excitačních molekul vedoucích k zhášení fluorescence

2.5.3.1 Fenomenologické přibližování

Fenomenologické přibližování nastává u intermolekulárních procesů, kde excitovaná molekula, M^* , a nějaká jiná molekula Q , zhášeč, jsou v systému konkurenti s vnitřní deexcitací molekuly M^* .

- *Případ A: Q je ve velkém přebytku*

V tomto případě je vysoká pravděpodobnost, že v čase excitace bude Q a M^* ve vzdálenosti, kde je významná interakce.

Pokud je tu pravděpodobnost nalezení zhášeče menší než 1, jedná se o statické zhášení. V okamžiku setkání Q disociuje s M^* .

Pokud je tu pravděpodobnost nalezení zhášeče rovna 1, je to příklad fotoindukčního přenosu protonu ve vodných roztocích z excitované kyseliny M^* . M^* je ve chvíli setkání ve funkci příjemce protonu.

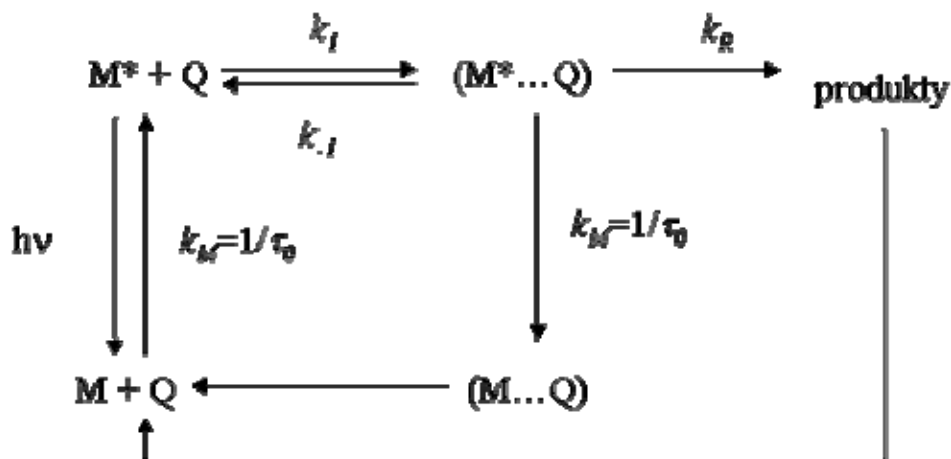
- *Případ B: Q není ve velkém přebytku*

V tomto případě Q a M* nejsou během doby fluorescence v kontaktu. Zhášení se tu pak může vyskytovat jen pokud jsou mezimolekulové interakce ve vzdálenostech, které jsou kratší než kolizní vzdálenost.

- *Případ C: Q není ve velkém přebytku, ale interakce mezi Q a M* je možná během doby fluorescence*

Tento případ je označený jako dynamické zhášení. Zde je bimolekulární excitovaný proces řízený difúzí.

Pokud je Q identické s M*, jedná se o samozhášení bez vytvoření produktů. Meziprodukt (MM)* je pak nazývaný excimerem [39].



Obr. 10 Efekt mezimolekulových fotofyzikálních procesů na vysílání fluorescence, kde k_1 je rychlostní konstanta druhého řádu pro tvoření páru ($M^* \dots Q$), k_{-1} je rychlostní konstanta zpětné reakce prvního řádu, k_R je rychlostní konstanta prvního řádu, $k_M = (1/\tau_0)$ je rychlostní konstanta pro skutečnou deexcitaci M^* a $h\nu$ je zářivá energie.

Můžou nastat tři případy rychlostní konstanty k_R :

- 1) $k_R > k_1, Q, k_{-1}, 1/\tau_0$. Tato reakce je difúzně omezená a pozorovaná rychlostní konstanta pro zhášení, k_q , je rovna rozptylu rychlostní konstanty k_1 .
- 2) $k_R < k_1, Q, k_{-1}, 1/\tau_0$. V tomto případě je rovnováha reakce dosažena před tvořením produktů.
- 3) $k_R \leq k_1, Q, k_{-1}, 1/\tau_0$. Zde je $k_q < k_1$. Pak můžeme napsat $k_q = p k_1$, kde p je pravděpodobnost setkání párů v reakci, často nazývaná jako efektivita.

2.5.4 Dynamické zhášení

Excitované molekuly, které jsou v době excitace v krátké vzdálenosti od zhášeče Q, interagují s ním v průměru v kratších časech než ty, které jsou víc vzdáleny, protože vzájemný přístup vyžaduje delší čas před začátkem interakcí. Takovéto přechodné jevy nejsou důležité pro mírné koncentrace zhášeče v rozpouštědle, ale pro větší koncentrace významné jsou. Následkem těchto přechodných jevů je Stern-Volmerův vztah.

Větší teplota má za následek větší koeficient difúze, bimolekulární zhásecí konstanty se zvyšují se zvyšující se teplotou (rovnice 1) [46].

Stern-Volmerův vztah je obvykle dán $\frac{\phi_0}{\phi}$ ku $[Q]$, protože se očekává, že $\frac{\phi_0}{\phi}$ bude lineárně závislé na koncentraci.

Je důležité podotknout, že pozorování lineárního Stern-Volmerova vztahu neprokáže, že nastalo dynamické zhášení fluorescence. I statické zhášení, jak je uvedené níže, má za následek lineární Stern-Volmerův vztah.

2.5.4.1 Stern- Volmerův vztah

$$\frac{\phi_0}{\phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

- Φ_0 je kvantový výtěžek fluorescence bez přítomnosti zhášeče
- Φ je kvantový výtěžek fluorescence v přítomnosti zhášeče
- I_0 je intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášeče
- I je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášeče
- τ_0 je doba života excitovaného stavu za nepřítomnosti zhášeče
- $[Q]$ představuje koncentraci zhášeče
- K_{SV} je Stern-Volmerova zhášecí konstanta [47]

- Stern-Volmerova konstanta:

$$K_{SV} = k_q \cdot \tau_0 \quad (2)$$

$$K_{SV} = \frac{k_{qe}}{k_E} \quad (3)$$

- k_q je bimolekulární zhášecí konstanta
- k_{qe} je konstanta kolizního zhášení
- k_E je konstanta excitovaného stavu

Pokud víme, že se bude jednat o dynamické zhášení, bude Stern-Volmerova zhášecí konstanta značená K_D [48].

2.5.5 Statické zhášení

Termín statické zhášení naznačuje buď excitaci sféry efektního zhášení nebo tvoření základního stavu nefluorescenčního komplexu. Při tvoření nefluorescentních komplexů mezi fluoroforem a zhášečem komplex absorbuje světlo a ihned se vrací do základního stavu bez vysílání fotonu.

Závislost intenzity fluorescence na koncentraci zhášeče je snadno odvozena z disociační konstanty pro tvorbu komplexů. Tato konstanta je dána:

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (4)$$

- $[F-Q]$ je koncentrace komplexu
- $[F]$ je koncentrace fluoroforu
- $[Q]$ je koncentrace zhášeče

Pokud se jedná o nefluorescenční komplex, pak zlomek fluorescence $\frac{\phi_0}{\phi}$, která zůstává,

říká, že celková koncentrace fluoroforu je dána vztahem:

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (5)$$

Po dosažení $[F]_0$ do disociační konstanty dostaneme:

$$K_s = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (6)$$

Z rovnic 5 a 6 dostaneme vztah pro intenzitu fluorescence:

$$\frac{\phi_0}{\phi} = 1 + K_s [Q] \quad (7)$$

Z tohoto vztahu vyplívá, že závislost $\frac{\phi_0}{\phi}$ na koncentraci je lineární a je identická s pozorovaným dynamickým zhášením, jen zhášecí konstanta je nahrazena disociační konstantou.

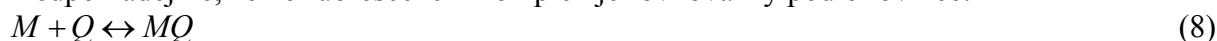
Molekuly zodpovědné za statické zhášení jsou například chinony, hydrochinony, puriny a pyrimidiny [39].

2.5.5.1 Excitace sféry efektivního zhášení

Nastává, pokud M^* a Q nemůže v době excitace měnit úměrně k sobě své pozice v prostoru. Perrin navrhl model, který předpokládá, že zhášení fluorescence je kompletní, pokud je Q umístěné uvnitř sféry objemu V_q v prostředí M . Pokud je zhášeč vně aktivní sféry, nemá to žádný vliv na M . Proto je intenzita fluorescence v roztocích snížena při přidání Q , ale fluorescence rozkladu po impulsní excitaci je nezměněna [39].

2.5.5.2 Tvoření základního stavu nefluorescenčních komplexů

Předpokládejme, že nefluorescenční komplex je rovnovážný podle rovnice:



Délka excitovaného stavu nekomplexního M je neovlivněná v kontrastu s dynamickým zhášením. Intenzita fluorescence se snižuje s přidáním Q , ale fluorescence rozkladu po impulsní excitaci je nezměněna [39].

2.5.6 Určení statického a dynamického zhášení

Charakteristický rys Stern-Volmerovy rovnice při kombinovaném zhášení ukazuje stoupající zakřivení vyduťtým směrem k ose y . Pak je dán poměr fluorescence vztahem:

$$\frac{\phi_0}{\phi} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \quad (9)$$

Statické a dynamické zhášení se dá rozpoznat jejich odlišnou závislostí na teplotu a viskozitu. Vyšší teplota má za následek rychlejší rozptyl, což znamená, že je tu větší množství dynamického zhášení. Vyšší teploty mají za následek odloučení slabě vázaných komplexů a proto se tu vyskytuje menší množství statického zhášení [40].

Pro rozlišení statického a dynamického zhášení je nejvhodnější metoda měření fluorescence po celou dobu života. Statické zhášení odstraňuje zlomek fluoroforu. Komplexní fluorofory jsou nefluorescentní a jediný pozorovaný fluorescein je z nekomplexního

fluoroforu. Proto pro statické zhášení platí $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$, ale pro dynamické zhášení platí $\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{\phi_0}{\phi}$ [39].

2.5.7 Využití zhášeců v praxi

Jak u statického tak i u dynamického zhášení, musí být fluorofor a zhášec v kontaktu. Tento fakt nám umožňuje četné aplikace zhášení v praxi. Například, zhášecí měření můžou odhalit přístupnost fluoroforu ke zhášeci. Pokud fluorofor umístíme v interiéru membrány nebo proteinu, které jsou pro zhášec nepropustné, pak se nemůže vyskytovat žádné, dynamické ani statické, zhášení.

Efektivní vzdálenost ($\sqrt{\Delta x^2}$), přes kterou se zhášec může rozptýlit během celé doby excitovaného stavu (τ), je daná vztahem:

$$\left(\sqrt{\Delta x^2}\right) = \sqrt{2D\tau} \quad (10)$$

kde D je koeficient difúze. Z tohoto důvodu může zhášení fluorescence odhalit rozptýl zhášeců přes mírně velké vzdálenosti, které jsou srovnatelné s velikostí proteinů a membrán [40].

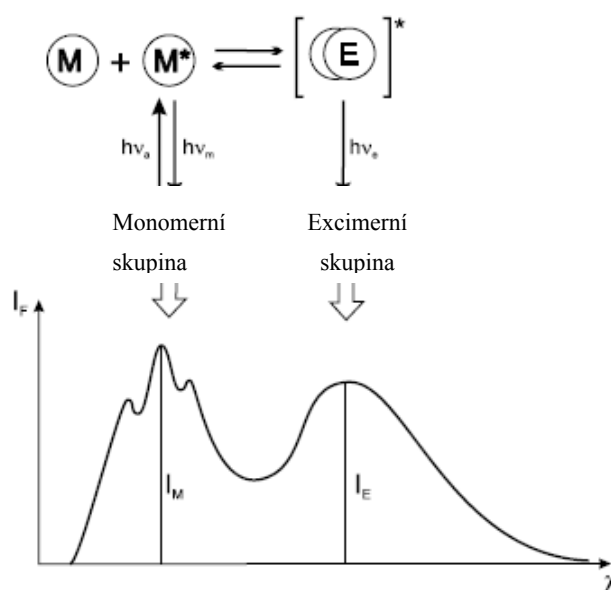
2.5.8 Fotoindukovaný přenos elektronů

Fotoindukovaný transport elektronů (PET) je často zodpovědný za fluorescenční zhášení. Je zapojen do četných organických fotochemických reakcí (fotosyntéza, umělé systémy pro konverzi sluneční energie).

Fluorescenční zhášecí experimenty poskytují užitečný náhled do přestupných procesů elektronů, které se vyskytují v těchto systémech [39].

2.5.9 Tvorba excimerů a exciplexů

Fluorescence excimeru je umístěna ve vyšších vlnových délkách než u monomeru a neukáže vibraci skupiny. Excimery tvoří aromatické uhlovodíky jako je například naftalen nebo pyren.



Obr. 11 Excimerní formace s odpovídající monomerní a excimerní skupinou [39]

Nižší pík na obrázku 11 představuje odpuzující energii mezi dvěma molekulami v základním stavu. Horní pík, který je vztažený ke dvěma molekulám (jedna z nich je v základním stavu), ukazuje minimum tvoření excimeru, ve kterém jsou dva aromatické kruhy v určité vzdálenosti.

Pokud jsou dva monomery propojeny krátkým volným řetězcem, mohou být vytvořeny intramolekulární excimery.

Exciplexy jsou komplexy v excitovaném stavu. Jsou vytvořeny střetem excitované molekuly (donorem nebo akceptorem elektronu) s rozdílnou neexcitovanou molekulou (akceptor nebo donor elektronu).



Jako příklad exciplexu můžeme uvést excitovaný stav komplexu antracenu a N,N-diethylanilinu. Tento proces spočívá v přenosu elektronu z amino molekuly na excitovanou antracenovou molekulu. V nepolárních rozpouštědlech, jako je hexan, je zhášení doprovázeno širokými strukturami emisních skupin a exciplexní pás je ve vyšších vlnových délkách než u antracenu.

Tvoření excimerů a exciplexů jsou rozptylově řízené procesy. Fotofyzikální efekty jsou tak objevené v relativně vysokých koncentracích, to znamená, že se během celé doby excitace objevuje dostatečné množství srážek [39].

2.5.10 Fotoindukovaný protonový transfér

Molekuly vody jsou tu ve funkci buď akceptoru nebo donoru protonu, molekula bude tedy v blízkém kontaktu s kyselinou nebo bude poskytovat základ excitovanému stavu deprotonizace nebo protonizace.

Kyselé nebo zásadité vlastnosti molekuly, která absorbuje světlo, nejsou stejné v základním a excitovaném stavu. Jedním z možných příčin tohoto pozorování může být přerozdělení elektronické hustoty. Nejzajímavější případy jsou ty, kde jsou kyseliny a zásady silnější v excitovaném stavu než ve stavu základním. V těchto případech může excitace spustit fotoindukovaný přenos protonu. Pak kyselý charakter akceptoru protonu může být excitací zvětšený tak, že pK^* této skupiny v excitovaném stavu je mnohem nižší než pK ve stavu základním.

Přenos protonu během celého excitovaného stavu závisí na relativních rychlostech elektronu [39].

2.5.10.1 Stanovení excitovaného stavu pK^*

Pokud je excitace kyseliny silnější v excitovaném stavu než ve stavu základním ($pK^* < pK$), je rovnovážná konstanta excitovaného stavu rovna:

$$K^* = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (13)$$

- k_1 je rychlost reakce
- k_{-1} je rychlost zpětné reakce

- *Určení prostřednictvím Försterova cyklu*

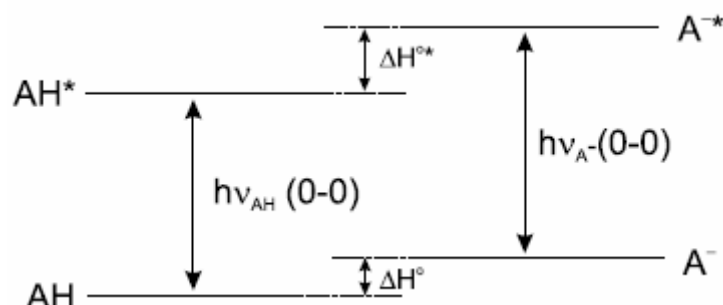
pK^* může být spolu se spektroskopickými měřeními stanoveno přes Försterův cyklus.

$$N_a h \nu_{AH} + \Delta H^{0*} = N_a h \nu_{A^-} + \Delta H^0 \quad (14)$$

- ΔH^{0*} a ΔH^0 je standardní molární ionizační entalpie AH a AH*
- $h\nu_{AH}$ a $h\nu_{A^-}$ jsou energetické rozdíly mezi excitovaným a základním stavem AH a A⁻
- N_a je Avogadrova konstanta.

Tato rovnost pak může být přepsána jako:

$$\Delta H^{0*} - \Delta H^0 = N_a (h\nu_{A^-} - h\nu_{AH}) \quad (15)$$



Obr. 12 Försterův cyklus [39]

Pokud budeme předpokládat, že se ionizační entropie rovná rozdílu mezi entalpiemi, můžeme standardní vlnovou (Gibbsovu) energii psát jako:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = 2,3RTpK \quad (16)$$

$$\Delta G^{0*} = -RT \ln K^* = 2,3RTpK^* \quad (17)$$

- R je plynová konstanta
- T je absolutní teplota.

Ze vztahů 14-17 a převedením četností do vlnových délek dostáváme vztah:

$$pK^* - pK = 2,1 \cdot 10^{-3} (\bar{\nu}_{A^-} - \bar{\nu}_{AH}) \quad (18)$$

Tato rovnice ukazuje, že emisní pás základní formy je umístěný ve vyšších vlnových délkách než emisní pás kyselé formy. pK^* je menší než základní stav pK a AH* je silnější kyselina než AH.

Použití Försterova cyklu je obtížné pokud:

- se dva absorpční pásy překrývají
- se převrátí elektronická úroveň během excitovaného stavu
- mají excitované kyselé a zásadité formy různý počet orbitalů
- jsou změny na excitaci, v momentě dipólu, různé v kyselé a v zásadité formě

- *Měření Steady state*

Pokud je v době excitace ustálena rovnováha, hodnota excitovaného stavu pK^* se může určit fluorimetrickou titrací pomocí rovnice:

$$\frac{\phi}{\phi_0} = \frac{1}{k_1 \tau_0} + \frac{k_{-1} \tau_0'}{k_1 \tau_0} [H_3O^+] \quad (19)$$

- τ_0 a τ_0' jsou doby excitovaného stavu
- k_1 a k_{-1} jsou rychlostní konstanty

- *Určení rychlostní konstanty pomocí zvoleného času*

Je to nejspolehlivější metoda na určení rychlostních konstant k_1 a k_{-1} . Je založena na experimentálně zvoleném čase. Poskytuje hodnotu délky života excitovaného stavu, ze které se pak stanovují k_1 a k_{-1} [39].

2.5.11 Přenos excitované energie

Energetický přenos z excitované molekuly (z donoru) na molekulu, která je chemicky různá (akceptor), se nazývá heterogenní přenos. Tento proces je možný pokud vysílané spektrum donoru částečně překrývá absorpční spektrum akceptoru.



Pokud jsou donor a akceptor identické, jedná se o homogenní přenos.

Pokud se proces může opakovat sám, excitace se stěhuje přes několik molekul, jedná se o transport excitace [39].

2.5.11.1 Zářivý přenos energie

Je to dvoufázový proces, kdy je foton emitovaný donorem (D) zachycený akceptorem, který je chemicky různý (A) nebo identický (D). Je pozorovaný, pokud je průměrná vzdálenost mezi donorem a akceptorem větší než vlnová délka. U tohoto procesu záleží na spektrálním překrytí a na koncentraci.

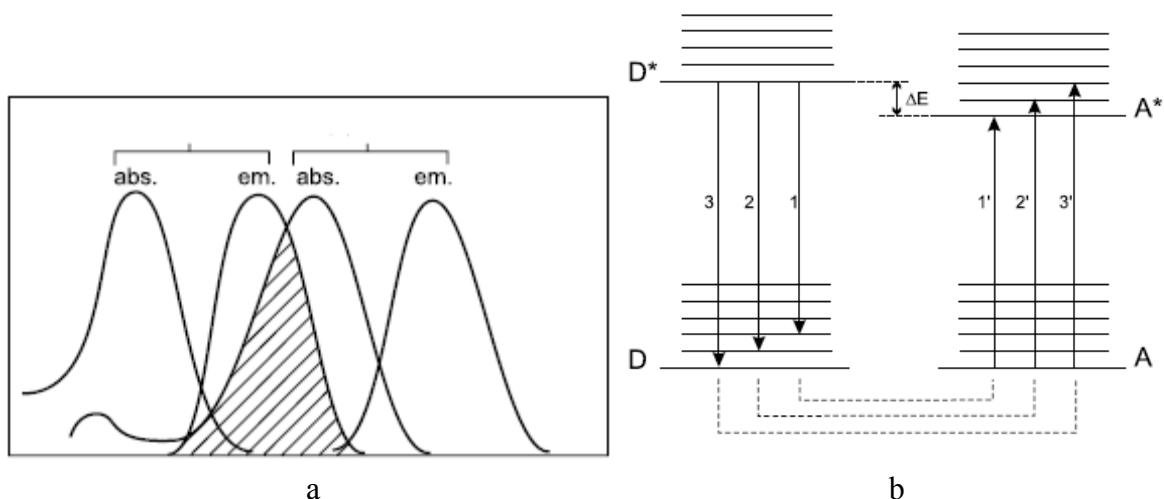


Má za následek snížení intenzity fluorescence donoru v regionu spektrálního překrytí [39].

2.5.11.2 Nezářivý přenos energie

K excitaci nezářivým přenosem energie (RET – resonance energy transfer) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie tedy nedochází k emisi světla donorem.

Nezářivý přenos excitační energie vyžaduje interakci mezi molekulou donoru a akceptoru. Přenos nastává, pokud se emisní spektrum donoru překrývá s absorpčním spektrem akceptoru (Obr. 13a) tak, aby některé vibrační přechody měly prakticky stejnou energii, jako odpovídající přechody v akceptoru. Takové přechody jsou spřažené, neboli rezonanční (obr. 13b) [39].



Obr. 13 a) spektrální překryv donoru a akceptoru, b) energie vibračních přechodů donoru a akceptoru [39]

Přenos energie může vyplývat z různých mechanismů interakce. Vzájemné ovlivnění mohou být způsobeny coulombickými silami a nebo mezimolekulovým orbitálním překrytí.

2.6 Agregační číslo

Agregační číslo vyjadřuje počet molekul tenzidu podílejících se na struktuře micely. Je jedním z charakteristických znaků micely [20].

Agregační číslo se určuje pomocí zhášení fluorescence sondy zabudované do micely [49], kde se rychlost zhášení snižuje se zvětšujícím se agregačním číslem [50]. Můžeme ho získat pomocí zjištěné doby zhášení fluorescence (TRFQ)(rovnice 24-27), nebo pomocí poměru intenzit fluorescence bez a s přítomností zhášeče (rovnice 28) [51].

$$I(t) = A_1 \exp\{-A_2 t - A_3 [1 - \exp(-A_4 t)]\} \quad (24)$$

$$- A_1 = I_0$$

- parametry A_2 až A_4 dostaneme:

$$A_2 = k_0 + \frac{k^+ k_{qm} [Q]}{(1 + K[M])(k^- + k_{qm})} = k_0 + S_2 [Q] \quad (25)$$

$$A_3 = \frac{k_{qm}^2 [Q]}{(k^- + k_{qm})^2 \left(\frac{1}{K} + [M] \right)} = S_3 [Q] \quad (26)$$

$$A_4 = k_{qm} + k^- \quad (27)$$

- k_0 je rychlostní konstanta fluorescence za nepřítomnosti zhášeče

- k_+ a k_- jsou rychlostní konstanty zhášeče při vstupu a výstupu z micely v tomto pořadí,

- $K = \frac{k^+}{k^-}$ je rovnovážná konstanta zhášeče vázaná k micelle

- k_{qm} je rychlostní konstanta zhášení fluorescence uvnitř micely

- $[Q]$ a $[M]$ jsou koncentrace zhášeče a micel v tomto pořadí [18].

$$\frac{I_0}{I} = \exp\left(\frac{[Q]}{[M]}\right) \quad (28)$$

- I_0 a I jsou intenzity fluorescence bez a v přítomnosti zhášedce.

Z těchto vztahů můžeme zjistit koncentraci micely, z které pak určíme agregační číslo pomocí vztahu:

$$N_{agg} = \frac{c_{tenzidu} - CMC}{[M]} \quad [52] \quad (29)$$

Agregační číslo se určuje pomocí lineární závislosti koncentrace zhášedce na intenzitě fluorescence [24]:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \frac{N_{agg} [Q]}{[S] - CMC} \quad (30)$$

- $[Q]$ je koncentrace zhášedce

- $[S]$ je koncentrace tenzidu

- CMC je kritická micelární koncentrace [12] (30)

První, kdo použili metodu zhášení fluorescence ke zjištění agregačního čísla v micelle byly Turro a Yekta [53]. Určení agregačního čísla se podle nich řídí následujícími předpoklady:

- micely musí být monodisperzní

- sonda a zhášedce musí být hydrofobní a lokalizované v micelách

- pozorovaná fluorescence je vydána ze sondy lokalizované v micelle

- náhodné spojení sondy a zhášedce s micelami je popsáno Poissonovou rovnicí [54]:

$$P_n = \frac{x^n}{n!} \exp(-x) \quad (31)$$

- n vyjadřuje množství zhášedce

Agregační číslo může ovlivnit druh [55] a koncentrace tenzidu. Při vysokých koncentracích se agregační číslo zvyšuje. Dále se tato hodnota může snížit, pokud je $k_{qm} < k_0$, to je dané extrémně vysokou mikroviskozitou micelárního jádra. Agregace číslo ovlivňuje i teplota, čím je vyšší teplota, tím je vyšší agregační číslo [20].

Agregační číslo je ovlivněné i přidávkem soli. Pokud přidáme do roztoku sůl, výrazně se sníží CMC, což znamená, že agregační číslo bude větší [24].

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Již řadu let se vědci snaží vyrobit účinný lék na nádorová onemocnění, který by měl minimální vedlejší účinky na celý organismus, jako je například leukopenie, vypadávání vlasů, akutní poškození ledvin, chronická neurotoxicita, nevolnost [13] a anemie. Proto je v současné době věnována velká pozornost cílené distribuci léčiv. Je tu potřeba najít vhodnou nosičovou částici, která by reagovala se specifickým místem účinku, dokázala by na sebe vázat léčivo dostatečně pevně, aby bylo doručeno na dané místo, ale taky dostatečně slabě, aby na specifickém místě byla schopna léčivo uvolnit. Tato nosičová částice by dále měla být biokompatibilní a biodegradabilní, aby sama nezatěžovala organismus. Jednou z takových látek je hyaluronan [56].

Nejen že nádorové buňky obsahují hyaluronan, ale bylo zjištěno, že některé druhy tumoru na sebe vážou hyaluronan lépe než normální zdravá tkáň. To je způsobeno tím, že tyto druhy tumoru v sobě obsahují velké množství CD44 a RHAMM receptorů [57], které patří mezi primární receptory hyaluronanu [58] a taky tím, že tyto buňky potřebují HYA ke svému dalšímu růstu [59]. Toto zjištění vede k vytvoření předklinického konjugátu léčivo-hyaluronan, který by měl eliminovat systémovou cytotoxicitu. *Cai S. a spol* zkoumali konjugát cisplatin-hyaluronan, který je využit v chemoterapii při léčbě lymfatických uzlin. Zjistili, že tento konjugát snižuje systémovou cytotoxicitu a zvyšuje koncentraci léčiva (cisplatinu) přímo v tumoru [56]. *Bergamin M. a spol* zkoumali účinek konjugátu HYA - MTX, hyaluronan-methotrexat, na karcinom jater. Zjistili, že za použití konjugátu má léčivo vyšší účinek než v případě použití jen volného MTX. Tento efekt byl tím větší, čím byla vyšší koncentrace receptoru CD44 v tumoru [60].

Protože je HYA vysoce hydrofilní molekula a některé cytotoxické léčiva jsou hydrofobní povahy, tenzidy jsou často používané látky ke zlepšení rozpustnosti léčiva. Proto je velmi důležité porozumění interakcí polymer-tenzid. Sílu těchto interakcí ovlivňuje spousta faktorů, jako je například iontový charakter, hydrofilní/hydrofobní povaha, konformace a flexibilita polymeru [61]. Je pochopitelné, že polyelektrolyty a tenzidy s opačnými náboji tvoří pevnější spojení díky iontovým interakcím než polyelektrolyty a tenzidy se stejnými náboji [62]. Z literárních rešerší [33] bylo zjištěno, že s hyaluronanem interagují tenzidy, které mají v alkylovém řetězci více než deset uhlíků a že k jejich navázání stačí jen velmi malá koncentrace tenzidu. Pro tenzidy s kratším řetězcem je tvorba volných micel energeticky preferována před navázáním na hyaluronan. Dále se autoři domnívají, že interakce hyaluronanu a kationaktivních tenzidů (CTAB) vede ke tvorbě agregátů podobných micelám, které jsou navázány na řetězci polyelektrolytu, avšak jsou menší než odpovídající volné micely. Tento model je označován jako struktura perlového náhrdelníku „pearl necklace“.

Fluorescenční spektroskopie je hojně používanou metodou ke zkoumání interakcí tenzidů s jinými molekulami [9], [16], [10], [61]. Jako nejvhodnější fluorescenční sondy pro zjištění některých agregačních charakteristik (CMC, *Nagg*, ...) byly vybrány pyren [7], [61], [30] a nilská červeň [63].

Zjištění agregačního čísla pomocí metody zhášení fluorescence [64] lze provést dvěma měřicími modely. První, koncentrace tenzidu je konstantní a mění se koncentrace zhášeče. Pak je *Nagg* stanoveno z lineární závislosti $\ln(\Phi_0/\Phi)$ a koncentrací zhášeče. Druhá metoda, koncentrace zhášeče je konstantní a mění se koncentrace tenzidu. *Nagg* je pak stanoveno z lineární závislosti $\ln(\Phi_0/\Phi)$ a $[S]^{-1}$ [11].

Zjištění agregačního čísla pomocí zhášení fluorescence bylo využito například v pracích [55] a [65], kde bylo použito 9-methyl anthracenu jako zhášeče, fluorescenční sondy Ru(bipy)₃Cl₂ a tenzidu SDS. Dále v práci [11] bylo zjištěno agregační číslo několika druhů tenzidů (CTAB, TritonX-100,...) za použití fluorescenční sondy 2-anthracen sulfonátu a CPC jako zhášeče.

Tabulka 1 Přehled hodnot agregačního čísla CTAB z literatury

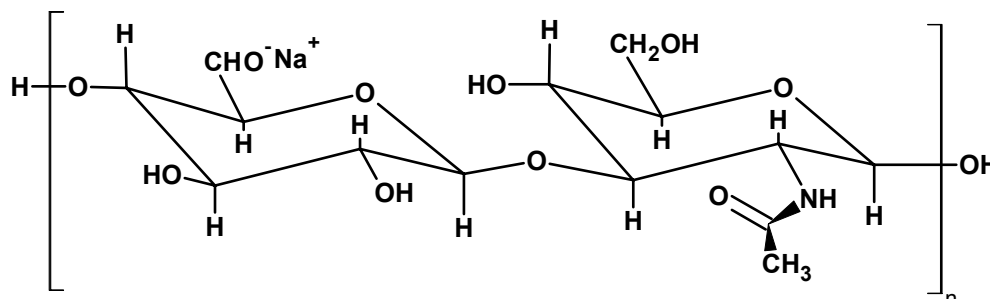
	Rozpouštědlo	CMC (mM)	<i>Nagg</i>
2 mM CTAB ^(a)	voda	1	81 ± 3
2 mM CTAB ^(a)	0,01 M NaOH	0,52	121 ± 7
2 mM CTAB ^(b)	voda	---	78
2 mM CTAB ^(c)	voda	---	90
2 mM CTAB ^(d)	voda	---	90
10 mM CTAB ^(e)	0,9 % NaCl	0,08	55 ± 1
10 mM CTAB ^(f)	0,9 % NaCl	---	61

- (a) [7]
- (b) [66]
- (c) [66]
- (d) [66]
- (e) [11]
- (f) [67]

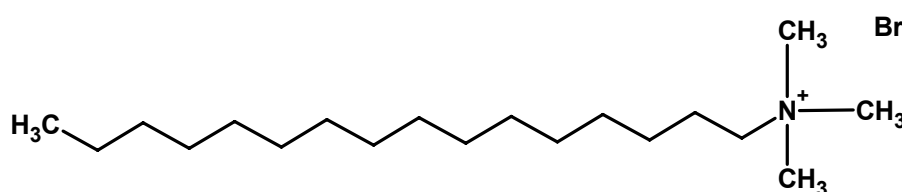
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

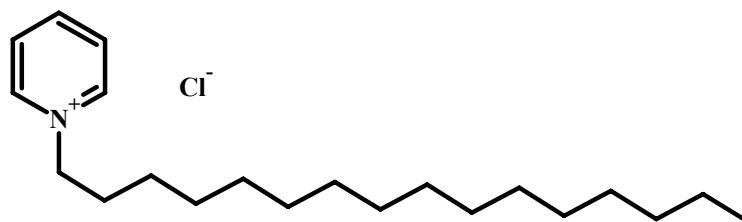
Hyaluronan HYA $M_w = 650$ kDa, nativní, šarže 280407-D1
HYA $M_w = 1,434$ MDa, nativní, šarže 210306-D2



Tenzid CTAB, cetyltrimethylammonium bromide, CAS: 57-09-0, Fluka, Ultra $\geq 99,0$ %, šarže 117K0732

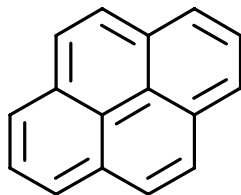


Zhášeeče CPC, cetylpyridinium chloride, CAS: 6004-24-6, Sigma Aldrich, Ultra $\geq 99,0$ %, šarže 075K0200



I_2 , Jód, CAS: 7553-56-2, Sigma Aldrich, Ultra $\geq 99,8$ %

Fluorescenční sondy pyrene, CAS: 129-00-0, Fluka, puriss p.a. for fluorescence, šarže 430166/1



Rozpouštědla Voda, Mili-Q voda (Milipore Academic)
Aceton, LachNer s.r.o., p.a., Ultra $\geq 99,5$ %)

Ostatní NaN_3 , azid sodný, CAS: 26628-22-8, LachNer s.r.o., p.a., šarže 311860902

NaCl , chlorid sodný, CAS: 7647-14-5, LachNer s.r.o., p.a., šarže PP/2009/06278

KH_2PO_4 , dihydrogenfosforečnan draselný, CAS: 7778-77-0, Lachema a.s., p.a., šarže 40155039

Na₂HPO₄, hydrogenfosforečnan sodný, CAS: 7558-79-4, LachNer s.r.o.,
Ultra ≥ 99,0 %, šarže 304660306

Na₂S₂O₃, thiosíran sodný, CAS: 7772-98-7, Sigma Aldrich
škrobový roztok (1% in water), indicator, ID: 24888425, Sigma Aldrich

KI, jodid draselný (20%), CAS: 7681-11-0, Sigma Aldrich

HCl, kyselina chlorovodíková (1 mol·dm⁻³), CAS: 7647-01-0, Fluka

4.2 Příprava zásobních roztoků

4.2.1 Zásobní roztoky pyrenu

Zásobní roztok pyrenu 1 byl připraven tak, aby po rozpuštění v acetonu byla jeho koncentrace 10⁻⁴ M. Zásobní roztok pyrenu 2 byl připraven tak, aby po rozpuštění v acetonu byla jeho koncentrace 1,48·10⁻⁶ M.

4.2.2 Zásobní roztok jódu

Do skleněné uzavíratelné nádoby bylo vloženo několik šupinek jódu, které byly potom zalaty vodou. Takto připravená směs byla vložena na magnetickou míchačku s ohřevem, kde se nechala míchat při teplotě 60°C přes noc. Pak byl roztok zfiltrován. Konečná koncentrace vodného roztoku jódu byla stanovena jodometrickou titrací pomocí Na₂S₂O₃.

4.2.3 Zásobní roztoky tenzidů

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství CPC tak, aby po rozpuštění ve vodě byla koncentrace zásobního roztoku 2·10⁻³ M.

Na předvážkách bylo naváženo potřebné množství CTAB tak, aby po rozpuštění ve vodě, pufru a nebo fyziologického roztoku byla koncentrace zásobního roztoku 0,1 M. Z tohoto zásobního roztoku byly potom připraveny roztoky o potřebné koncentraci (1,25 mM, 12,5 mM a 37,5 mM).

4.2.4 Zásobní roztok azidu sodného

Zásobní roztok azidu sodného byl připraven tak, aby po rozpuštění ve vodě byla jeho koncentrace 0,5 M.

4.2.5 Zásobní roztok pufru (pH=7)

6,805 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo rozpuštěno v 500 mL vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (44,09 g hydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v 500 mL vody). Pufr byl stabilizován vodným roztokem azidu sodného (na 100 mL pufru, 1 mL roztoku azidu sodného).

4.2.6 Zásobní roztok fyziologického roztoku

Na předvážkách bylo naváženo potřebné množství chloridu sodného tak, aby po rozpuštění ve vodě byla koncentrace zásobního roztoku 0,15 M.

4.2.7 Zásobní roztoky hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství hyaluronanu (M_w=1,4 MDa) tak, aby po rozpuštění ve vodě byla koncentrace zásobního roztoku 100 mg·dm⁻³. Dále bylo na

analytických vahách naváženo takové množství hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa), aby po rozpuštění v pufru nebo fyziologickém roztoku byla koncentrace zásobního roztoku $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pak bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství hyaluronanu ($M_w = 650$ kDa) tak, aby po rozpuštění ve vodě nebo fyziologickém roztoku, byla koncentrace zásobního roztoku $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.3 Příprava vzorků k měření

4.3.1 Příprava vzorků ke zjištění agregačního čísla

4.3.1.1 Vzorky 1 mM CTAB

Do vialek bylo odpipetováno $\sim 170 \mu\text{L}$ zásobního roztoku pyrenu 2. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 1,25 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–50 μL , přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

Do vialek bylo napipetováno 30 μL zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 1,25 mM roztoku CTAB rozpuštěného v pufru nebo fyziologickém roztoku. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–140 μL , přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.2 Vzorky 10 mM CTAB

Do vialek bylo napipetováno 50 μL zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě, pufru nebo fyziologického roztoku. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–200 μL , přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou, pufrem nebo fyziologickým roztokem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

Dále bylo do vialek odpipetováno 50 μL zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Potom byl připipetován zásobní roztok CPC v rozsahu 0–190 μL , přičemž koncentrace zásobního roztoku CPC byla 2 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny daným rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.3 Vzorky 30 mM CTAB

Do vialek bylo napipetováno 60 μL zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 37,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě, pufru nebo fyziologického roztoku. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–300 μL , přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou, pufrem nebo fyziologickým roztokem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.4 Vzorky 1 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa)

Do vialek bylo odpipetováno ~170 μ L zásobního roztoku pyrenu 2. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 1,25 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě. Pak bylo přidáno 0,25 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–150 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

Do vialek bylo odpipetováno 50 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 1,25 mM roztoku CTAB rozpuštěného v pufru a nebo fyziologickém roztoku. Pak bylo přidáno 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného pufru nebo fyziologickém roztoku. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–220 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny daným rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.5 Vzorky 10 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa)

Do vialek bylo odpipetováno 60 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku. Pak bylo přidáno:

- a) 0,25 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě
- b) 0,025 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě
- c) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku
- d) 0,025 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku.

Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–250 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny daným rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

Do vialek bylo odpipetováno 60 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného v pufru. Pak bylo přidáno 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného v pufru. Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–350 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny pufrům na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

Dále bylo do vialek odpipetováno 60 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Pak bylo přidáno

- a) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku
- b) 0,25 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě

Potom byl připipetován zásobní roztok CPC v rozsahu 0–190 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku CPC byla 2 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny daným rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.6 Vzorky 10 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu ($M_w = 650$ kDa)

Do vialek bylo odpipetováno 50 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 12,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě a nebo fyziologickém roztoku. Pak bylo přidáno 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného v daném rozpouštědle. Potom byl připipetován zásobní roztok žhášeče

- a) jódu v rozsahu 0–350 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 0,66 mM
- b) CPC v rozsahu 0–190 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 2 mM

Nakonec byly všechny vzorky doplněny rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.1.7 Vzorky 30 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa)

Do vialek bylo odpipetováno 60 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 mL 37,5 mM roztoku CTAB rozpuštěného ve vodě, pufru nebo ve fyziologickém roztoku. Pak bylo přidáno:

- a) 0,25 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě
- b) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného v pufru
- c) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku.

Potom byl připipetován zásobní roztok jódu v rozsahu 0–350 μ L, přičemž koncentrace zásobního roztoku jódu byla 1 mM. Nakonec byly všechny vzorky doplněny daným rozpouštědlem na celkový objem 5 mL. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Bylo vytvořeno šest paralelních řad vzorků.

4.3.2 Příprava vzorků ke zjištění kritické micelární koncentrace

4.3.2.1 Vzorky s vodou

Do vialek bylo odpipetováno 30 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byl přidán zásobní roztok CTAB ve vodě tak, aby po doplnění vzorku na 5 mL byla koncentrace tenzidu v rozsahu 0,0005–1,5 mM. Pak bylo do vialek přidáno:

- a) 0 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve vodě
- b) 0,25 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa) rozpuštěného ve vodě
- c) 0,025 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa) rozpuštěného ve vodě
- d) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 650$ kDa) rozpuštěného ve vodě.

Potom byly vzorky doplněny vodou na celkový objem 5 mL.

4.3.2.2 Vzorky s pufrem

Do vialek bylo odpipetováno 40 μ L zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byl přidán zásobní roztok CTAB v pufru tak, aby po doplnění vzorku na 5 mL byla koncentrace tenzidu v rozsahu 0,001–20 mM. Pak bylo do vialek přidáno:

- a) 0 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného v pufru
- b) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 1,4$ MDa) rozpuštěného v pufru.

Potom byly vzorky doplněny pufrem na celkový objem 5 mL.

4.3.2.3 Vzorky s fyziologickým roztokem

Do vialek bylo odpipetováno 40 μL zásobního roztoku pyrenu 1. Po odpaření rozpouštědla byl přidán zásobní roztok CTAB ve fyziologickém roztoku tak, aby po doplnění vzorku na 5 mL byla koncentrace tenzidu v rozsahu 0,0002-0,7 mM. Pak bylo do vialek přidáno:

- a) 0 mL zásobního roztoku hyaluronanu rozpuštěného ve fyziologickém roztoku
- b) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 1,4 \text{ MDa}$) rozpuštěného ve fyziologickém roztoku
- c) 0,025 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 1,4 \text{ MDa}$) rozpuštěného ve fyziologickém roztoku
- d) 0,375 mL zásobního roztoku hyaluronanu ($M_w = 650 \text{ kDa}$) rozpuštěného ve fyziologickém roztoku

Potom byly vzorky doplněny fyziologickým roztokem na celkový objem 5 mL.

4.4 Měření vzorků

Emisní spektra byla pořizována pomocí přístroje Luminescence spectrometer AMINCO – Bowman Series 2 s použitím kyvety o optické dráze 1 cm. Teplota cely s kyvetou byla řízena oběhovým termostatem Grant s externím chlazením. Všechna měření probíhala při teplotě $20 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

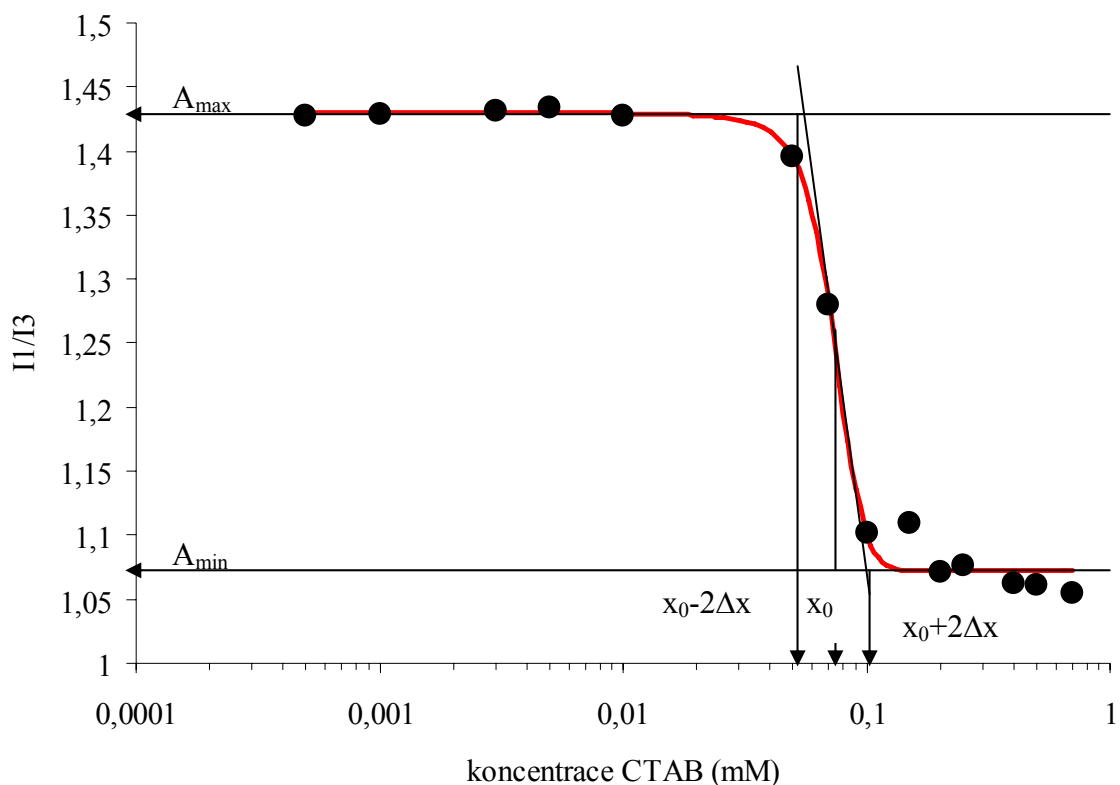
Emisní spektra pyrenu byly pořizovány při excitační vlnové délce $\lambda = 335 \text{ nm}$, emisní vlnové délce $\lambda = 392 \text{ nm}$ a konstantní citlivosti rychlostí 5 nm/s s krokem 1 nm. Byly pozorovány změny totálního integrálu.

Při určení kritické micelární koncentrace byl pozorován poměr fluorescenčního maxima 1. a 3. píku a excimeru a monomeru.

Hodnota kritické micelární koncentrace byla vyhodnocena pomocí Boltzmannovy rovnice:

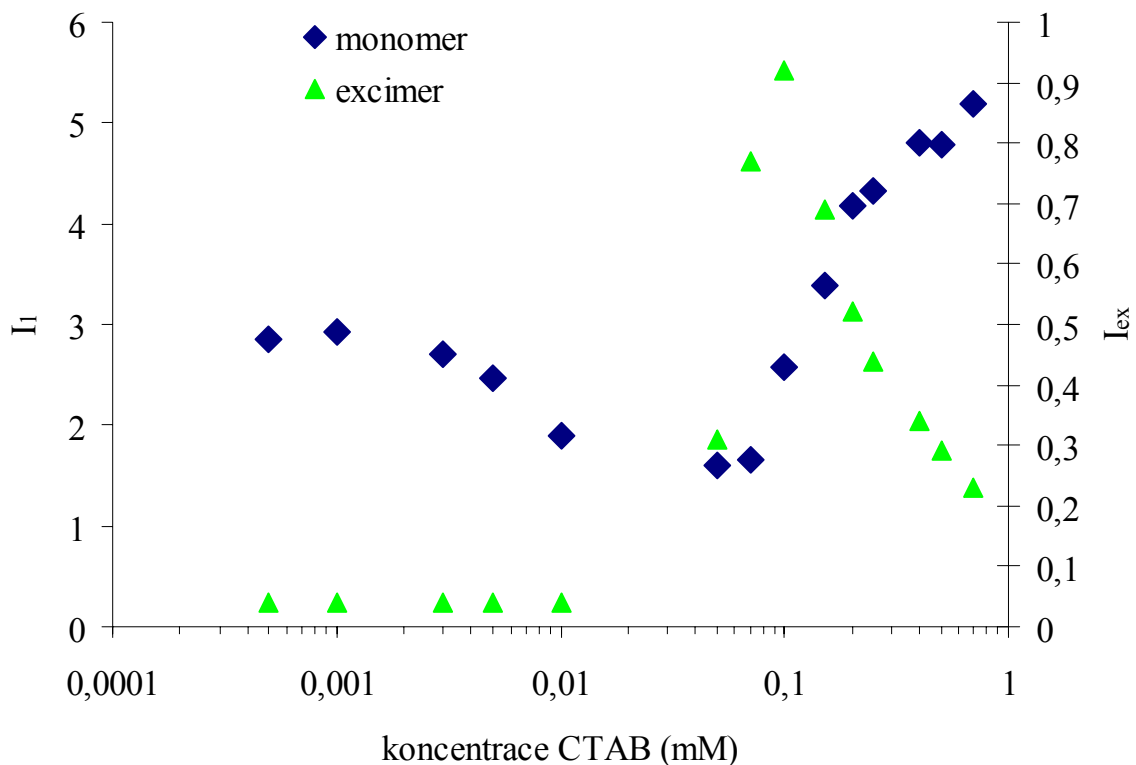
$$y = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{\pm \frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_{\min} \quad (32)$$

Kde x_0 představuje inflexní bod a Δx představuje gradient [68].



Obr. 14 Zobrazení koncentrační řady

Kolem kritické micelární koncentrace je jen velmi málo micel. Ukazují to i intenzita excimeru, která má v okolí tohoto bodu mnohem větší hodnotu a intenzita monomeru, která naopak klesá. Dochází k lokálnímu zakoncentrování a intenzita fluorescence je součet dvou signálů (pyrenu svítícího z vody a pyrenu, který už je zabudovaný v micelle). Proto nám v grafu vychází S-křivka a ne dvě rovné čáry.



Obr. 15 Zobrazení koncentrační řady monomeru a excimeru

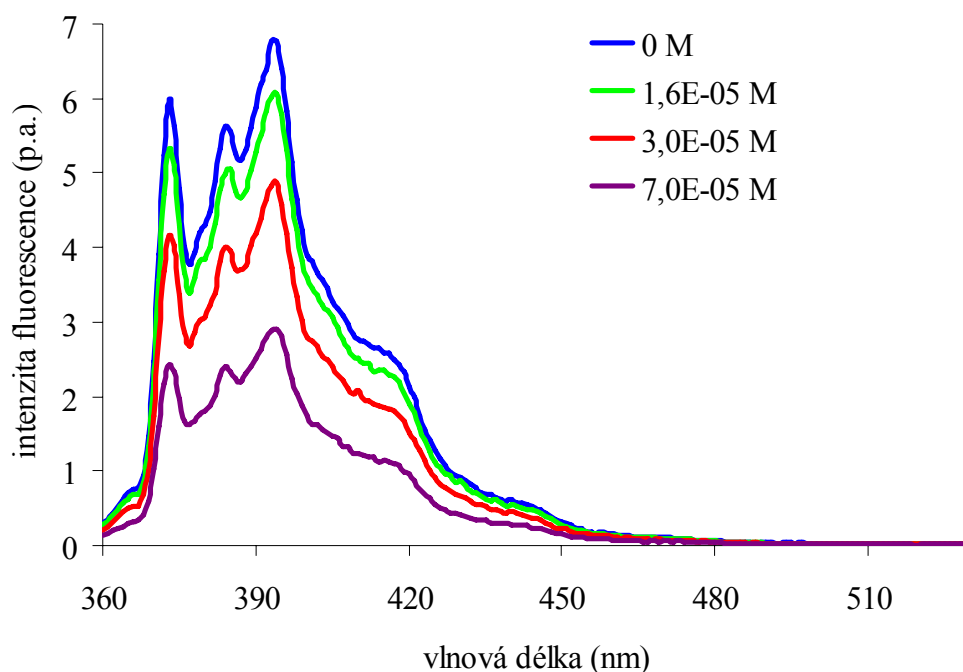
Všechny vzorky byly proměřeny na fluorimetru a na UV-VIS spektrofotometru. Data byla potom vyhodnocena pomocí korekce (viz. rovnice 33), která nám eliminuje případné zbarvení nebo zakalení roztoku:

$$F_{Corr} = F_{OBS} \cdot 10^{0,5(O.D._{ex} + O.D._{em})} \quad (33)$$

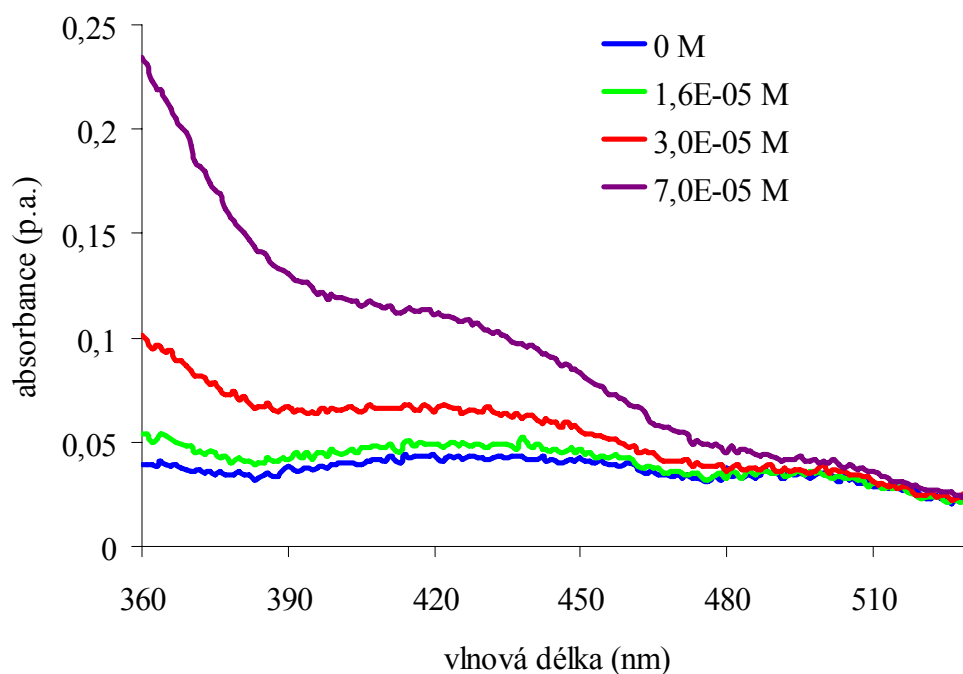
- F_{Corr} je intenzita fluorescence s korekcí
- F_{OBS} je intenzita fluorescence bez korekce
- $O.D._{ex}$ je hodnota optické hustoty při 335 nm
- $O.D._{em}$ je hodnota optické hustoty o dané emisní vlnové délce

Korekce byly provedeny tak, že pro vzorky byly naměřeny absorpční spektra v rozsahu od 200 nm do 600 nm s pomocí absorpčního spektrometru Varian Cary Probe 50 s použitím kyvety o optické dráze 1 cm.

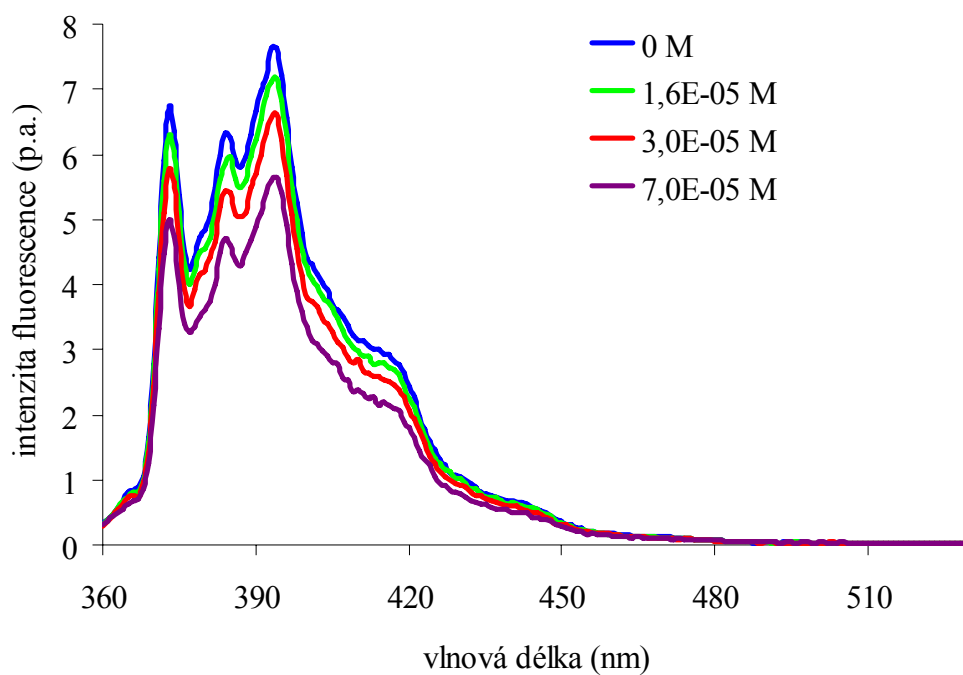
Obr. 16-18 názorně ukazují jak se změní fluorescenční spektra s použitím korekce.



Obr. 16 Naměřená fluorescenční nekorigovaná spektra pro vzorky obsahující 30 mM CTAB, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$) v prostředí fyziologického roztoku a proměnnou koncentraci jódu



Obr. 17 Naměřená absorpční spektra pro vzorky obsahující 30 mM CTAB, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$) v prostředí fyziologického roztoku a proměnnou koncentraci jódu



Obr. 18 Korigovaná fluorescenční spektra pro vzorky obsahující 30 mM CTAB, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$) v prostředí fyziologického roztoku a proměnnou koncentraci jódu

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část diplomové práce se zabývala agregací systémů kationaktivního tenzidu CTAB a hyaluronanu o různých koncentracích a různých molekulových hmotnostech. Zabývala se především zjištěním agregačního čísla CTAB v třech různých rozpouštědlech (voda, fosfátový pufr a fyziologický roztok) bez a v přítomnosti hyaluronanu.

Hodnota agregačního čísla byla zjištěna pomocí zhášení intenzity fluorescence pyrenu v CTAB. Agregační číslo bylo určeno pomocí postupného přidávání zhášeče, roztoku jódu nebo CPC, do roztoku sondy s tenzidem bez a v přítomnosti hyaluronanu. Výsledky pak byly vyhodnoceny pomocí lineární závislosti, která je dána koncentrací zhášeče a logaritmu Φ_0/Φ :

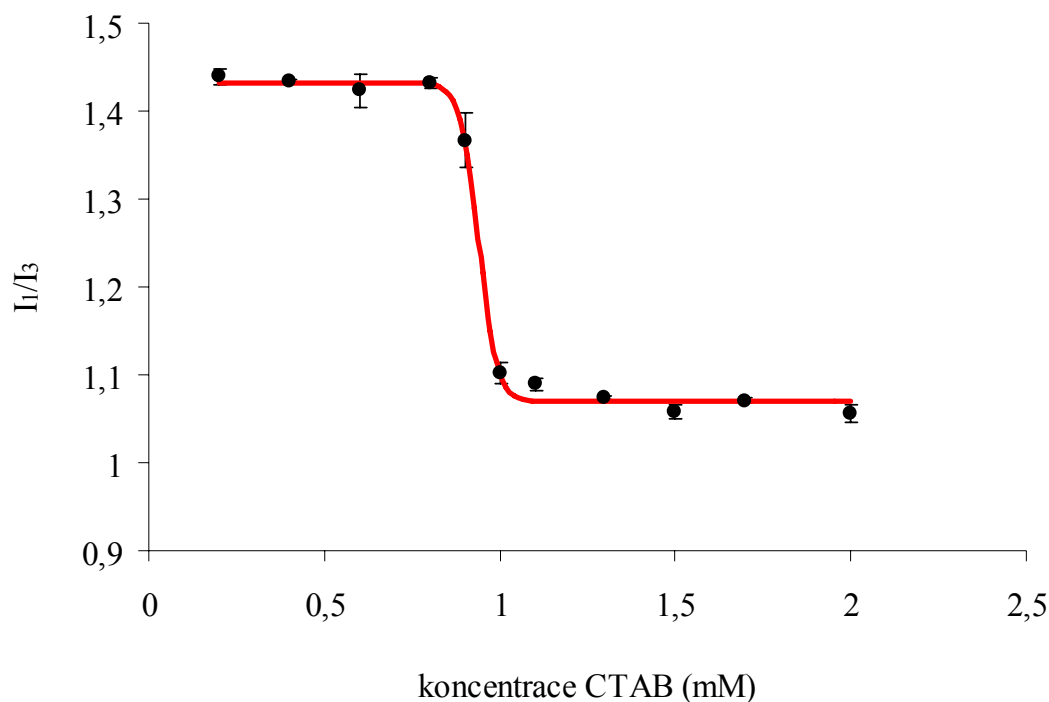
$$N_{agg} = \frac{1}{k} \frac{1}{[SDS] - CMC} \quad (34)$$

- k je směrnice přímky

Z rovnice 34 vyplývá, že pro zjištění agregačního čísla bude potřeba zjistit i CMC tenzidu při konkrétních podmínkách. Tato hodnota se může lišit a to nejen použitím různých metod (fluorescence, povrchové napětí), ale i použitím stejné metody za různých podmínek (sonda - pyren, nilská červeň). A jelikož bylo použito k určení agregačního čísla pouze pyrenu, i CMC byla stanovena jen s použitím pyrenu.

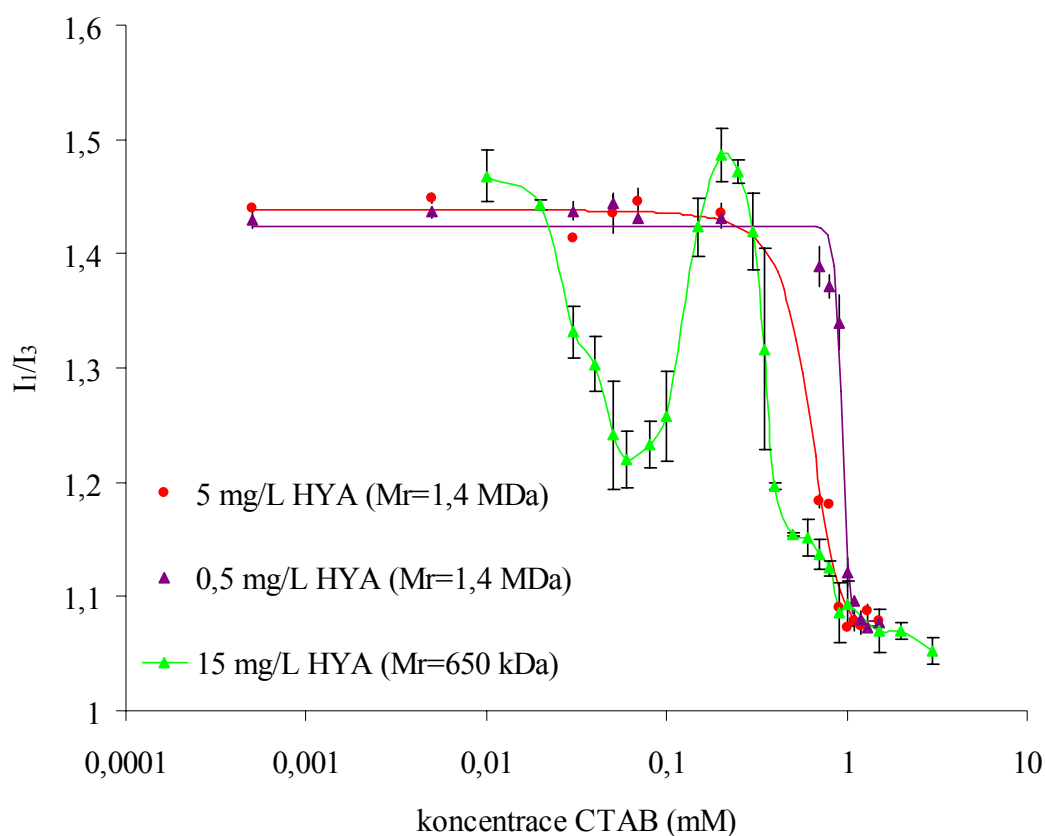
Tyto výsledky by měly přispět k celkovému přehledu o interakcích mezi hyaluronanem a kationaktivním tenzidem, které budou použity k popisu těchto systémů s ohledem na budoucí použití v oblasti cílené distribuce léčiv.

5.1 Určení kritické micelární koncentrace

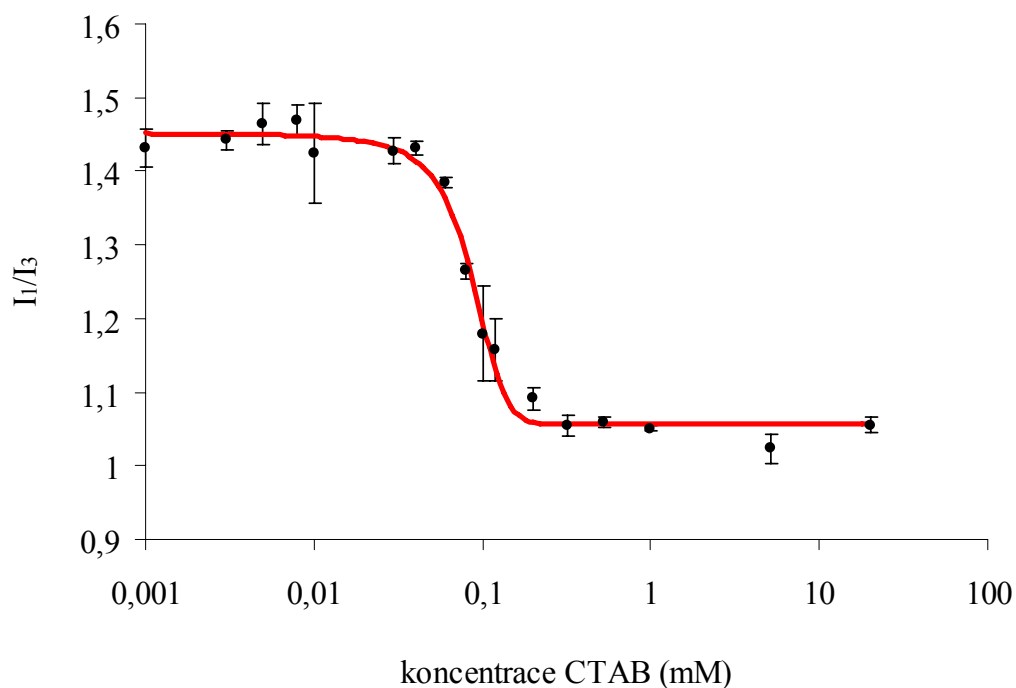


Obr. 19 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve vodě (průměr ze tří měření).

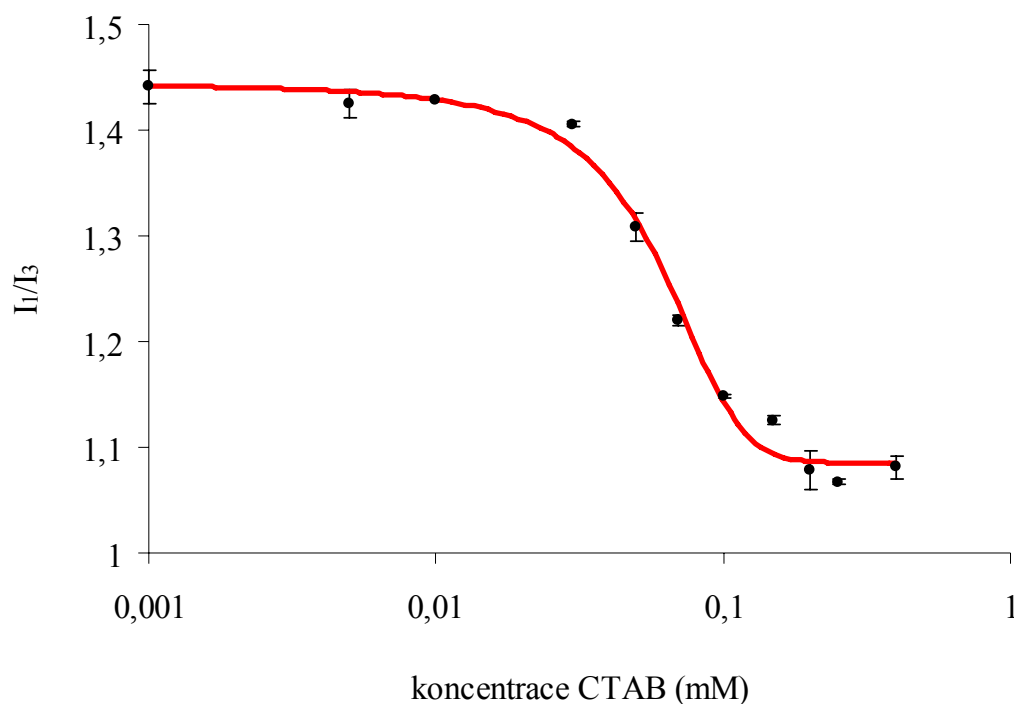
Obrázek 19 zobrazuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve vodě. Obrázek 20 zobrazuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve vodě s přidavkem vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hyaluronanu. Pomocí Boltzmanovy S-křivky byla stanovena hodnota CMC. Hodnota kritické micelární koncentrace CTAB bez přidavku hyaluronanu byla rovna $0,94 \pm 0,002$ mM. S přidavkem vysokomolekulárního hyaluronanu o nízké koncentraci nedošlo prakticky k žádné změně CMC, ale tato křivka má nejstrmější průběh ze všech měření s vodou. Největší rozdíl CMC mezi vzorky bez a s přidavkem hyaluronanu jde vidět u vzorku obsahujícího vysokomolekulární hyaluronan o vyšší koncentraci. Při použití nízkomolekulárního hyaluronanu můžeme na křivce pozorovat jak kritickou agregační koncentraci (první pokles), kdy nám v roztoku vznikají první agregáty, vznik gelu (nárůst poměru I_1/I_3), který se při zvyšující se koncentraci tenzidu zase rozpustí, tak i kritickou micelární koncentraci (druhý pokles), kdy nám v roztoku začínají vznikat volné micely a kterou jsme nakonec použili pro zjištění hodnoty agregačního čísla. Z obrázků 19-20 lze vyčíst, že hodnoty polaritního indexu u všech vzorků se pohybují ve zhruba stejném rozmezí.



Obr. 20 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve vodě v přítomnosti hyaluronanu (průměr ze tří měření)

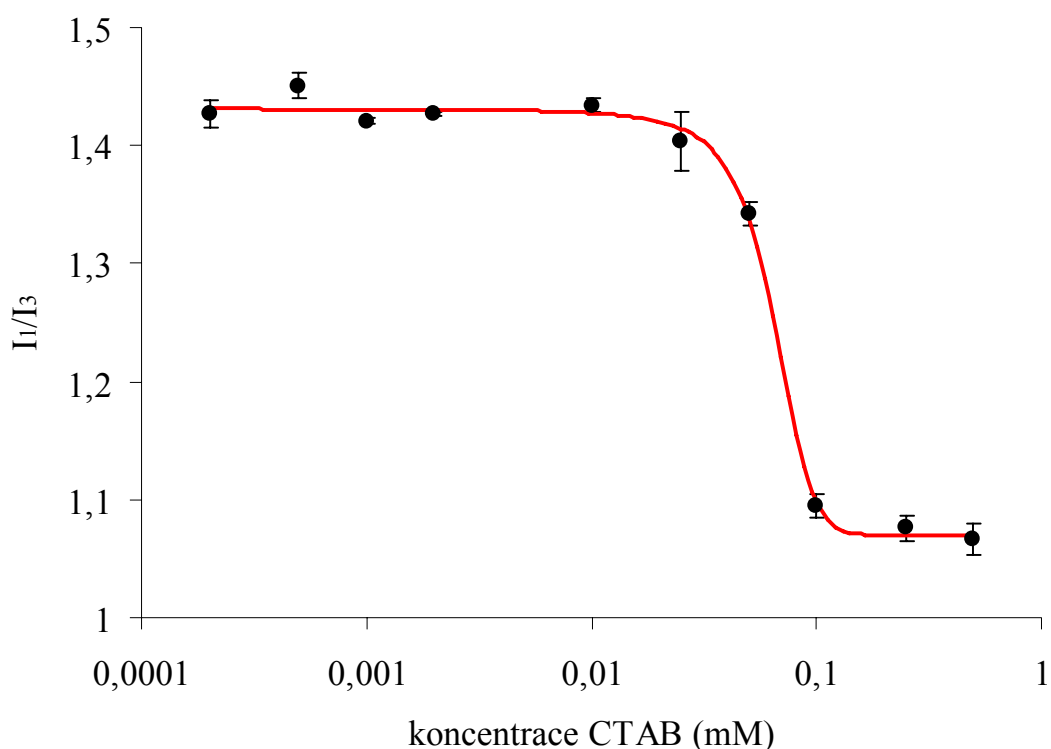


Obr. 21 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného v pufru (průměr ze tří měření)



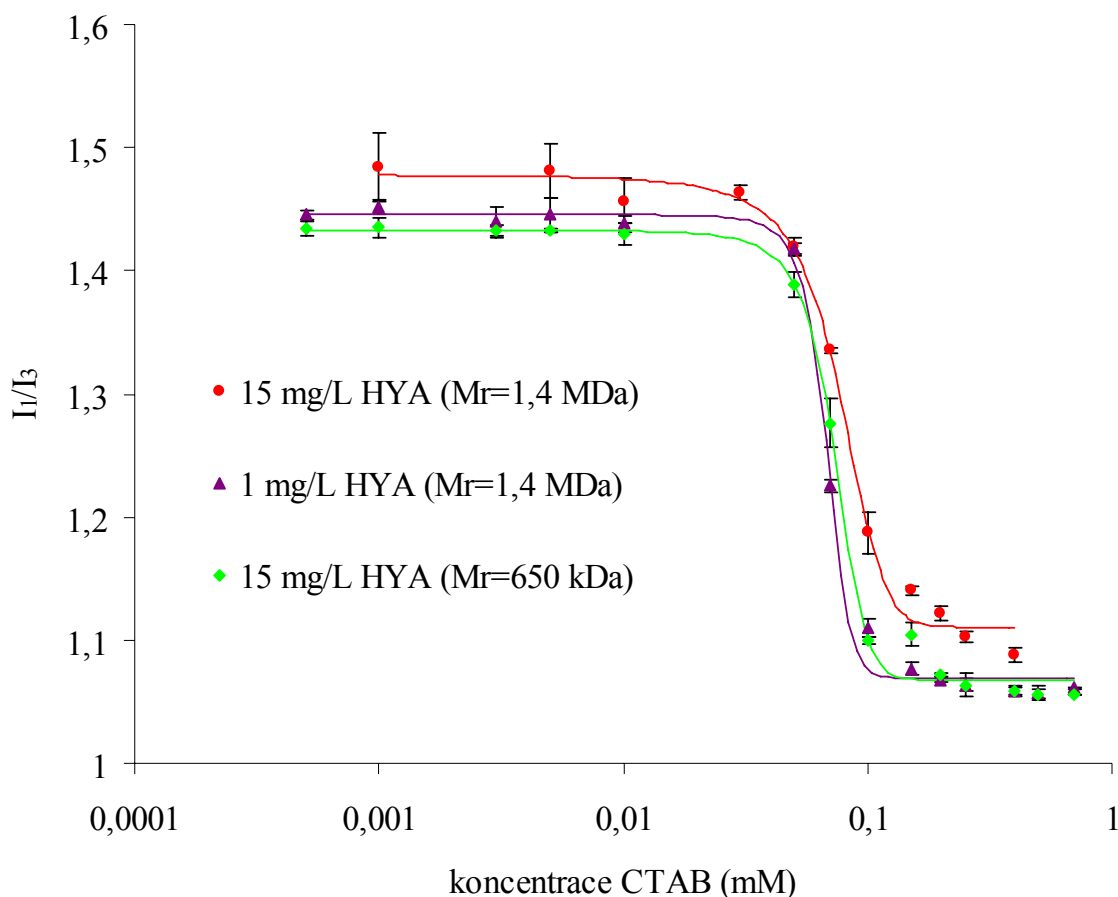
Obr. 22 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného v pufru v přítomnosti 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$), (průměr ze tří měření)

Obrázek 21 zobrazuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného v pufru. Obrázek 22 zobrazuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného v pufru s přidavkem vysokomolekulárního hyaluronanu. Pomocí Boltzmanovy S-křivky byla stanovena hodnota CMC. Hodnota kritické micelární koncentrace CTAB bez přidavku hyaluronanu byla rovna $0,086 \pm 0,002 \text{ mM}$. S přidavkem vysokomolekulárního hyaluronanu došlo k poklesu CMC na hodnotu $0,058 \pm 0,006 \text{ mM}$. Rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami CMC je velmi malý, takže můžeme říct, že přidavek vysokomolekulárního hyaluronanu má jen nepatrný vliv na začátek tvorby micel CTAB rozpuštěného v pufru. Z obrázků 21-22 lze vyčíst, že S-křivka s přidavkem hyaluronanu má mnohem ostřejší sklon. Dále si můžeme všimnout, že hodnoty polaritního indexu u všech vzorků se pohybují ve stejném rozmezí.



Obr. 23 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku (průměr ze tří měření)

Obrázek 23 zobrazuje závislost polaritního indexu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku. Hodnota CMC stanovená pomocí Boltzmanovy S-křivky měla hodnotu $0,064 \pm 0,002$ mM. Můžeme tedy říct, že velký vliv na hodnotu CMC má rozpouštědlo. Největší hodnota CMC byla stanovena ve vodě, zatímco nejnižší hodnota byla naměřena ve fyziologickém roztoku. To může být způsobeno iontovou silou, která byla ovlivněna daným rozpouštědlem.



Obr. 24 Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku v přítomnosti hyaluronanu (průměr ze tří měření)

Obrázek 24 zobrazuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na koncentraci CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku s přidavkem nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu. Hodnota CMC pro vysokomolekulární hyaluronan ($c = 15 \text{ mg/L}$) byla $0,077 \pm 0,002 \text{ mM}$, pro vysokomolekulární hyaluronan ($c = 1 \text{ mg/L}$) byla $0,068 \pm 0,001 \text{ mM}$ a pro nízkomolekulární hyaluronan ($c = 15 \text{ mg/L}$) byla $0,073 \pm 0,002 \text{ mM}$. S přidavkem hyaluronanu došlo ke zvýšení CMC. Rozdíl mezi těmito hodnotami je velmi malý, takže můžeme říct, že přidavek hyaluronanu má opět jen nepatrný vliv na začátek tvorby micel. Z obrázku 24 lze vyčíst, že S-křivka má nejostřejší sklon u vysokomolekulárního hyaluronanu ($c = 1 \text{ mg/L}$). Dále si můžeme všimnout, že hodnoty polaritního indexu u všech vzorků se pohybují ve stejném rozmezí až na vysokomolekulární hyaluronan s větší koncentrací, jehož hodnota polaritního indexu se liší od ostatních křivek cca o 0,05 bodu. Tato křivka má také největší sklon.

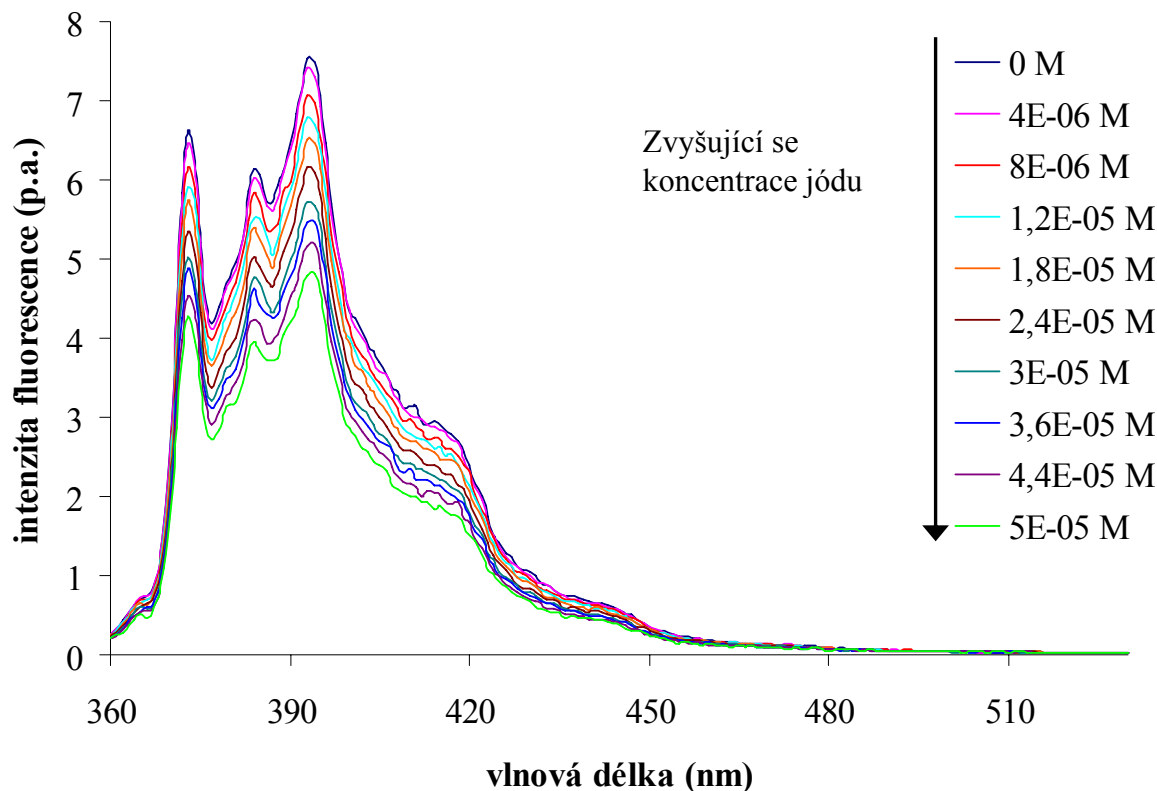
Tabulka 2 Hodnoty CMC v různých rozpouštědlech

Rozpouštědlo	Voda Mili Q	Pufř	Fyziologický roztok
Prostředí			
Bez HYA	0,94 ± 0,005	0,086 ± 0,002	0,064 ± 0,002
15 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	0,058 ± 0,006	0,077 ± 0,002
5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	0,62 ± 0,04	---	---
1 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	---	0,068 ± 0,001
0,5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	0,94 ± 0,01	---	---
15 mg·dm⁻³ HYA (650 kDa)	0,82 ± 0,07	---	0,073 ± 0,002

5.2 Určení agregačního čísla

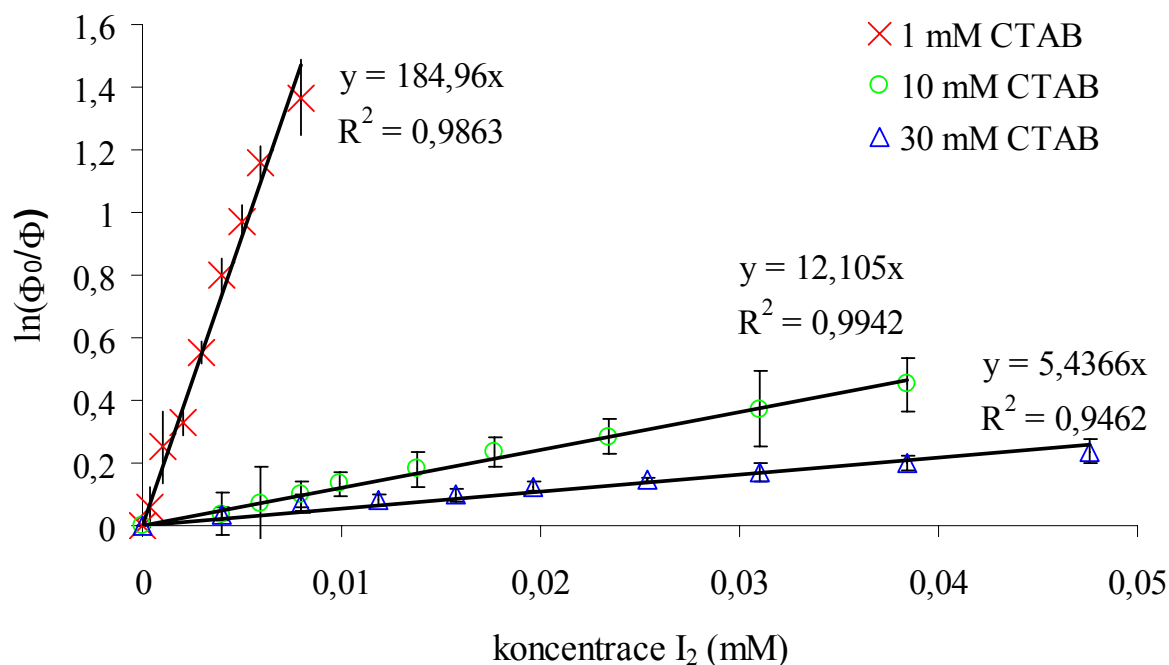
Agregační číslo bylo měřeno za pomoci zhášení fluorescence pyrenu v různých systémech. Byly studovány tři různé koncentrace CTAB (1 mM, 10 mM a 30 mM) ve třech různých rozpouštědlech (voda, pufř a fyziologický roztok). Agregační číslo bylo stanoveno jak pro samotný tenzid, tak i pro systém obsahující různé přísavky nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu (viz. tabulky 3, 4, 5). Při použití vody jako rozpouštědla, byla nejvyšší koncentrace vysokomolekulárního hyaluronanu 5 mg·dm⁻³. Nad touto koncentrací se v roztoku začal tvořit gel, který byl pro naše měření nežádoucí.

V systémech byly použity dva typy zhášeče, CPC a jód. CPC je hodně využívaný zhášeč fluorescence [11], [69]. Jenže v této práci byl použit systém obsahující kationaktivní tenzid, se kterým může CPC, také kationaktivní tenzid, interagovat a tím nám rozrušit celý systém. Proto tu byla snaha nalezení jiného typu zhášeče. Bylo zjištěno, že jód, který ale není diskutovaným zhášečem v námi použité literatuře, vykazuje podobné zhášečské charakteristiky jako CPC (obrázek 35). Ovšem u jódu musíme myslet na to, že je chaotropní, což znamená, že ruší interakce (vodíkové vazby) v systému. Ale neinteraguje s tenzidem. Pro tuto práci byl, jako hlavní zhášeč, vybrán jód a CPC byl použit převážně pro srovnání výsledků.

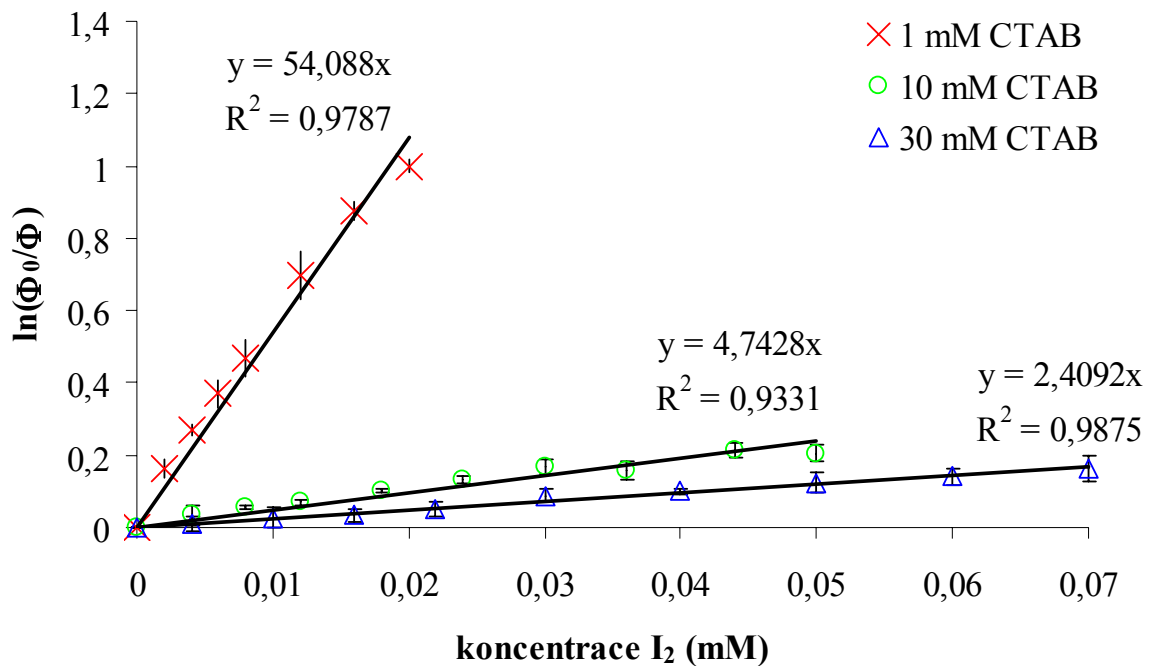


Obr. 25 Ukázka zhášení intenzity fluorescence pyrenu jódem v prostředí 10 mM CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku a 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$).

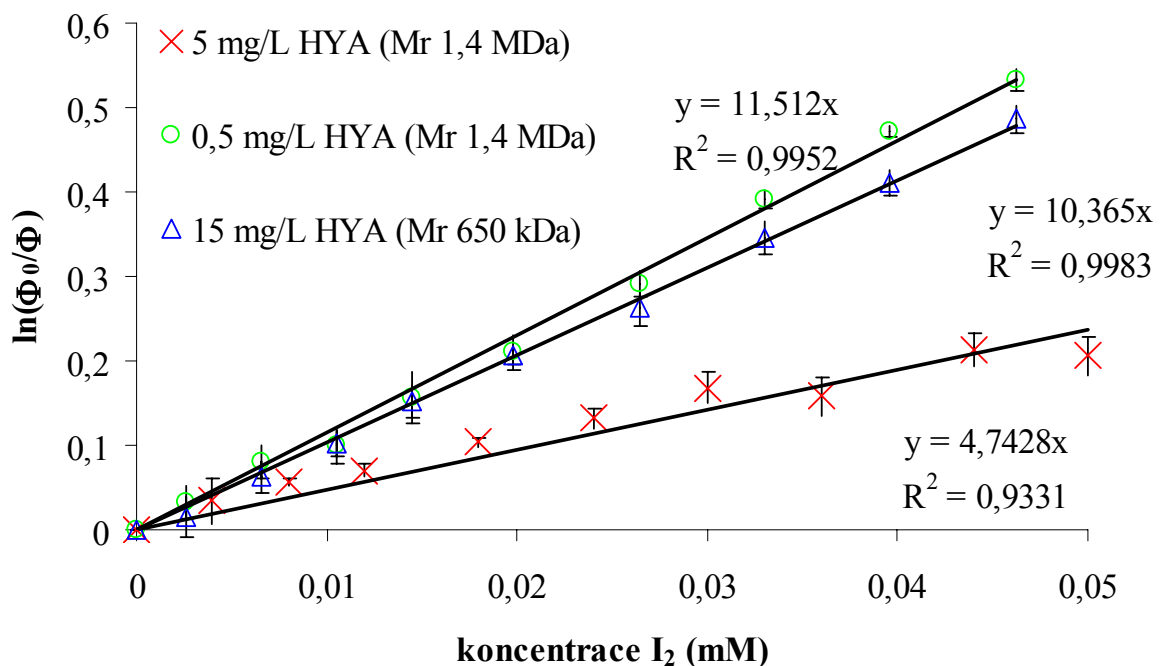
5.2.1 Rozpouštědlo - voda



Obr. 26 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný ve vodě a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření)



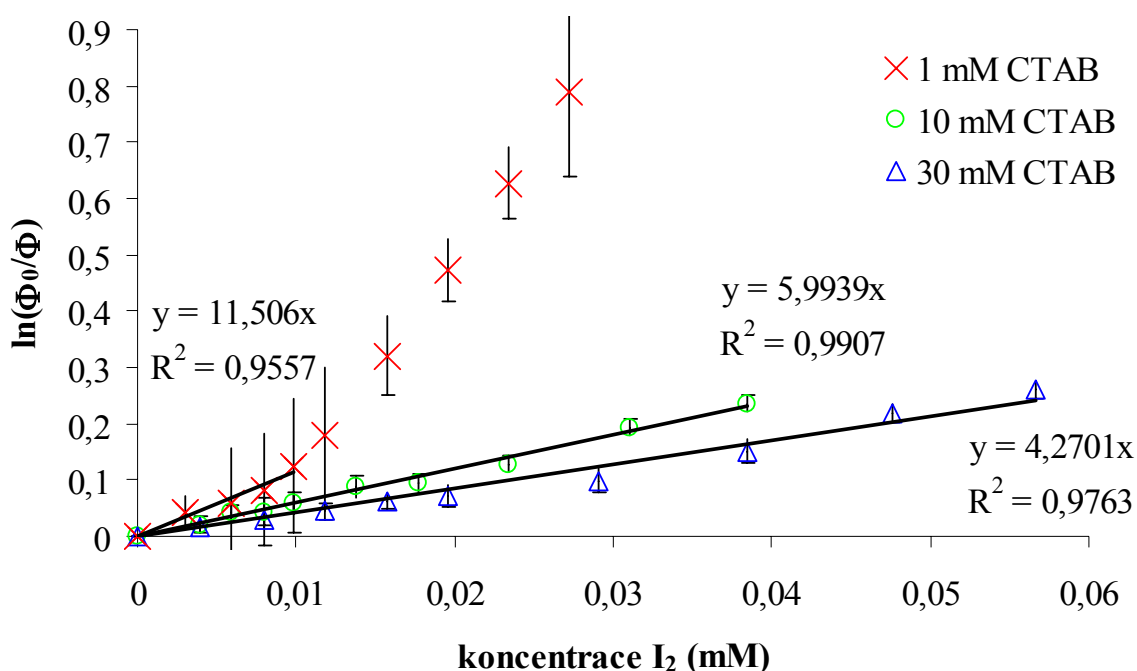
Obr. 27 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný ve vodě, 5 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$) a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření).



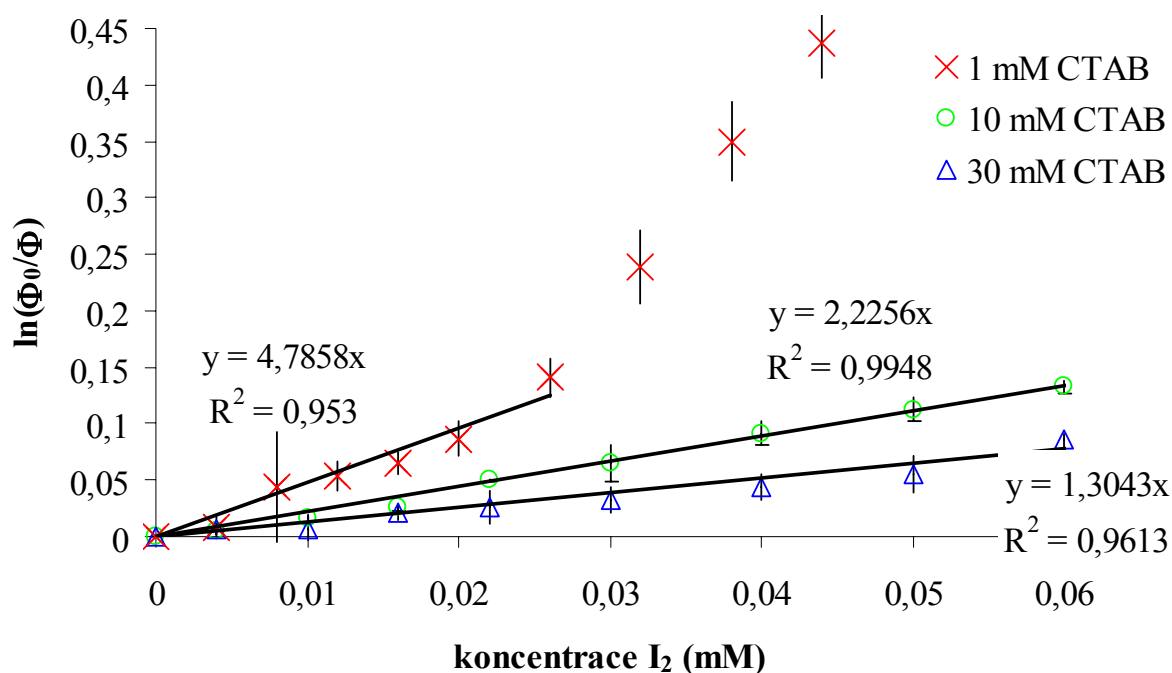
Obr. 28 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve vodě, tři různé koncentrace hyaluronanu s různou molekulovou hmotností a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření).

Obrázky 26-28 znázorňují závislosti přirozeného logaritmu Φ_0/Φ na koncentraci zhášeče. Zároveň jsou na grafu zobrazeny lineární přímky, kterými jsou data proložena a k nim příslušející rovnice a hodnoty spolehlivosti. Jak jde vidět z obr 26-27, s přidavkem vysokomolekulárního hyaluronanu o vyšší koncentraci se směrnice přímek sníží 2-3krát. Což se projeví i na agregačním čísle, které bude mít výrazně nižší hodnotu. Srovnání 10 mM CTAB bez a v přidavku hyaluronanu zjistíme, že největší hodnota směrnice přímky je pozorovaná ve vzorcích, které hyaluronan neobsahovali. Pak, jak je vidět na obrázku 28, je směrnice přímky nejnižší u vzorků obsahující vysokomolekulární hyaluronan o vyšší koncentraci, naopak největší hodnota směrnice přímky je u vysokomolekulárního hyaluronanu, který je ale ve vzorku obsažen v 10krát nižší koncentraci.

5.2.2 Rozpouštědlo - pufr



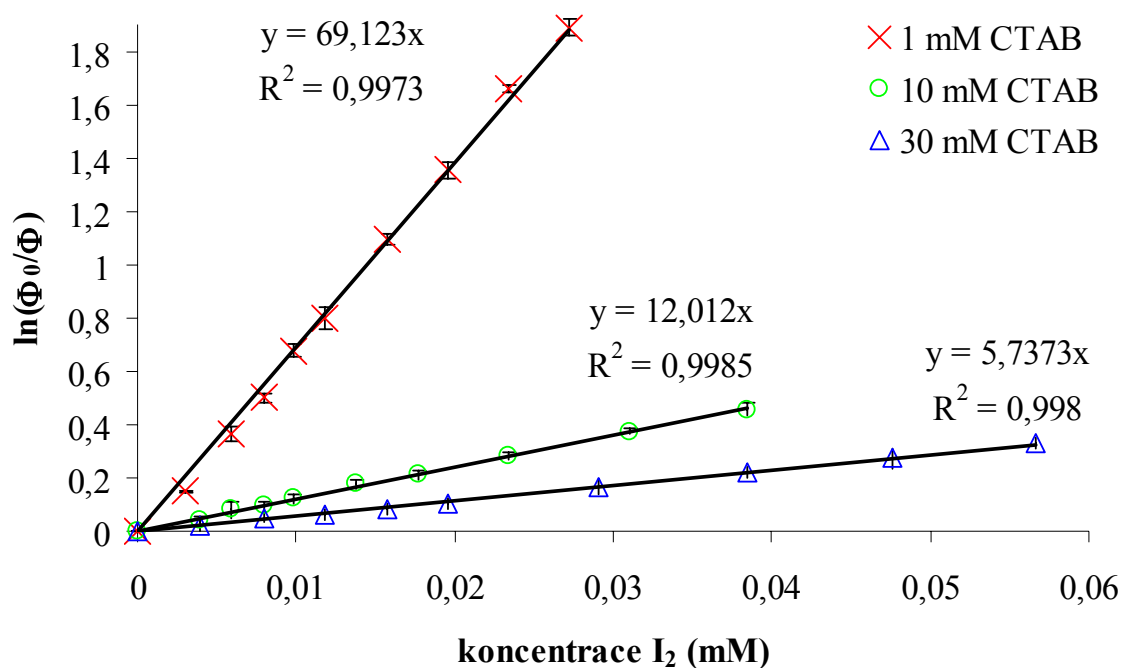
Obr. 29 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný v pufru a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření).



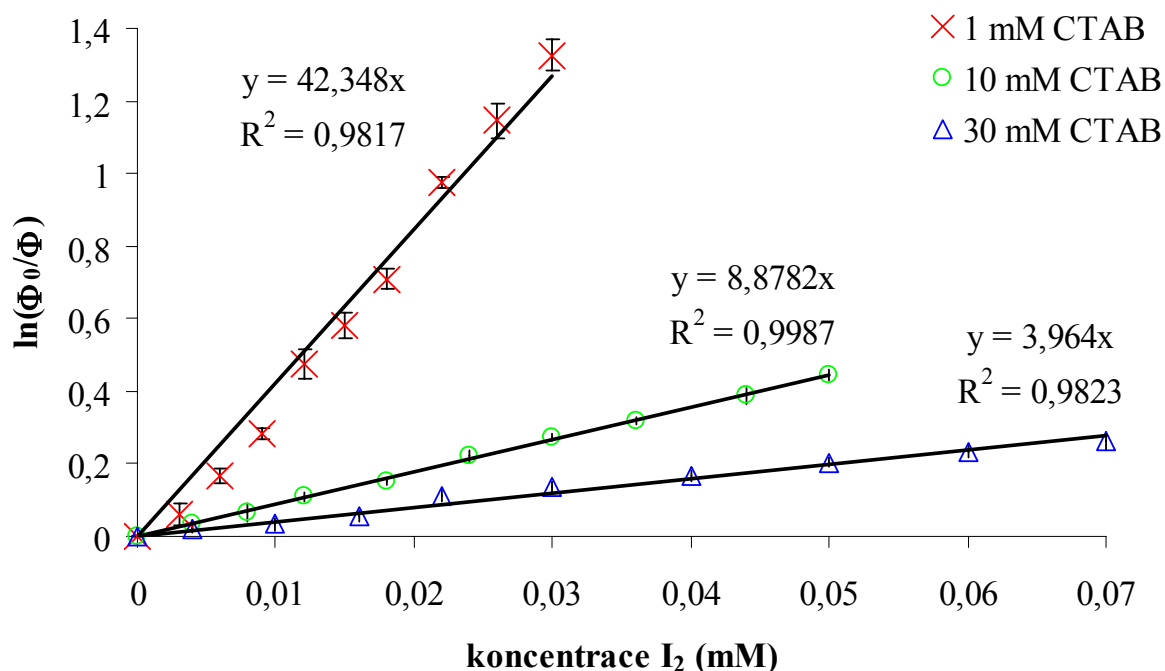
Obr. 30 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný v pufru, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu ($M_r = 1,4 \text{ MDa}$) a jód, jako zhášed (průměr z několika měření).

Obrázky 29-30 znázorňují závislosti přirozeného logaritmu Φ_0/Φ na koncentraci zhášedce. Zároveň jsou na grafech zobrazeny lineární přímky, kterými jsou data proložena a k nim příslušející rovnice a hodnoty spolehlivosti. Jde vidět, že 1 mM CTAB rozpuštěné v pufru netvoří jednoduchou lineární závislost. Proto jsme proložili přímkou jen data počáteční lineární závislosti. Dále to vypadá, jakoby se měnil způsob zhášení. Při vyšších koncentracích tenzidu tato anomálie mizí a hodnoty spolehlivosti tu mají mnohem vyšší hodnotu (0,9613-0,9963). To by se dalo vysvětlit působením jódu, který je chaotropní a může rozbít struktury micel. Tento jev jde ale vidět jen při nízkých koncentracích tenzidu, což znamená, že při vyšších koncentracích CTAB je v systému pravděpodobně dostatečné množství micel na to, aby se do nich mohl jód zabudovat. Taky by se tu mělo brát v úvahu působení pufru, protože v žádném dalším rozpouštědle se nám ani při nízkých koncentracích tenzidu tento jev neobjevil. Dále na obrázcích 29-30 bylo pozorováno, že směrnice přímek bez přítomnosti vysokomolekulárního hyaluronanu měly až 3krát vyšší hodnoty než v přítomnosti hyaluronanu. Což znamená, že hodnoty agregačního čísla v přítomnosti hyaluronanu budou mít výrazně nižší hodnotu než hodnoty samotného tenzidu.

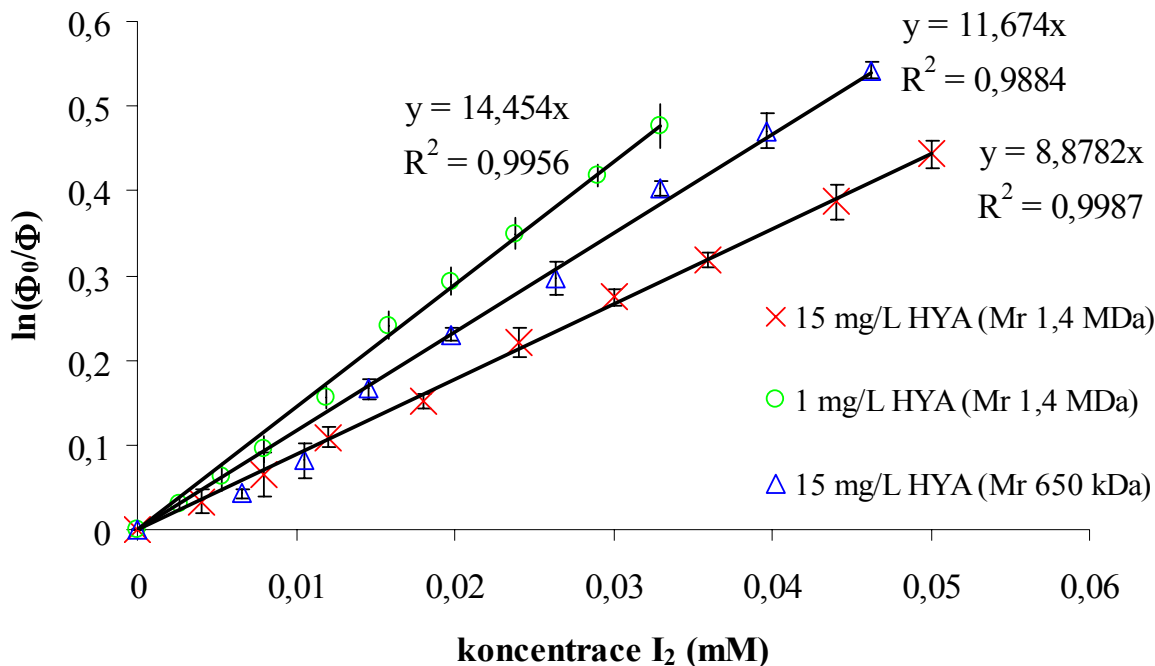
5.2.3 Rozpouštědlo – fyziologický roztok



Obr. 31 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření).

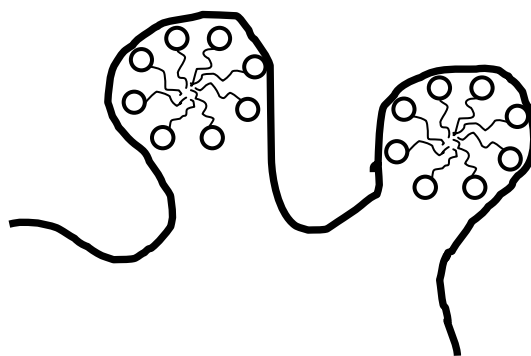


Obr. 32 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeče na koncentraci zhášeče pro systém obsahující pyren, CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, 15 mg dm⁻³ hyaluronanu ($M_r = 1,4$ MDa) a jód, jako zhášeč (průměr z několika měření).



Obr. 33 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, tři různé koncentrace hyaluronanu s různou molekulovou hmotností a jód, jako zhášedce (průměr z několika měření).

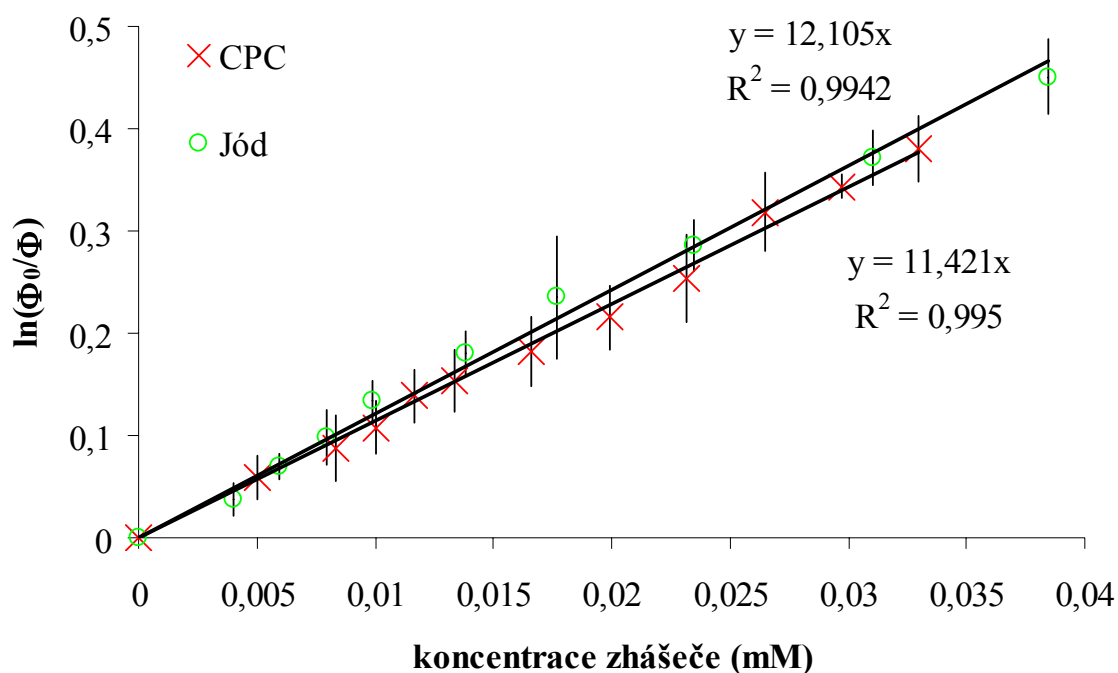
Obrázky 31-33 znázorňují závislosti přirozeného logaritmu Φ_0/Φ na koncentraci zhášedce. Zároveň jsou na grafu zobrazeny lineární přímky, kterými jsou data proložena a k nim příslušející rovnice a hodnoty spolehlivosti. Na těchto grafech můžeme pozorovat vysoké hodnoty spolehlivosti, což nám ukazuje, že má v tomto případě zhášení opravdu lineární charakter. Dále si můžeme všimnout, že až na jednu výjimku (1 mg·dm⁻³ HYA, Mr = 1,4 MDa), mají největší hodnoty směrnic přímek vzorky bez přítomnosti hyaluronanu. Což znamená, že při přidavku hyaluronanu dochází k poklesu agregačního čísla. To může být způsobeno tím, že kladně nabitý povrch micel CTAB bude přitahovat záporně nabitý řetězec hyaluronanu. Hyaluronan interaguje s micelami zřejmě tak, že řetězec hyaluronanu částečně obalí micelu CTAB, jak je to zobrazeno na obrázku 34.



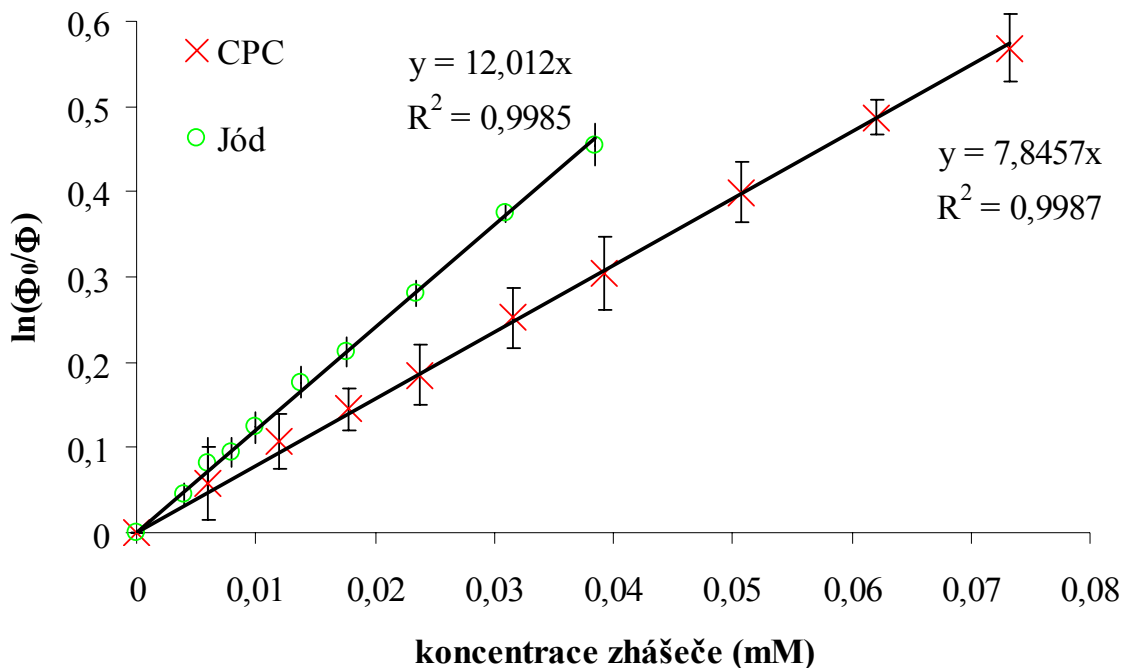
Obr. 34 Interakce polyelektrolytu s micelárním systémem [62]

Pokud srovnáme směrnice přímků různých přísadků hyaluronanu o různých M_r u 10 mM CTAB zjistíme, že nejvyšší hodnotu má přísadek vysokomolekulárního hyaluronanu o nižší koncentraci. To může být například způsobeno špatným stanovením CMC nebo právě při této koncentraci dochází k takové interakci HYA s tenzidem, že dochází k tvorbě větších micel. V ostatních případech je hodnota směrnice přímky nižší ve vzorcích s hyaluronanem než u samotného tenzidu.

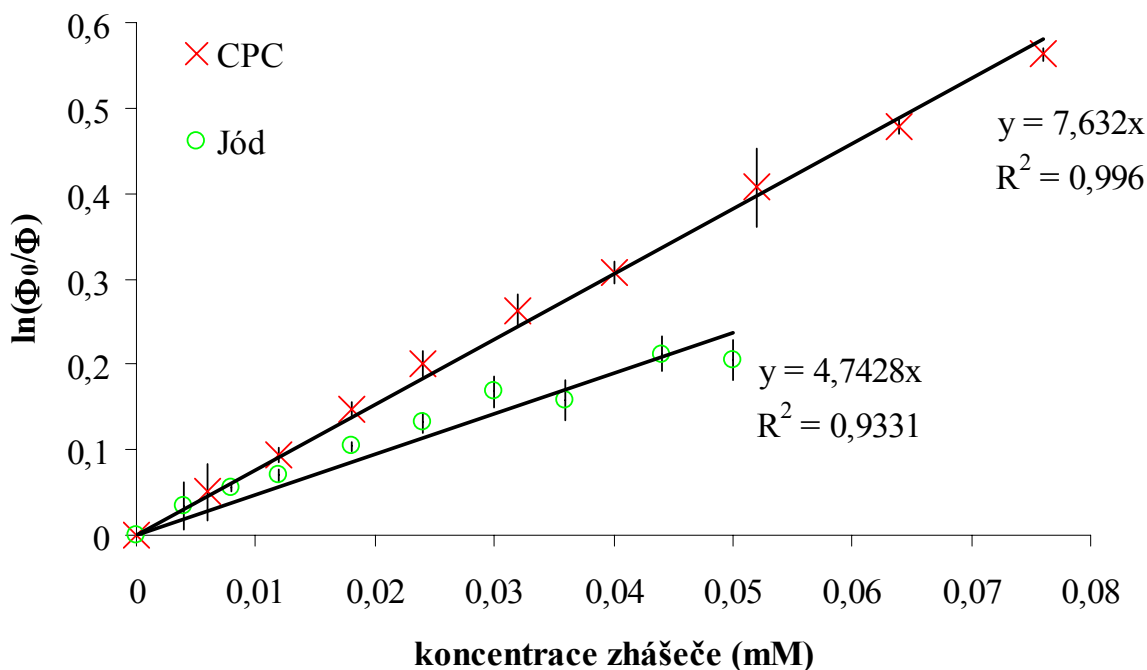
5.2.4 Použití CPC



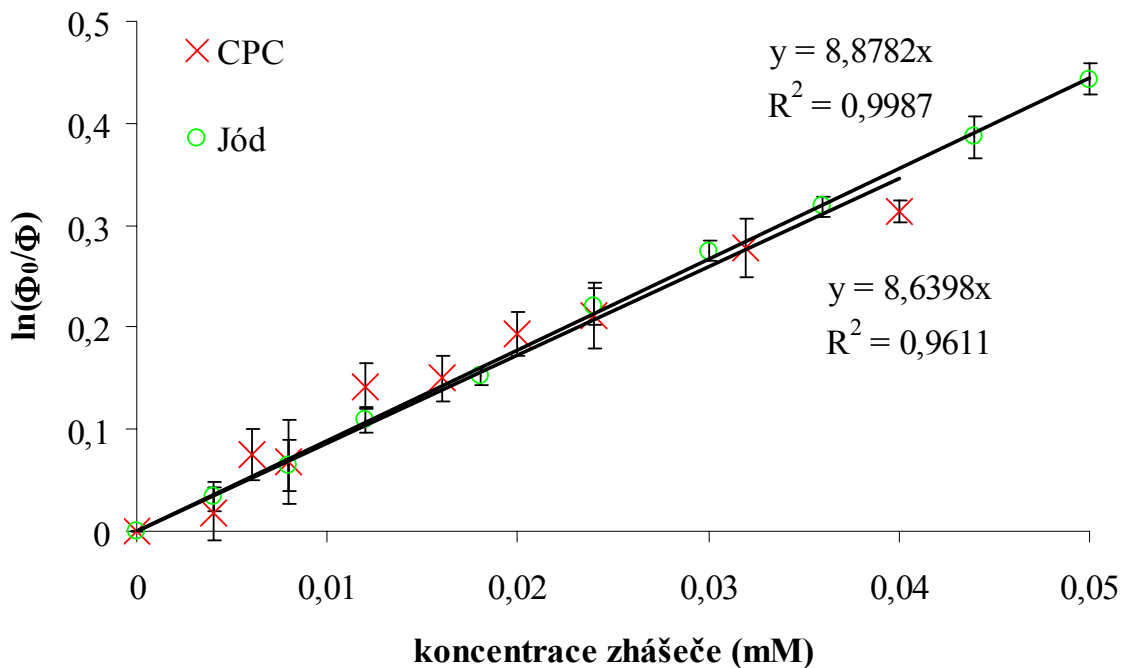
Obr. 35 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přísadkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve vodě a dvou druhů zhášedce, CPC a jódu (průměr z několika měření).



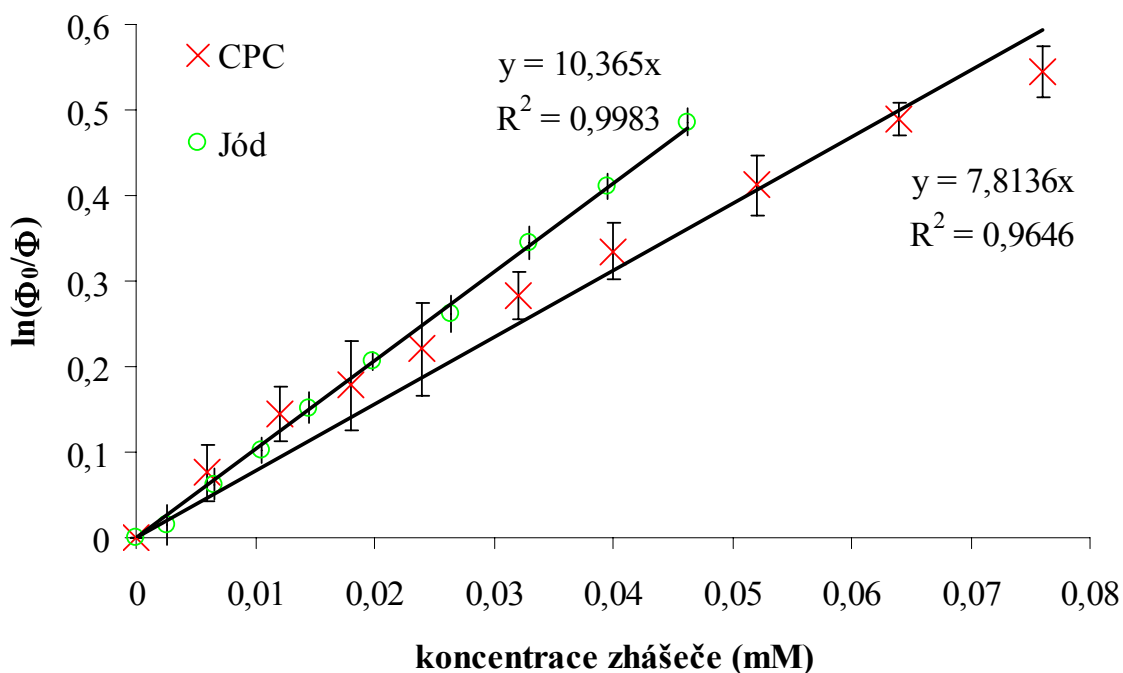
Obr. 36 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeeče na koncentraci zhášeeče pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku a dvou druhů zhášeeče, CPC a jódu (průměr z několika měření).



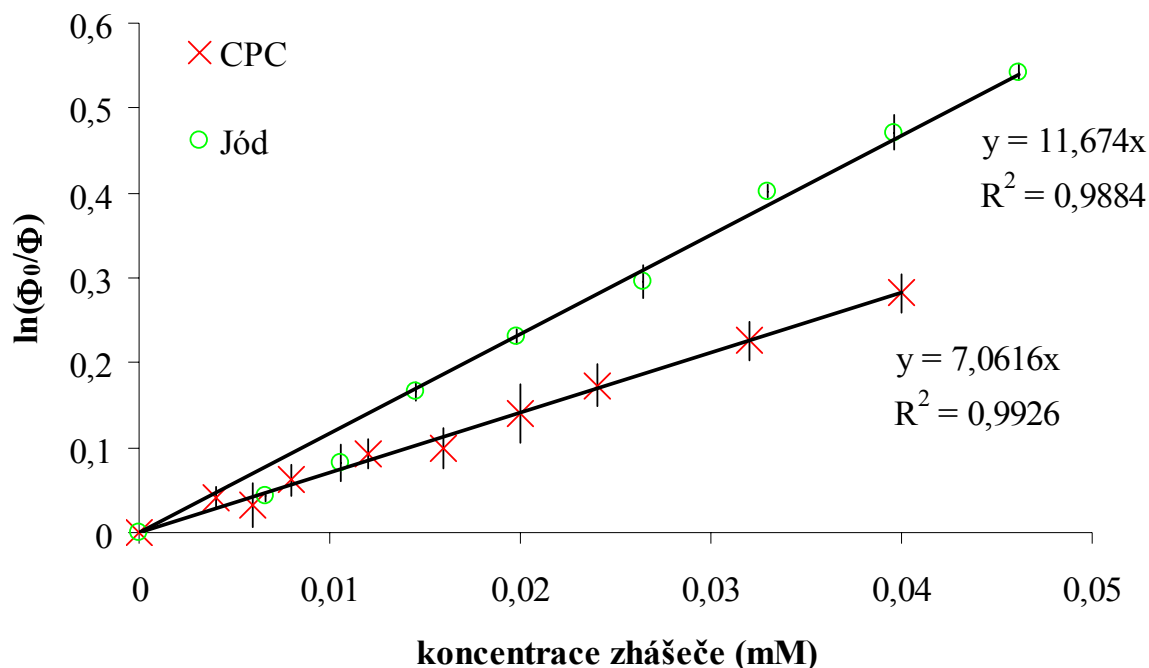
Obr. 37 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášeeče na koncentraci zhášeeče pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve vodě, 5 mg dm^{-3} hyaluronanu o $M_r = 1,4\text{ MDa}$ a dvou druhů zhášeeče, CPC a jódu (průměr z několika měření).



Obr. 38 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu o $M_r = 1,4 \text{ MDa}$ a dvou druhů zhášedce, CPC a jódu (průměr z několika měření).



Obr. 39 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve vodě, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu o $M_r = 650 \text{ kDa}$ a dvou druhů zhášedce, CPC a jódu (průměr z několika měření).



Obr. 40 Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedce na koncentraci zhášedce pro systém obsahující pyren, 10 mM CTAB rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, 15 mg dm^{-3} hyaluronanu o $M_r = 650 \text{ kDa}$ a dvou druhů zhášedce, CPC a jódu (průměr z několika měření).

U CPC jsou větší chybové úsečky, což je dáno tím, že do systému s tenzidem přidáváme další tenzid, který může nejen zhášet intenzitu fluorescence pyrenu, ale může dojít ke tvorbě směsných micel, které nám pozorovaný systém značně naruší. Výsledky pak mohou vykazovat zkreslené hodnoty agregačního čísla. Hodnoty N_{agg} s použitím CPC jsou vyšší, nižší nebo stejné v porovnání s jódem. Což znamená, že CPC nemá menší účinnost zhášení než jód, ale výsledky opravdu ovlivňují interakce dvou tenzidů v systému a nebo chaotropní jód.

Tabulka 3 Hodnoty agregačního čísla 1 mM CTAB

Rozpuštědlo	Voda	Puf	Fyziologický roztok
Prostředí			
Zhášedce: I₂			
Bez HYA	11 ± 1	11 ± 1	65 ± 1
15 mg dm^{-3} HYA (1,4 MDa)	---	5 ± 1	39 ± 1
5 mg dm^{-3} HYA (1,4 MDa)	21 ± 1	---	---

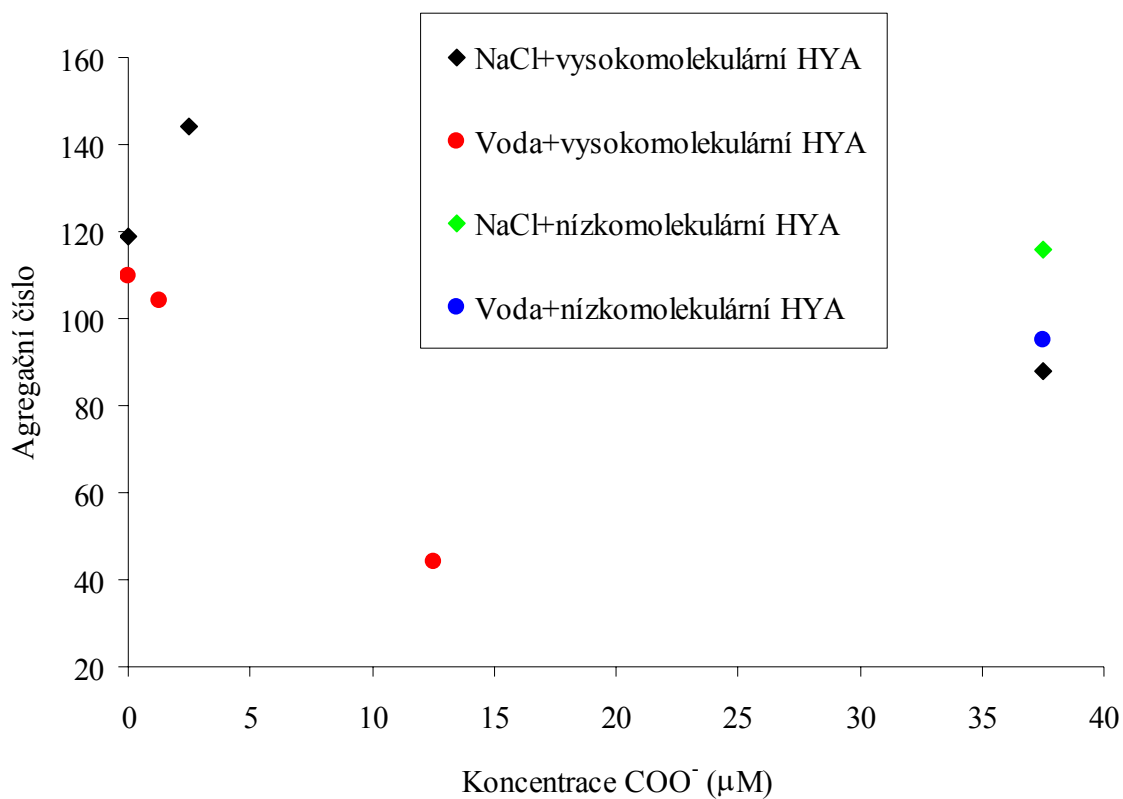
Tabulka 4 Hodnoty agregčního čísla 10 mM CTAB

Rozpouštědlo	Voda	Pufř	Fyziologický roztok
Prostředí			
Zhášeč: I₂			
Bez HYA	110 ± 10	59 ± 3	119 ± 4
15 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	22 ± 1	88 ± 2
5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	44 ± 5	---	---
1 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	---	144 ± 6
0,5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	104 ± 1	---	---
15 mg·dm⁻³ HYA (650 kDa)	95 ± 3	---	116 ± 2
Zhášeč: CPC			
Bez HYA	103 ± 12	---	78 ± 7
15 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	---	86 ± 8
5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	72 ± 2	---	---
15 mg·dm⁻³ HYA (650 kDa)	71 ± 3	---	70 ± 5

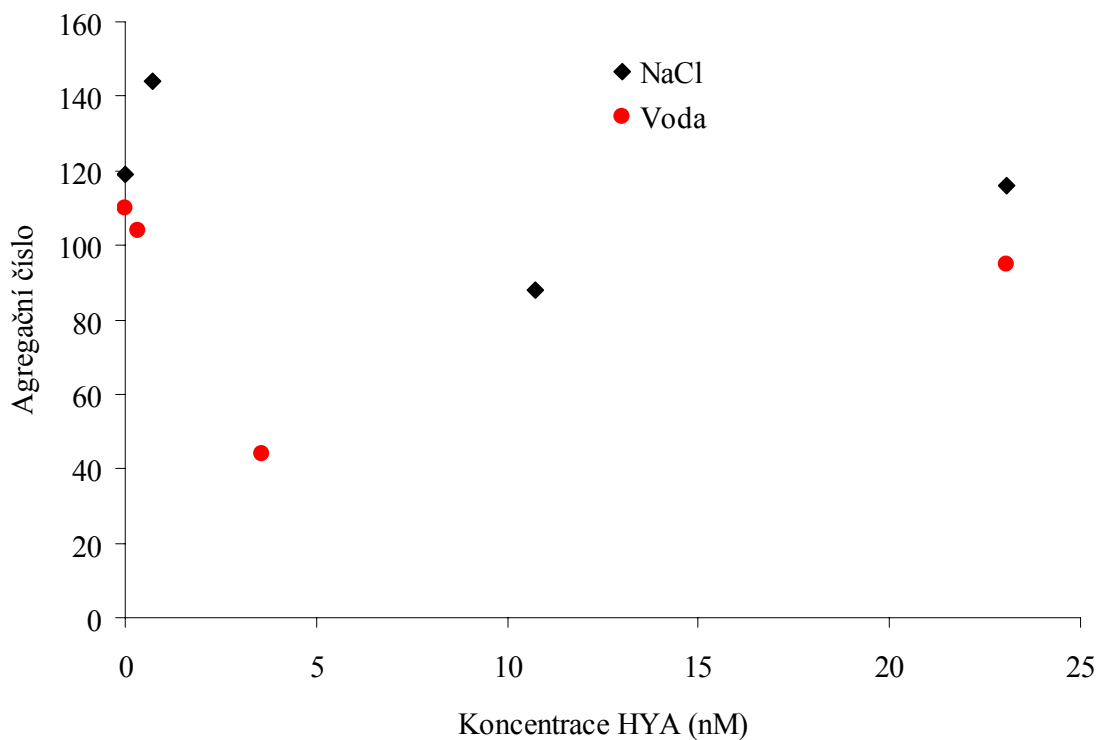
Tabulka 5 Hodnoty agregčního čísla 30 mM CTAB

Rozpouštědlo	Voda	Pufř	Fyziologický roztok
Prostředí			
Zhášeč: I₂			
Bez HYA	158 ± 15	128 ± 11	172 ± 13
15 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	---	39 ± 4	119 ± 10
5 mg·dm⁻³ HYA (1,4 MDa)	71 ± 4	---	---

5.2.5 Srovnání *Nagg*



Obr. 41 Srovnání agregačního čísla 10 mM CTAB pomocí obsahu karboxylových skupin vázaných na hyaluronan



Obr. 42 Srovnání agregačního čísla 10 mM CTAB pomocí celkové koncentrace HYA v roztoku

Z obrázku 41 jde vidět, že nízkomolekulární hyaluronan nám, i při vyšší koncentraci karboxylových skupin, hodnotu agregačního čísla takřka nezmění. Dále z obrázků 41-42 vyplívá, že takřka ve všech případech dochází s přidavkem hyaluronanu k poklesu agregačního čísla. Jen v případě CTAB rozpuštěného ve fyziologickém roztoku došlo v přidavku 0,7 nM HYA k nárůstu hodnoty *Nagg*. Což znamená, že při určité koncentraci HYA může dojít k takovým interakcím systémem, které způsobí tvorbu větších agregátů. Pro srovnání jsme ale použili jen čtyři body, takže porovnání hodnot můžeme považovat jen za orientační.

6 ZÁVĚR

Byla provedena rešerše na téma využití zhášení fluorescence ve studiu agregačních chování systémů obsahující polyaniont-tenzid-rozpouštědlo a na základě této rešerše byl pro zjištění kritické micelární koncentrace a agregačního čísla koloidních soustav vybrán pyren, jako nejvhodnější fluorescenční sonda. Jako polyaniont byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové s dvěma různými molárními hmotnostmi, 1,46 MDa a 650 kDa. Dále byl použit, jako kationaktivní tenzid, CTAB, u kterého se, díky opačnému náboji, předpokládají silnější interakce s HYA. Byl vybrán také proto, že je oficiálně doporučován pro využití v systémech zaměřených na cílené nosiče léčiv. V pozorovaných systémech byly použity tři druhy rozpouštědel, 3x destilovaná voda, fosfátový pufr a fyziologický roztok.

Pro zjištění agregačního čísla pomocí zhášení fluorescence je jednou z nejpodstatnějších podmínek nalezení a volba vhodného zhášeče. V této práci byly použity dva typy zhášečů, CPC a jód. Ovšem oba tyto zhášeče mají své pro i proti. CPC je kationaktivní tenzid, který po přidání do systému obsahující CTAB, také kationaktivní tenzid, může způsobit vzájemnou interakci CPC-CTAB a tím rozbít celý systém. Jód je zase chaotropní látka, která může rozrušit vodíkové interakce v daném systému. Po několika experimentálních pokusech bylo zjištěno, že pokud byl do systému přidán CPC, často bylo pro stejný systém získáno několik různých hodnot agregačního čísla. Proto byla většina zhášečích experimentů provedena s použitím jódu, u kterého byl pozorován výrazný problém jen u 1 mM CTAB rozpuštěného v pufru. Experimenty s CPC byly provedeny spíše jen za účelem srovnání výsledků získaných pro dva odlišné typy zhášečů.

Pro stanovení N_{agg} je nutné znát hodnotu CMC pro daný systém. Při stanovení CMC byl sledován poměr 1. a 3. píku pyrenu v závislosti na rostoucí koncentraci CTAB v daném rozpouštědle bez a v přítomnosti HYA o různé koncentraci. Bylo zjištěno, že největší vliv na hodnotu kritické micelární koncentrace má rozpouštědlo. Ve vodě byla hodnota CMC bez hyaluronanu $0,94 \pm 0,005$ mM, v pufru $0,086 \pm 0,002$ mM a ve fyziologickém roztoku $0,064 \pm 0,002$ mM. To je způsobeno převážně iontovou silou roztoku. Největší vliv přídavku hyaluronanu na CMC měly vzorky, kde byla použita jako rozpouštědlo voda. Zde se měnila hodnota CMC s přídavkem HYA v rozmezí 0,62-0,94 mM, přičemž nejvíce byla hodnota CMC ovlivněna přídavkem vysokomolekulárního HYA o vyšší koncentraci. Za zmínku však stojí systém obsahující nízkomolekulární hyaluronan-tenzid-vodu, kde byly na Boltzmanově křivce patrné dva zlomy, což se dá vysvětlit tím, že nejprve vznikají agregáty CTAB-hyaluronan (1. zlom) a potom volné micely CTAB (2. zlom). To znamená, že následně vypočítaná hodnota N_{agg} těchto systémů nám dá jen průměrnou N_{agg} , protože není možné s jistotou říct, jak to v takovém systému vypadá a tedy jestli bylo určeno agregační číslo volných micel, micel zkondenzovaných na řetězci HYA a nebo agregátů micel s HYA. S použitím fyziologického roztoku jako rozpouštědla byl s přídavkem hyaluronanu zjištěn nárůst CMC, což je s největší pravděpodobností způsobeno elektostatickými interakcemi. Ovšem z výsledků je také patrné, že na posun CMC nemá přídavek hyaluronanu významný vliv, protože hodnoty naměřené pro systémy obsahující hyaluronan (0,068-0,073 mM) jsou velmi podobné s hodnotou kritické micelární koncentrace CTAB bez hyaluronanu. Ani v případě použití pufru nedošlo při přídavku hyaluronanu k výraznému posunu CMC. To může být dáno tím, že vliv působení pufru a HYA měl podobné elektrostatické interakce, takže CMC systému CTAB-pufr bez a s přídavkem hyaluronanu nám pak dá velmi podobné hodnoty.

Hlavním cílem této práce bylo zjistit průměrné hodnoty agregačního čísla CTAB bez a v přítomnosti nativního hyaluronanu. Vliv hyaluronanu na hodnotu *Nagg* CTAB je různý. Ve většině případů bylo zjištěno, že přídavek hyaluronanu snižuje hodnotu *Nagg* a nebo ji nechává takřka nezměněnou. V této práci byly objeveny dva případy, systém obsahující vysokomolekulární hyaluronan o nižší koncentraci-10 mM CTAB-fyziologický roztok a vysokomolekulární hyaluronan-1 mM CTAB-vodu, kde naopak přídavek HYA výrazně zvýšil hodnotu agregačního čísla. Je tedy pravděpodobné, že byla nalezena právě taková koncentrace hyaluronanu, která způsobuje tvorbu agregátů větších rozměrů. Je zajímavé, že u pufru byl pozorován vždy jen výrazný pokles *Nagg*. Což může být způsobeno tím, že v systému dochází k tvorbě kompaktnějších agregátů a nebo také chemickým složením pufru, které pravděpodobně dokáže narušit nadmolekulární doménu hyaluronanu a tím ovlivnit celý pozorovaný systém. Při porovnání vlivu hyaluronanu o dvou různých molárních hmotnostech bylo zjištěno, že nízkomolekulární hyaluronan nemá výrazný vliv na změnu agregačního čísla. Ale při použití vysokomolekulárního HYA došlo, ve většině případů, ke značné změně *Nagg* a to i ve velmi nízkých koncentracích.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Tato práce přinesla širší přehled účinku hyaluronanu na agregační chování kationaktivního tenzidu CTAB. Získané hodnoty by mohly být využity při dalším výzkumu nosičových systémů na bázi hyaluronanu. Zároveň tato práce upozornila na oblasti vhodné pro další a bližší zkoumání, jako je například nalezení takového zhašeče, který by nezpůsoboval žádné vedlejší účinky v pozorovaném systému a nebo by byly tyto účinky dostatečně známé. Dále se tu nabízí bližší zkoumání interakcí hyaluronan-tenzid jako například kolik micel je schopno se navázat na hyaluronan a také to zda se na HYA dokáže navázat i tenzid, který je přidán do systému obsahující hyaluronan-tenzid později (např. po 24 hodinové solubilizaci).

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KAKEHI, K., et al. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, vol. 797 [cit. 2010-02-11], s. 347-355. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [2] MLČOCHOVÁ, P., et al. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2007, vol. 69 [cit. 2010-02-11], s. 344-352. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [3] DŘÍMALOVÁ, E., et al. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2005, vol. 61 [cit. 2009-11-27], s. 420-426. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [4] Hyaluronan@3Dchem.com [online]. 2008 [cit. 2009-12-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=425>>.
- [5] BALAZS, E. A., DELINGER, J. L., *Ciba Foundation Symposium 143*. 1989, [cit. 2010-02-11] s. 256.
- [6] BALAZS, E. A., et al. Clinical uses of hyaluronan. *Novartis Foundation Symposium* [online]. 2007, vol. 61 [cit. 2010-02-11], s. 256-280. Dostupný z WWW: <www.google.com>.
- [7] SÁNCHEZ, G. F., et al. Intracellular energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence* [online]. 1996, vol. 69 [cit. 2009-12-01], s. 179-186. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [8] CUOMO, F., et al. Quenching efficiency of pyrene fluorescence by nucleotide monophosphates in cationic micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2009, vol. 202 [cit. 2009-09-05], s. 21-27. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [9] CRAMB, D. T., et al. Fluorescence quenching mechanisms in micelles: the effect of high quencher concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2000, vol. 134 [cit. 2009-11-02], s. 87-95. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [10] SARPAL, R. S., et al. The association parameters of bromide and iodide ions with cationic micelles using steady state fluorescence quenching measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 1994, vol. 88 [cit. 2009-11-29], s. 147-152. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [11] BHATTACHARYA, S. C., et al. 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* [online]. 1992, vol. 71 [cit. 2009-11-27], s. 147-152. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [12] AZUM, N., et al. Studies of mixed micelle formation between cationic gemini and cationic conventional surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2008, vol. 328 [cit. 2009-12-18], s. 429-435. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [13] BROWN, T. J. The development of hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, vol. 9, [cit. 2010-02-18]s. 253-260.

- [14] Využití tenzidů v analytické chemii [online]. [cit. 2009-11-21]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.htm>.
- [15] Tenzidy. *Wikipedie* [online]. [cit. 2010-01-15]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Tenzidy>>.
- [16] BANDYOPADHYAY, P., et al. Surfactant-induced fluorescent sensor activity enhancement of tryptophan at various pH. *Chemical Physics Letters* [online]. 2008, vol. 457 [cit. 2009-09-08], s. 227-231. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [17] EL-KEMARY, M. A., et al. Fluorescence decay of singlet excited-state of safranin T and its interaction with ground-state of pyridinthiones in micelles and homogeneous media. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2002, vol. 58 [cit. 2010-02-22], s. 3011-3019. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [18] WOLSZCZAK, M., et al. Characterization of non-ionic surfactant aggregates by fluorometric techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2002, vol. 147 [cit. 2008-02-14], s. 45-54. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [19] BARTOVSKÁ, L. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. 2000, [cit. 2009-11-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/N403015.html>>.
- [20] VASILESCU, M., et al. Aggregation numbers and microstructure characterization of self-assembled aggregates of poly(ethylene oxide) surfactants and related block-copolymers, studied by spectroscopic methods. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2001, vol. 89-90 [cit. 2008-02-14], s. 169-194. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [21] SINGH, S. T. Fluorescence behavior of intramolecular charge transfer probe in anionic, cationic, and nonionic micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2007, vol. 311 [cit. 2008-02-14], s. 128-134. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [22] IWUNZE, M. O. Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2004, vol. 111 [cit. 2010-04-13], s. 161-165. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [23] ALTAMIRANO, M. S., et al. Influence of Polarity and Viscosity of the Micellar Interface on the Fluorescence Quenching of Pyrenic Compounds by Indole Derivatives in AOT Reverse Micelles Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1998, vol. 205 [cit. 2008-02-14], s. 390-396. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [24] DONG, B., et al. Aggregation behavior of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution: Micellization and characterization of micelle microenvironment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, vol. 317 [cit. 2008-02-14], s. 666-672. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [25] PATRONI, S., et al. Effect of surfactant structure on the residual fluorescence of micelle-based fluorescent probes. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2007, vol. 313 [cit. 2008-02-14], s. 638-644. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [26] CUOMO, F., et al. Quenching efficiency of pyrene fluorescence by nucleotide monophosphates in cationic micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A:*

- Chemistry* [online]. 2009, vol. 202 [cit. 2009-11-05], s. 21-27. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [27] HASCALL, C. V., Laurent, C. T. Dr. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 2010-02-15], dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [28] PISÁRČIK, M., et al. Aggregation properties of sodium hyaluronate with Alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium Bromide) Surfactants in aqueous sodium chloride solution. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2000, vol. 228 [cit. 2009-10-08], s. 207-212. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [29] DAY, A. J., et al. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2001, vol. 11 [cit. 2009-12-06], s. 617-622. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [30] SANTOS, S. F., et al. Fluorescence Evidence for Formation of a Hyaluronate Ion Dodecyltrimethylammonium Bromide Complex. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1994, vol. 164 [cit. 2010-04-01], s. 260-262. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [31] STERN, R., et al. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances* [online]. 2007, vol. 6 [cit. 2009-11-29], s. 537-557. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [32] PISÁRČIK, M., et al. Viscometric study of the sodium hyaluronate-sodium chloride-alkyl-(*n*)-ammonium surfactant system. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, vol. 150 [cit. 2010-01-08], s. 207-216. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [33] THALBERG, K., et al. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Chemical Physics* [online]. 1989, vol. 193 [cit. 2010-02-14], s. 1478-1483. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org/>.
- [34] SCOTT, J. E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. some biological consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 2010-2-14], dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [35] ASARI, A., et al. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Archive of Histology and Cytology* [online]. 1998, vol. 61 [cit. 2010-02-14], s. 125-35.
- [36] ASARI, A., et al. Medical application of Hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2000, [cit. 2009-11-20], dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [37] ŠÍMA, J. *Spektrometrické analytické metody* [online]. 1999 [cit. 2009-10-05]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm>.
- [38] Molekulová absorbance [online]. 2008 [cit. 2009-10-05]. Dostupný z WWW: <<http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/>>.
- [39] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. Weinheim (Federal Republic of Germany) : WILEY-VCH Verlag GmbH 69469, 2002. 399 s. ISBN 3-527-29919-X.
- [40] LAKOWICZ, Joseph R.. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 10013, 1999. 398 s. ISBN 0-306-46093-9.
- [41] KLÁN, P.. *Organická fotochemie*. 1.vydání, Brno: Vydavatelství MU, 2001. 121 s. ISBN 80-210-2526-3.

- [42] MARTINHO, J. M. G., et al. Fluorescence quenching of pyrene monomer and excimer by CH₃I. *Chemical Physics* [online]. 2001, vol. 264 [cit. 2009-09-25], s. 111-121. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [43] MARTINHO, J. M. G. Heavy-Atom Quenching of Monomer and Excimer Pyrene Fluorescence. *Chemical Physics* [online]. 1989, vol. 93 [cit. 2009-09-25], s. 6687-6692. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [44] PANDEY, S., et al. Spectrochemical investigations in molecularly organized solvent media: evaluation of nitromethane as a selective fluorescence quenching agent for alternant PAils dissolved in micellar solvent media. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1996, vol. 324 [cit. 2010-03-14], s. 175-181. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [45] HIDALGO, J., et al. Fluorescence quenching of betacarboline (9H-pyrido[3,4-b]indole) induced by intermolecular hydrogen bonding with pyridines. *Journal of Luminescence* [online]. 2007, vol. 127 [cit. 2008-04-09], s. 671-677. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [46] LIU, B., et al. Fluorescence resonance energy transfer between acridine orange and rhodamine 6G and analytical application in micelles of dodecyl benzene sodium sulfonate. *Journal of Luminescence* [online]. 2006, vol. 188 [cit. 2008-04-09], s. 99-105. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [47] CRAMB, D. T., et al. Fluorescence quenching mechanisms in micelles: the effect of high quencher concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2000, vol. 134 [cit. 2008-04-09], s. 87-95. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [48] GAO, N., et al. Surface and micelle properties of novel multi-dentate surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2007, vol. 314 [cit. 2008-04-09], s. 707-711. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [49] SULAK, K., et al. Photophysical study on aggregation of carboxylic perfluoropolyether derivatives in water: Time resolved fluorescence quenching measurements in the temperature range 297–333 K. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2007, vol. 191 [cit. 2008-04-09], s. 1-5. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [50] SOMASUNDARAN, P. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Columbia University, New York FL 33487-2742, 2006, vol. 5, second edition.
- [51] UMLONG, I. M., ISMAIL, K.. Micellization behaviour of sodium dodecyl sulfate in different electrolyte media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2007, vol. 299 [cit. 2008-04-09], s. 8-14. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [52] SZAJDZINSKA-PIETEK, E., et al. Micellization behaviour of sodium dodecyl sulfate in different electrolyte media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2007, vol. 299 [cit. 2010-03-18], s. 8-14. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [53] TURRO, N. J., YEKTA, A. Luminescent probes for detergent solution. A simple method for determination of the mean aggregation number of micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, vol. 100, s. 5951-5952.
- [54] ALMGREN, M. Energy transfer from micellar sodium phenylundecanoate to solubilized naphthalene. *Photochem. Photobiol.* 1972, vol. 15, s. 297-309.

- [55] YEKTA, A., et al. Fluorescence Studies of Associating Polymers in Water: Determination of the Chain end Aggregation Number and a Model for the Association Process. *Macromolecules*. 1995, vol. 28 [cit. 2010-03-18], s. 956-966.
- [56] CAI, S., et al. Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan-cisplatin conjugate. *Journal of surgical research. Journal of Surgical Research* [online]. 2008, vol. 147 [cit. 2009-10-23], s. 247-252.
- [57] KNUDSON, W. The hyaluronan Receptor, CD44. *Glycoforum* [online]. 2004, [cit. 2010-2-14], dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [58] DAY, A. J., PRESTWICH, G. D. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, vol. 277 [cit. 2010-02-14], s. 4585–4588.
- [59] TOOLE, B. P. Hyaluronan in Morphogenesis and Tissue Remodeling.. *Glycoforum* [online]. [cit. 2010-2-14], dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [60] MURANO, M., et al. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity of a Novel Injectable Hyaluronan-Methotrexate Conjugate.[online]. 2009, [cit. 2010-2-14], dostupné z <http://www.eurand.com/pdf/EURX_Posters_2009.pdf>.
- [61] YIN, D., et al. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research* [online]. 2005, vol. 340 [cit. 2010-03-18], s. 1201-1206. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [62] MONTEUX, C., et al. Interfacial Microgels Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants. 1. Influence of Polyelectrolyte Molecular Weight. *Langmuir* [online]. 2004, vol. 20 [cit. 2010-03-18], s. 5358-5366. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org>.
- [63] BOEKEMA, E. J., et al. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid–detergent systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2007, vol. 1768 [cit. 2010-04-03], s. 2681-2689. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org>.
- [64] INFELTA, P. Fluorescence quenching in micellar solutions and its application to the determination of aggregation numbers. *Chemical physics letters*. 1979, vol. 61, [cit. 2010-04-03], s.88-91.
- [65] SCHUCH, M., et al. Formation and Fluorimetric Characterization of Micelles in a Micro-flow Through System with Static Micro Mixer. *Sensors* [online]. 2007, vol. 7, [cit. 2009-12-03], s. 2499-2509. Dostupný z WWW: <www.google.com>.
- [66] SHABARTA, J. G., et al. *Analytical chemistry*. 1984, vol. 56, [cit. 2009-10-25], s. 1132A.
- [67] FENDLER, J. H., et al. Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems. *Academic Press, New York*. 1975, [cit. 2010-10-25], s 20.
- [68] AGUIAR, J., et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2003, vol. 258 [cit. 2008-04-17], s. 112-116. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [69] PANDEY, S., et al. Cetylpyridinium chloride micelles as a selective fluorescence quenching solvent media for discriminating between alternant versus nonalternant polycyclic aromatic hydrocarbons. *Talanta* [online]. 1997, vol. 45 [cit. 2009-11-13], s. 39-45. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.

8 SEZNAM SYMBOLŮ

Mr	molekulová hmotnost
PAL	povrchově aktivní látka
CPB	cetylpyridinium bromid
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SDS	dodecylsulfát sodný
CPC	cetylpyridinium chlorid
Brij 35	polyoxyethylen(23)dodekanol
Triton X-100	polyoxyethylen(9,5)oktylfenol
CMC	kritická micelární koncentrace
HAY	hyaluronan
kDa	kilodalton, 10^3 g mol^{-1}
MDa	megadalton, 10^6 g mol^{-1}
CH	uhlíkatá jednotka methenylová skupina
I_1/I_3	intenzita fluorescence 1./3. píku
S_0, S_1, S_2	elektronové stavy
T_1, T_2	tripletové stavy
M^*	excitovaná molekula
Q	zhášec
$(MM)^*$	excimer
k_I	rychlostní konstanta reakce
k_{-I}	rychlostní konstanta zpětné reakce
k_R	rychlostní konstanta prvního řádu
k_M	rychlostní konstanta pro skutečnou deexcitaci M^*
τ_0	doba života excitovaného stavu
$h\nu$	zářivá energie
k_q	bimolekulární zhášecí konstanta
p	efektivita (pravděpodobnost setkání párů v reakci)
I_0	intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášeče
I	intenzita fluorescence v přítomnosti zhášeče
Φ_0	kvantový výtěžek fluorescence bez přítomnosti zhášeče
Φ	kvantový výtěžek fluorescence v přítomnosti zhášeče
$[Q]$	koncentrace zhášeče
K_{SV}	Stern-Volmerova zhášecí konstanta
k_{qe}	konstanta kolizního zhášení
k_E	konstanta excitovaného stavu
$[F-Q]$	koncentrace komplexu
$[F]$	koncentrace fluoroforu
K_S	disociační konstanta
K_D	Stern-Volmerova konstanta pro dynamické zhášení
τ	celá doba excitovaného stavu
D	koeficient difúze
PET	fotoindukovaný transport elektronů
A	akceptor
D	donor

$(DA)^*$	exciplex
ΔH^0	standartní entalpie
N_A	avogadrova konstanta
ΔG^0	standartní gibbsova energie
R	plynová konstanta
T	absolutní teplota
RET	nezářivý přenos energie
TRFQ	zjištění doby zhášení fluorescence
k_0	rychlostní konstanta fluorescence
k^+	rychlostní konstanta zhášeče při vstupu
k^-	rychlostní konstanta zhášeče při výstupu
$[M]$	koncentrace micely
K	rovnovážná konstanta zhášeče vázaná k micelle
k_{qm}	rychlostní konstanta zhášení fluorescence uvnitř micely
N_{agg}	agregační číslo
$[S]$	koncentrace tenzidu
n	množství zhášeče
k	směrnice přímky
F_{Corr}	intenzita fluorescence s korekcí
F_{OBS}	intenzita fluorescence bez korekce
$O. D_{ex}$	hodnota optické hustoty při dané excitované vlnové délce
$O. D_{em}$	hodnota optické hustoty při dané emisní vlnové délce

9 PŘÍLOHY

Tabulka 6 Parametry filtru pro pyrenová data

vzorek	parametry fitu	bez HYA	HYA 650 kDa 15 mg·dm ⁻³	HYA 1,4 MDa ↑ koncentrace	HYA 1,4 MDa ↓ koncentrace
CTAB ve vodě	x_0	0,94	0,82	0,62	0,94
	Δx	0,02	0,13	0,12	0,04
	A_1	1,43 ± 0,01	1,16 ± 0,02	1,44 ± 0,01	1,42 ± 0,01
	A_2	1,07 ± 0,01	1,06 ± 0,01	1,07 ± 0,01	1,08 ± 0,01
	R^2	0,9987	0,9788	0,9917	0,9937
CTAB v pufru	x_0	0,086	---	0,058	---
	Δx	0,02	---	0,02	---
	A_1	1,46 ± 0,01	---	1,47 ± 0,03	---
	A_2	1,06 ± 0,01	---	1,09 ± 0,01	---
	R^2	0,9941	---	0,9906	---
CTAB ve fyziologickém roztoku	x_0	0,064	0,073	0,077	0,068
	Δx	1,22	0,01	0,02	0,01
	A_1	1,43 ± 0,01	1,43 ± 0,01	1,48 ± 0,01	1,45 ± 0,01
	A_2	1,07 ± 0,01	1,07 ± 0,01	1,11 ± 0,01	1,07 ± 0,01
	R^2	0,9962	0,9978	0,9942	0,9980