



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY  
MATERIALS RESEARCH CENTRE

# FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE V HYDROFILNÍCH KOLOIDECH

FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY IN HYDROPHILIC COLLOIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

EVA RÝCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. TEREZA HALASOVÁ, PhD.

BRNO 2014



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

## Zadání bakalářské práce

|                         |   |                                  |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | <b>FCH-BAK0807/2013</b>                     | Akademický rok: <b>2013/2014</b> |
| Ústav:                  | Centrum materiálového výzkumu               |                                  |
| Student(ka):            | <b>Eva Rýcová</b>                           |                                  |
| Studijní program:       | Chemie a chemické technologie (B2801)       |                                  |
| Studijní obor:          | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)   |                                  |
| Vedoucí práce           | <b>Ing. Tereza Halasová, Ph.D.</b>          |                                  |
| Konzultanti:            | Ing. Jana Hejná<br>Ing. Filip Mravec, Ph.D. |                                  |

### Název bakalářské práce:

Fluorescenční korelační spektroskopie v hydrofilních koloidech

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma hydrogely a měření jejich vlastností pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie.
2. Provést experimenty na modelových systémech se zaměřením na metodiku FCS
3. Zhodnocení použitelnosti FCS pro měření vlastností hydrogelů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

-----  
Eva Rýcová  
Student(ka)

-----  
Ing. Tereza Halasová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato práce je zaměřena na hydrofilní koloidy a jejich zkoumání pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Pomocí několika fluorescenčních sond byly zkoumány gelové systémy v prostředí 0,15 M chloridu sodného (NaCl) obsahující hyaluronan a tenzid cetyltrimetylamoniumbromid (CTAB). Pro bližší zkoumání byla zvolena sonda ATTO 655 kvůli potlačenému vzniku tripletního stavu a každé prostředí vyskytující se v gelovém systému bylo prozkoumáno individuálně. Výsledky ukázaly, že měření gelových systémů touto metodou je možné za určitých podmínek realizovat, opakovatelnost výsledků byla zatížena jen malou směrodatnou odchylkou. Prodloužení difúzních časů způsobila přítomnost micel, tripletní stav byl způsoben charakteristickým prostředím hydrogelu. Sonda ve všech prostředích vykazovala také volný difúzní pohyb, který byl reprezentován nejkratším difúzním časem.

## **ABSTRACT**

This work is focused on studying of hydrophilic colloids using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). The gel systems were studied with several fluorescent probes, in 0,15 M sodium chloride (NaCl) consist of hyaluronan and surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Probe ATTO 655 was chosen for closer examination due to the suppression of triplet state. Every surrounding occuring in the gel systems was examine individually. Results showed that the measurement of gel systems by this method can be realized under certain conditions, the repeatability of the results was loaded with a small standard deviation. Extension of diffusion times caused the presence of micelles, triplet state was caused by a characteristic environment of the hydrogel. The probe also showed free diffusion motion in all environments. This diffusion motion was represented by the shortest diffusion time.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Fluorescenční korelační spektroskopie, hydrofilní koloidy, hyaluronan, cetyltrimetylamonium bromid, fluorescenční sonda ATTO 655

## **KEYWORDS**

Fluorescence correlation spectroscopy, hydrophilic colloids, hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, fluorescent probe ATTO 655

RÝCOVÁ, E. *Fluorescenční korelační spektroskopie v hydrofilních koloidech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

*Poděkování:*

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

*Mé osobní poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce Ing. Tereze Halasové, PhD za ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Filipu Mravcovi, PhD a Ing. Janě Hejně za cenné rady a tolik potřebné povzbuzení. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu nejen ve studiu.*

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | ÚVOD .....   | 6  |
| 2.       | TEORETICKÁ ČÁST.....   | 7  |
| 2.1.     | Kyselina hyaluronová.....  | 7  |
| 2.1.1.   | Struktura .....  | 7  |
| 2.1.2.   | Izolace .....  | 7  |
| 2.1.3.   | Výskyt a význam v organismu .....  | 8  |
| 2.2.     | Tenzidy.....   | 8  |
| 2.2.1.   | CTAB .....   | 8  |
| 2.3.     | Fluorescence.....  | 9  |
| 2.3.1.   | Jabloňského diagram.....   | 9  |
| 2.4.     | Fluorescenční sondy .....  | 11 |
| 2.4.1.   | ATTO 655 maleimid .....  | 11 |
| 2.4.2.   | Perylen.....   | 12 |
| 2.4.3.   | Fluorescein .....  | 12 |
| 2.4.4.   | Rhodamin .....   | 13 |
| 2.4.4.1. | Rhodamin 6G .....  | 13 |
| 2.5.     | Fluorescenční korelační spektroskopie .....  | 13 |
| 2.5.1.   | Experimentální uspořádání.....   | 14 |
| 2.5.2.   | Autokorelační funkce .....   | 15 |
| 2.5.3.   | Tripletní stav .....   | 16 |
| 2.5.4.   | Časově rozlišená FCS.....  | 16 |
| 2.5.5.   | FLIM .....   | 17 |
| 3.       | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ LITERATURY.....   | 18 |
| 3.1.     | Práce zabývající se hydrogely na bázi hyaluronanu pro cílenou distribuci léčiv. 18 |    |
| 3.2.     | Práce zabývající se zkoumáním hydrogelů pomocí FCS.....                            | 19 |
| 4.       | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....  | 21 |
| 4.1.     | Přístroje a vybavení .....   | 21 |
| 4.2.     | Použité programy .....   | 22 |
| 4.3.     | Použité chemikálie .....   | 22 |
| 4.4.     | Pracovní postupy .....   | 22 |
| 4.4.1.   | Příprava zásobního roztoku HyA .....   | 22 |
| 4.4.2.   | Příprava zásobního roztoku CTAB .....  | 22 |
| 4.4.3.   | Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy .....                               | 22 |
| 4.4.4.   | Příprava zásobního roztoku rozpouštědla .....                                      | 22 |
| 4.4.5.   | Příprava roztoků pro fluorescenční měření .....                                    | 23 |
| 4.5.     | Nastavení přístroje.....   | 23 |
| 4.6.     | Výsledky a diskuze.....  | 23 |
| 4.6.1.   | TCSPC analýza .....  | 26 |
| 4.6.2.   | FCS analýza.....   | 31 |
| 5.       | ZÁVĚR.....   | 37 |
| 6.       | POUŽITÁ LITERATURA.....  | 39 |
|          | Teoretická část.....   | 39 |
|          | Rešerše.....   | 41 |
| 7.       | SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ .....   | 43 |
| 7.1.     | Seznam zkratk .....  | 43 |
| 7.2.     | Seznam symbolů .....   | 43 |
| 8.       | PŘÍLOHY.....   | 44 |

## 1. ÚVOD

Fluorescenční korelační spektroskopie byla objevena na konci 20. století a od té doby byl učiněn obrovský pokrok ve využití této metody. Můžeme zkoumat látky a jejich chování v různých prostředích ve vysokém rozlišení. Omezením v této metodě je pouze nutnost látek vykazovat fluorescenci. Pro pozorování nefluoreskujících látek je nutná modifikace fluorescenčním činidlem na fluoreskující derivát. Na trhu existuje mnoho druhů látek, které jsou používány k modifikaci. Liší se vlnovou délkou excitačního a emisního maxima, strukturou i cenou. Cílem této práce je prozkoumat vliv fluorescenčních činidel na chování v různých typech hydrofilních koloidů.

Hydrofilní koloidy byly zvoleny díky jejich vysokému potenciálu při použití v medicínských aplikacích. Cílená distribuce léčiv je stěžejním tématem mnoha vědců a hydrofilní koloidy by mohly splňovat náročná kritéria pro výběr materiálů jako nosičů léčiv. Kyselina hyaluronová, která je použita jako hlavní materiál v přípravě hydrogelů, je ideálním nosičem léčiv, právě pro svou kombinaci vhodných vlastností – je biokompatibilní, neimunogenní, necytotoxická.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Kyselina hyaluronová

Poprvé byla izolována v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem z hovězího sklivce. Její název pochází z řeckého výrazu pro sklo „hyalos“ a uronové kyseliny, která je součástí molekuly. Poprvé byla využita v roce 1942 Endre Balaszem jako náhrada vaječného bílku v pekařství. První medicínské použití je datováno v 50. letech 20. století jako náhrada sklivce v oční chirurgii [1].

#### 2.1.1. Struktura

Lineární nerozvětvený polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny-D-glukoronové a N-acetylglukosaminu spojených střídavě  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidickými vazbami se vyskytuje u savců a některých mikroorganismů ve formě sodné nebo draselné soli [1, 2].

Energetická stabilita disacharidové jednotky je dána výhodným sterickým uspořádáním – objemné skupiny jsou umístěny v ekvatoriální rovině, zatímco malé vodíky jsou v energeticky méně výhodné axiální rovině [1].

Pokud není hyaluronan vázán na jiné molekuly, váže na sebe vodu a tvoří velmi viskózní roztoky. Ve fyziologickém (nebo jiném vodném) roztoku tvoří oporu molekule vodíkové můstky. Axiální vodíky tvoří nepolární, relativně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální boční řetězce tvoří polární, hydrofilní část [1]. V roztoku se chová jako polyanion; pH prostředí udává jeho chování [4]. V důsledku tohoto uspořádání tvoří hyaluronan v roztoku tzv. náhodně stočenou stuhu. Vlastnosti vazeb v molekule ale náhodnost vylučují. Řetězec hyaluronanu obsahuje hned několik typů vazeb. Vazby v cukerných kruzích jsou kovalentní a takřka neměnné, tím udržují tvar cukerných zbytků. Ty jsou pak mezi sebou přes atom kyslíku spojeny kovalentní glykosidickou vazbou, která je stabilizována vodíkovými můstky.

Substituenty, které jsou připojeny z obou stran ke kyslíku, mohou rotovat o  $360^\circ$ . Přestože molekulární modelování ukázalo, že kolem této vazby nemají cukerné jednotky úplnou svobodu otáčení, je zde několik způsobů konfigurace na každém glykosidickém můstku. Vzhledem k množství těchto můstků na celém řetězci se tedy může tato stočená stuha jevit jako náhodná, ale není [3].

Díky hydrofobním oblastem na molekule je schopen se vázat na fosfolipidy. Hyaluronan (HyA) se aktivně podílí na buněčné adhezi, proliferaci a dalších buněčných procesech. Řetězce hyaluronanu mohou také reagovat mezi sebou a tvořit síťované struktury [3].

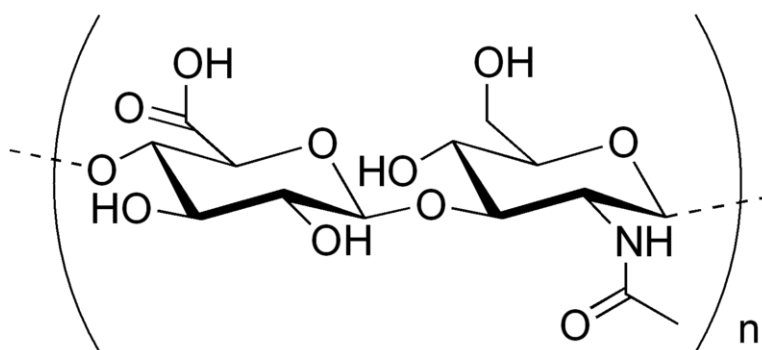
#### 2.1.2. Izolace

Izolovat kyselinu hyaluronovou je možné z několika zdrojů. Obsahují ji pupeční šňůry, nebo žraločí kůže, problémem je, že hyaluronan se nevyskytuje sám, ale je obklopen řadou dalších molekul, jako jsou proteiny, bakteriální endotoxiny, nukleové kyseliny, chondroitin sulfát a další. Jako zdroj kyseliny hyaluronové pro laboratorní mohou být také využity kohoutí hřebínky. Proces je ale velmi nákladný a neposkytuje takovou čistotu, jako jiné zdroje, a proto je ekonomicky výhodnější použít fermentaci bakterií rodu *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equi* [5]. Tyto bakterie vytváří hyaluronové kapsuly. Membránové enzymy z kategorie hyaluronan-syntáz katalyzují tuto reakci a pomáhají udržet pohromadě metabolicky náročný růst kapsule. Pomocí bakterií můžeme získat hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti a o velmi vysoké čistotě, bez nežádoucích vedlejších produktů, jako např. proteinů živočišného původu [18].

### 2.1.3. Výskyt a význam v organismu

V lidském těle jej najdeme v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži ve formě sodné soli. Největší množství se vyskytuje v tkáních obratlovců, tento biopolymer je hlavní součástí extracelulárního matrix a v synoviální tekutině snižuje tření a tlumí nárazy v kloubech. Je obsažen také v pupeční šňůře. Podporuje tvorbu granulované tkáně při hojení ran a při zánětech. Jeho funkce v těle zahrnuje zadržování vody a zvlhčování pohyblivých částí těla, jako jsou např. klouby a svaly. Hyaluronan je jedna z nejvíce hydrofilních molekul vyskytujících se v přírodě a právě jeho unikátní viskoelastická s biokompatibilitou vedou k využití hyaluronanu v mnoha medicínských odvětvích, např. doplňování mezikloubní tekutiny, slouží jako nástroj v oční chirurgii, využívá se při hojení ran a může být využit v cílené distribuci léčiv [1, 2].

Vysokomolekulární hyaluronan se chová jako lubrikant a v chrupavkách a mezikloubních prostorech snižuje bolestivé projevy různých kloubních onemocnění [6], zatímco nízkomolekulární hyaluronan nalezne uplatnění např. v kosmetice [7].



Obr. č. 1: Struktura monomeru kyseliny hyaluronové

## 2.2. Tenzidy

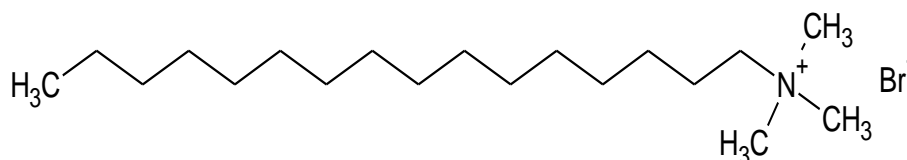
Tenzid je organická látka, která se již při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní a snižuje tak povrchové napětí [8]. Skládá se ze dvou částí, lyofilní (ve vodě hydrofilní) části (obsahující polární skupiny), a lyofobní (hydrofobní) části (dlouhé uhlovodíkové řetězce).

Právě amfifilní struktura tenzidů je zodpovědná za tendenci agregace v roztoku a tvorbu micel a membrán [9]. Pokud je molekula schopna disociace, je tenzid ionogenní. Pokud odštěpuje proton a dále nese záporný náboj, je anionaktivní. Naopak pokud proton přijímá z okolí, je kationaktivní. Podle charakteru hydrofilní části můžeme tenzidy rozdělit na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní.

### 2.2.1. CTAB

Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) patří mezi kationaktivní tenzidy, nese tedy kladný náboj na dusíku a vyskytuje se ve formě kvartérní amoniové soli. Ochotně tvoří hydrogely s hyaluronanem a proto byl zvolen modelovým tenzidem pro náš výzkum, i přes svou toxicitu ve vyšších koncentracích [10].





Obr. č. 2: Cetyltrimethylamonium bromid

### 2.3. Fluorescence

Luminiscence je emise světla látky, která je uvedena do excitovaného stavu. V případě, že zdrojem světla je elektromagnetické záření, mluvíme o fotoluminiscenci. Rozdělujeme se do dvou částí – fosforescence a fluorescence, přičemž tyto dva druhy záření odlišujeme na základě charakteru jejich excitovaných stavů. Fosforescence je přechod kvanta energie z tripletového stavu. Stejným způsobem probíhá i fluorescence, s tím rozdílem, že jde o přechod ze stavu singletového.

Molekuly, které jsou schopné absorbovat světlo a následně vykazovat fluorescenci, se nazývají *fluorofory*. Za absorpci a emisi je však odpovědná pouze část dané molekuly, tzv. *chromofor*, což může být systém  $\pi$ -konjugovaných vazeb u aromatických sloučenin ( $\beta$ -karoten),  $\pi$ -vazba mezi dvěma dusíky (azosloučeniny), organokovová sloučenina (chlorofyl). Informace o excitačních a emisních maximech vyčteme z příslušných spekter. *Excitační spektrum* je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce, při konstantní vlnové délce emisního záření, *emisní spektrum* je tatáž závislost, ale při konstantní vlnové délce budícího záření. V některých případech je možné pozorovat zajímavý jev, a to, že absorpční a emisní spektra jsou zrcadlovým obrazem. Je to díky tomu, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou pravděpodobnost. Rozdíl v energiích mezi maximy excitačního a emisního pásu se nazývá *Stokesův posuv*.

Fluorescenci můžeme charakterizovat několika pojmy:

- intenzita*: počet fotonů prošlých jednotkovou plochou za jednotku času
- polarizace*: směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- kvantový výtěžek* je podíl počtu fotonů emitovaných fluoroforem a absorbovaných za jednu sekundu [11, 12].

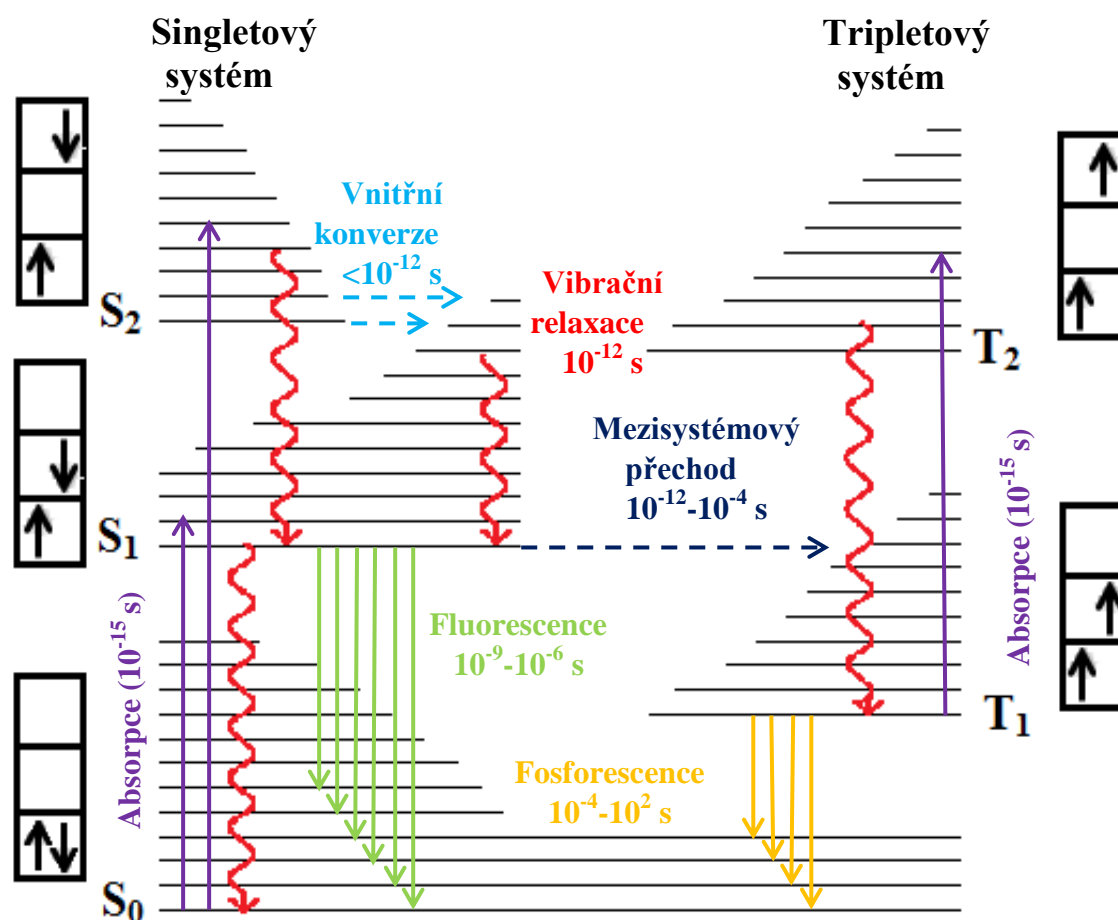
$$\phi_F = \frac{N_E}{N_A}, \quad (1)$$

#### 2.3.1. Jablůnskiho diagram

Když je molekula v singletovém stavu, má dva opačně orientované spiny, a při excitaci dojde k přenosu jednoho spinu do vyšší energetické hladiny, je tento stav tzv. spinově povolený, pouze v případě že se spin nezmění. Pokud je elektron ve vyšším excitovaném stavu, pak vnitřní konverzí přechází na překrývající se vyšší vibrační hladinu nižšího excitovaného stavu beze změny energie ( $10^{-12}$  -  $10^{-9}$  s). Podobně funguje i mezisystémový přechod, kdy elektron přejde do tripletového excitovaného stavu, přičemž změní svůj spin. Tento přechod je časově náročnější ( $10^{-8}$  s).

Dalším procesem, který může probíhat je *vibrační relaxace*, kde dochází k disipaci energie ve formě tepla a takovéto procesy jsou v diagramu naznačeny vlnovkou a nejsou předmětem této práce.

U zářivých procesů, které se v diagramu značí plnou šipkou, systém emituje energii ve formě světla o dané vlnové délce jemu charakteristické. Při návratu elektronu zpět do základní energetické hladiny dojde k emisi světla ze singletového stavu velmi rychle, v řádech  $10^{-8}$  s a tomuto vyzáření říkáme *fluorescence*. Emisi světla z tripletového excitovaného stavu říkáme *fosforescence*. Spin v tripletovém excitovaném stavu má stejnou orientaci jako spin ve stavu základním a tento přechod je tedy spinově (kvantově) zakázaný. Než se elektron vrátí zpět na svůj základní energetický stav, uběhne cca  $10^{-3}$ - $10^0$  s, proto fosforescenci můžeme pozorovat i v řádech milisekund až sekund [11]. Fosforescenci obvykle není možné pozorovat v roztocích za pokojové teploty z důvodu mnoha faktorů rušících toto záření, a to zhasnutí fluoroforu a taky faktu, že nelze zcela odlišit fosforescenci od fluorescence [12].



Obr. č. 3: Jablonského diagram

Fluorescence podléhá několika pravidlům:

**Stokesův zákon** udává, že vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla, což je způsobeno tím, že po absorpci světla molekulou dojde k částečné ztrátě energie při přechodu z vyšších excitovaných hladin na základní hladinu daného excitovaného stavu (vibrační relaxace).

**Kashovo pravidlo** nám říká, že než dojde k emisi světla, molekula nejprve podstoupí relaxaci vibrační energie na základní excitovanou hladinu  $S_1$  a až poté dojde k fluorescence.

Důsledkem Kashova pravidla je **Vavilovo pravidlo**, které říká, že kvantový výtěžek není závislý na vlnové délce budícího záření a emisní spektra tedy nejsou závislá na vlnové délce excitace.

## 2.4. Fluorescenční sondy

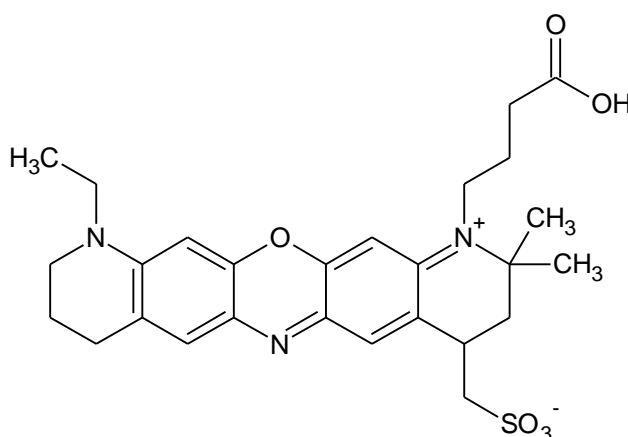
Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory nekovalentně vázané k dané struktuře. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

Tabulka č. 1: Absorpční a emisní maxima fluoroforů

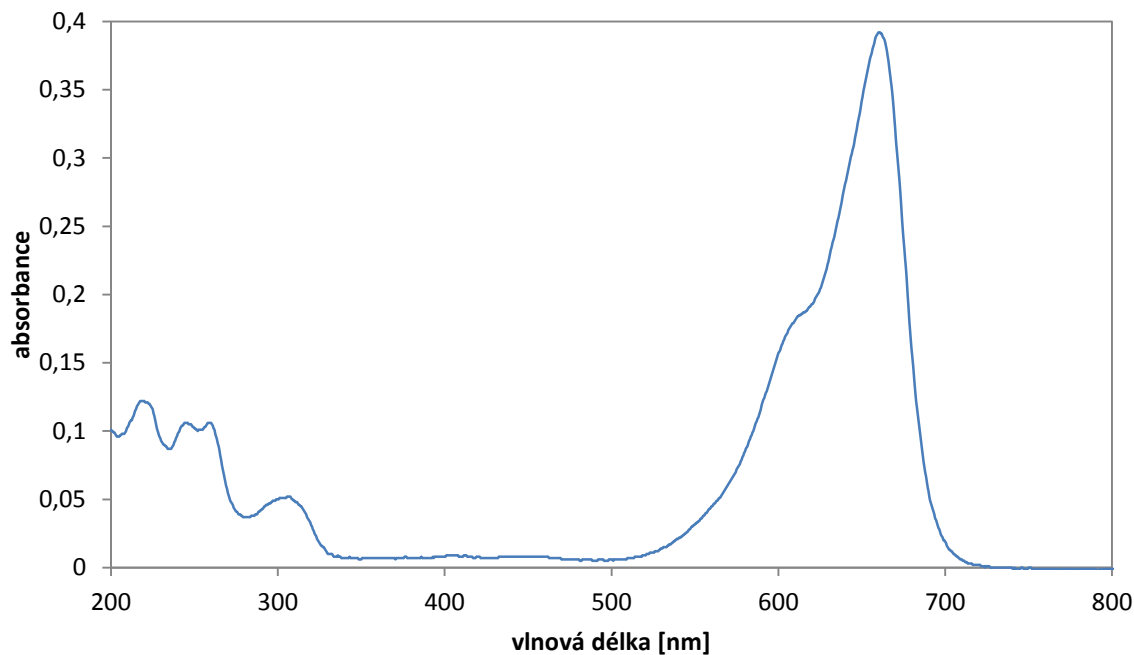
| fluorofor   | rozpouštědlo | absorpční maximum $\lambda$ [nm] | emisní maximum $\lambda$ [nm] |
|-------------|--------------|----------------------------------|-------------------------------|
| ATTO 655    | voda         | 663                              | 684                           |
| perylene    | cyklohexan   | 410                              | 435                           |
| fuorescein  | voda         | 494                              | 521                           |
| rhodamin 6G | methanol     | 528                              | 551                           |

### 2.4.1. ATTO 655 maleimid

ATTO 655 je krystalická látka s molekulovou hmotností  $650 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , absorpčním maximem při 663 nm a molárním extinkčním koeficientem  $1,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Je rozpustná ve vodě, ethanolu i tetrahydrofuranu (THF). Vodný roztok má modrou barvu. Používá se pro značení DNA, RNA a bílkovin, např. pro značení thiolových skupin cysteinu. Struktura molekuly je vyznačená na obrázku č. 4a. Tato modifikace byla vybrána kvůli potlačení vzniku tripletního stavu. Absorpční spektrum je vyobrazeno na obrázku č. 4b.



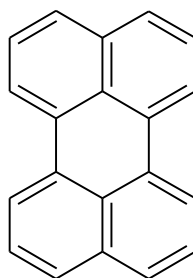
Obr. č. 4a: Struktura sondy ATTO 655



Obr. č. 4b: Absorpční spektrum sondy ATTO 655 v rozmezí viditelné a UV oblasti

#### 2.4.2. Perylen

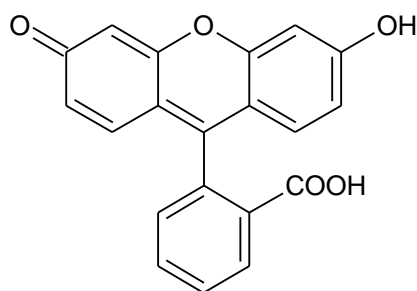
Perylen je hnědý krystalický polycyklický aromatický uhlovodík se sumárním vzorcem  $C_{20}H_{12}$  a molární hmotností  $252,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Perylen a jeho deriváty jsou karcinogenní a znečišťují životní prostředí. Strukturálně jsou to dva naftalenové cykly spojené vazbou C-C v poloze 1 a 8. Je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech a jeho modrou fluorescenci je možné pozorovat při denním světle. Ve vodě je rozpustný pouze v micelách. Je schopný vytvářet excimery, tedy komplexy dvou molekul perylenu, z nichž jedna je v excitovaném stavu.



Obr. č. 5: Struktura perylenu

#### 2.4.3. Fluorescein

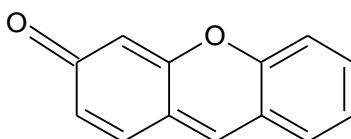
Červený prášek tající při  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  a rozpustný ve vodě i alkoholech. Disodná sůl této látky se nazývá uranin a používá se jako pigmentová žluť. Syntetizujeme ji Friedel-Craftsovou reakcí anhydridu kyseliny ftalové a resorcinolu, kdy za přítomnosti chloridu zinečnatého vzniká fluorescein. Jiná syntetická cesta vede přes metansulfonovou kyselinu zvolenou jako katalyzátor. Druhá zmíněná cesta vede k větším výtěžkům za mírnějších reakčních podmínek.



Obr. č. 6: Struktura fluoresceinu

#### 2.4.4. Rhodamin

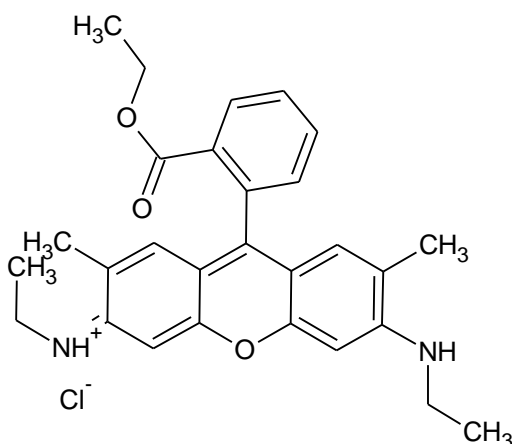
Rhodamin je celá skupina chemických barviv odvozených od sloučeniny fluoronu. Fluoron je heterocyklická sloučenina tvořící jádro mnoha látek, převážně fluorescenčních barviv (rhodamin, fluorescein, erytrosin). Příkladem skupiny rhodaminů je Rhodamin 6G, Rhodamin B nebo Rhodamin 123.



Obr. č. 7: Struktura fluoronu

##### 2.4.4.1. Rhodamin 6G

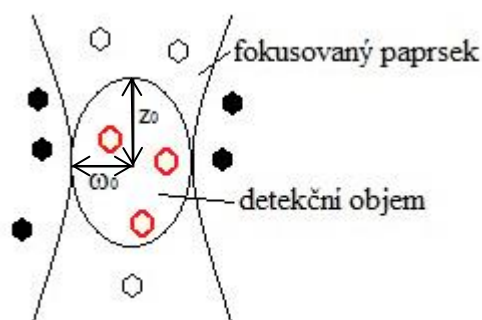
Červenohnědý prášek rozpustný ve vodě a v alkoholech. Sumární vzorec je  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ .



Obr. č. 8: Struktura Rhodaminu 6G

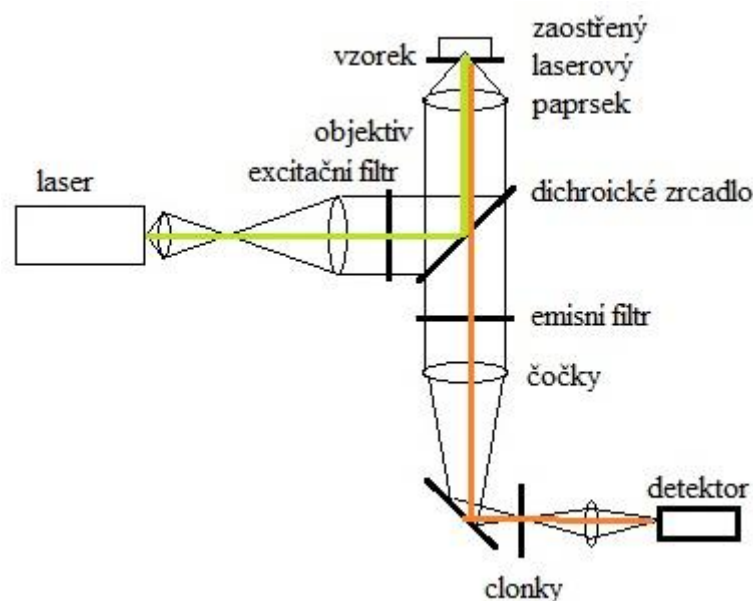
### 2.5. Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je speciální odvětví fluorescenční spektroskopie, kdy měříme časové změny intenzity fluorescence způsobené difúzním pohybem samotných molekul. Tato poměrně nová metoda využívá velmi malý detekční objem, asi 0,3-1 femtolitr [14], kterým mohou procházet molekuly v řádu jednotek.



Obr. č. 9: Schéma detekčního objemu. Excitovány jsou jen molekuly ve fokusovaném paprsku, mimo tento prostor molekuly nefluoreskují (černě zbarvené). Fluorescenční signál pochází z konfokálního objemu (červeně naznačeno).

Analýza signálu nám přináší dodatečné informace o velikosti částic, pohyblivosti a koncentraci fluorescenční látky ve vzorku. Když molekula vstoupí do detekčního objemu, intenzita fluorescence vzroste, když naopak molekula opustí detekční objem, dojde k poklesu signálu. Statistickou analýzou fluorescenčního signálu lze určit, jak dlouho molekula setrvala v excitovaném stavu, tzv. doba života fluoroforu a kolik molekul bylo v daném čase přítomno v detekčním objemu (informace o koncentraci).



Obr. č. 10: Schéma konfokálního mikroskopu. Excitační laserové světlo (naznačeno zelenou barvou) je vedeno do objektivu, kde je fokusováno do vzorku a odraženo zpět, dále prochází přes dichroické zrcadlo a emisní filtr do detektoru.

### 2.5.1. Experimentální uspořádání

Experimentálním zařízením pro FCS je invertovaný fluorescenční mikroskop (fotodokumentace je zařazena v příloze).

Používá se objektiv většinou s vodní imerzí. Laserový paprsek excitačního spektra je fokusován do zkoumaného vzorku. Fluorescence excitovaných molekul je snímána

objektivem a pomocí dichroického zrcadla a emisního filtru je oddělena od excitačního záření. Do detekční optické části je instalována konfokální štěrbin (pinhole) o průměru 40-100  $\mu\text{m}$ , která efektivně blokuje světlo procházející z oblasti mimo ohniskové roviny.

FCS klade velký důraz na použité fluorescenční sondy. Kromě požadavku na velký kvantový výtěžek zde hraje významnou roli fotostabilita barviva, které musí vydržet vysokou intenzitu laserového světla dopadajícího na vzorek.

### 2.5.2. Autokorelační funkce

Výsledkem statistické analýzy je autokorelační funkce  $G(\tau)$ , která je definována jako:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1, \quad (1)$$

$$I(t) = \frac{1}{T} \int I(t) dt, \quad (2)$$

kde  $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$  je odchylka od průměrné intenzity,  $\langle \rangle$  značí průměrnou hodnotu v čase,  $I$  je intenzita fluorescenčního signálu,  $t$  je celkový čas a  $\delta$  je okamžitá odchylka dané hodnoty.

Autokorelační funkce má své maximum pro nízké hodnoty  $t$ , poté postupně klesá k nule.

Ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě  $\tau$ .

Časový interval  $\tau_D$ , pro který má autokorelační funkce poloviční hodnotu, než má ve svém maximu, pak můžeme považovat za průměrnou dobu, po kterou se jedna molekula zdržuje v detekčním objemu.

Odchylku od průměrného fluorescenčního signálu v čase  $t$  je možné vyjádřit jako:

$$\delta I(t) = \int W(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r}, \quad (3)$$

kde integrujeme přes detekční objem.  $C$  je lokální koncentrace částic,  $\eta$  parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, který určuje počet fotonů detekovaný z jedné částice za jednu sekundu (závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence).  $W(\mathbf{r})$  udává prostorové rozložení emitovaného světla.

Pokud budeme předpokládat, že u částic, které sledujeme, se parametr  $\eta$  nemění v čase a částice se pohybují volnou difuzí ve třech rozměrech, je možné odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}, \quad (4)$$

kde  $V_{eff}$  je efektivní detekční objem,

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0, \quad (5)$$

$\tau_D$  je tzv. difúzní čas, parametr udávající jak dlouho se částice zdržuje v detekčním objemu, souvisí s difúzním koeficientem  $D$  fluoreskující molekuly, který je dán vztahem:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D}, \quad (6)$$

Pokud tedy naměříme fluktuující fluorescenční signál, spočítáme autokorelační funkci podle vztahu (1), proložíme ji teoretickou závislostí (4), můžeme získat důležité informace o sledovaném systému: difúzní čas  $\tau_D$ , který charakterizuje rychlost pohybu molekul ve vzorku, průměrný počet částic ( $N$ ) v detekčním objemu:

$$N = \frac{1}{G(0)} = V_{eff} \langle C \rangle, \quad (7)$$

a pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme určit difúzní koeficient a koncentraci dané látky [14].

### 2.5.3. Tripletní stav

Musíme také uvažovat změnu parametru  $\eta$ , což znamená, že molekula může přejít do tripletního stavu, ve kterém nemůže vyzářit foton, a v grafu se objeví tmavé úseky. Tvar autokorelační funkce se tedy změní, ale pomocí matematických modelů umíme tyto děje oddělit [14].

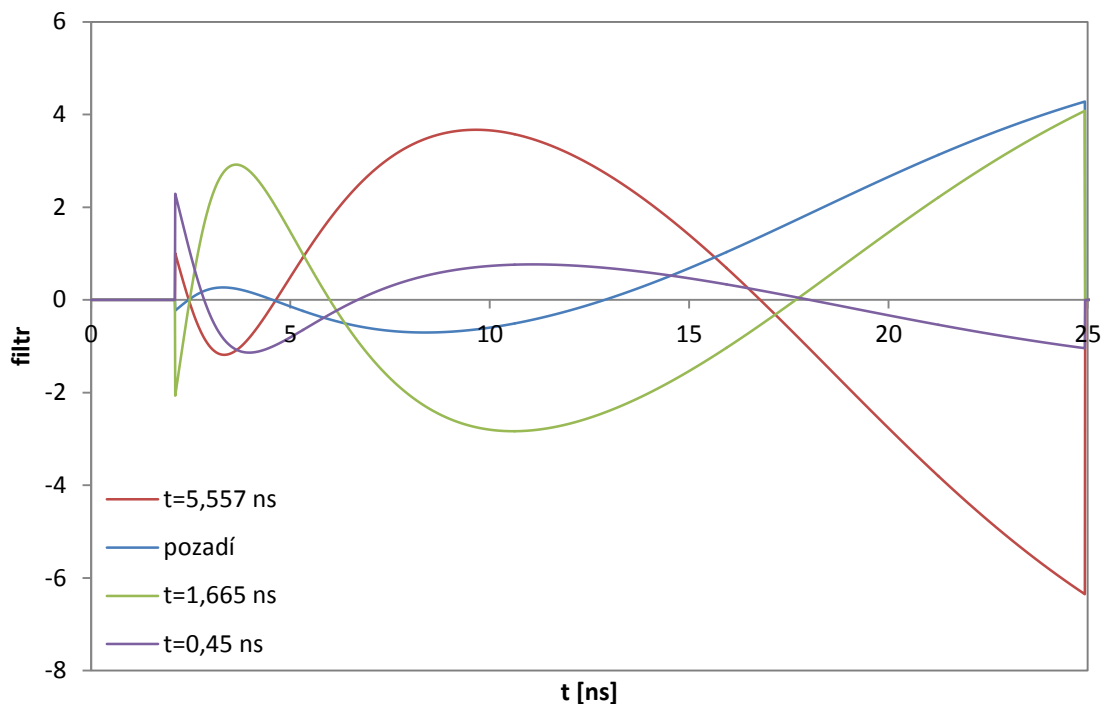
### 2.5.4. Časově rozlišená FCS

Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS-Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) využívá spojení dvou metod: FCS a TCSPC (časově rozlišeného čítání fotonů). Umožňuje rozlišit ve směsi fluorofory s různou dobou života. Lze tak získat autokorelační funkci jednotlivých fluoroforů i jejich kroskorelaci.

Vzorek je excitován krátkými laserovými pulsy v řádech desítek MHz. Pro každý foton přicházející na detektor jsou zaznamenávány dva časy: „makročas“, který zaznamenává polohu registrovaného fotonu na kontinuální časové ose od začátku experimentu, a „mikročas“, který udává, jaká doba uplynula mezi posledním laserovým pulsem a zaregistrováním dalšího fotonu. Makročas je měřen s přesností v řádu sto nanosekund, mikročas s přesností v řádu desítek pikosekund. V makročase se projeví difúze molekul, přechody do tripletního stavu a podobně. Hodnota mikročasu nám poskytuje informace o průběhu dohasínání fluorescence fluoroforu, ze kterého byl daný foton emitován [15].

Použitím statistických filtrů vzniknou ze signálu celého vzorku dva oddělené signály. Jejich intenzity fluktuují v čase a můžeme z nich spočítat autokorelaci jednotlivých komponent, i kroskorelaci mezi nimi.





Obr. č. 11: Ukázka FLCS statistických filtrů pro jednotlivé doby života

Statistické filtry se používají u vzorků se dvěma a více fluorofory, nám ale slouží k odlišení prostředí, ve kterém se nachází jeden fluorofor. Např. u kondenzace DNA má fluorofor jinou dobu života ve z kondenzované DNA a jinou v nez kondenzované. Můžeme tak sledovat oddělené signály a získat bližší informace o mechanismu změny konformace řetězce DNA [16].

### 2.5.5. FLIM

Fluorescence life-time imaging (FLIM) je metoda pro vytvoření obrazu na základě dob života ve vzorku. Jednotlivé intenzity obrazu odpovídají daným dobám života fluoroforu, nikoli jejich emisním spektrům. Doba života je definována jako průměrný čas, který stráví molekula v excitovaném stavu před emisí fotonu.

Doba života není závislá na koncentraci, absorpci vzorku, tloušťce vzorku, fotovybělování, nebo intenzitě excitačního záření. Je mnohem robustnější než jiné metody založené na intenzitě. Závisí ale na pH, množství kyslíku a způsobu vazeb mezi molekulami [17].

### 3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ LITERATURY

Tato bakalářská práce se zabývá studiem hydrogelů a hydrofilních koloidů, jejich charakterizací a vzájemnými interakcemi. Modelovým systémem pro tuto práci se stal hyaluronan a CTAB v prostředí 0,15 M chloridu sodného (NaCl). Pro studium byla použita metoda fluorescenční korelační spektroskopie. Jako fluorescenční sondy byly použity perylen, fluorescein, rhodamin a ATTO 655.

#### 3.1. Práce zabývající se hydrogely na bázi hyaluronanu pro cílenou distribuci léčiv

V současné době by bylo výhodné vytvořit hydrogel, který je tekutý a až po vpichu na místo určení teprve gelovatí. Dle **Censi Roberta a spol.** se jako velmi vhodný jeví hyaluronan chemicky upravený, s dobrými mechanickými vlastnostmi. Jako síťovací prostředek zde byla použita fotopolymerizace. Pozitivní výsledek poskytla kombinace PEG diakrylát/thiolovaný hyaluronan, Hya-dihydrazid kyseliny adipové/metakrylát Hya. Bylo zjištěno, že se kladně nabitě proteiny z gelu uvolňují pomaleji, než záporně nabitě. Důvodem pro toto zjištění je fakt, že hyaluronan je záporně nabitý. Uvolňování proteinu se odvíjí také od enzymatické degradace Hya v prostředí enzymu hyaluronidázy, která je přítomná v biologických tkáních.

Glycidyl-metakrylátem modifikovaný hyaluronan byl použit v experimentu, který provedli **Patterson Jennifer a spol.** Dvě připravené modifikace s rozdílnou molekulovou hmotností (110 a 220 kDa). V této práci naznačují, že pravděpodobnost degradace se neodvíjí od množství vody v hydrogelu, jak se doposud předpokládalo, ale že mezi modifikacemi bude chemický rozdíl. Bylo prokázáno, že hodnota pH má obrovský vliv na reaktivitu hydrogelu. Zatímco při nízkém pH se tvoří mezi karboxylovými skupinami hyaluronanu esterové vazby, při vysokém pH se vytvářejí etherové vazby mezi hydroxylovými skupinami hyaluronanu.

Regeneraci chrupavek se v roce 2011 zabývali **Kim Iris a spol.**; na primární hydroxylovou skupinu Hya navázali různé deriváty a zkoumali přilnavost, degradaci a další vlastnosti vzniklého hydrogelu. Jako začleňovací skupiny byly použity metakrylát a akrylát. Právě funkční skupiny na páteři hyaluronanu umožňují fotozesíťování. Další běžně konjugované funkční skupiny zahrnují metakrylovanou kyselinu mléčnou, hydroxymetakrylát a metakrylovaný kaprolakton. Tyto materiály prokázaly svou kladnou odezvu na regeneraci chrupavek a v budoucnu by tak mohly být hojně využívány. Pomocí elektrostatického zvlákňování byla zkoumána homogenita vrstvy.

Zajímavým se jeví hydrogel vytvořený skupinou **Martínez-Sans Elenou a spol.** Jde o aldehydem modifikovaný hyaluronan, kde je aldehyd začleněn do amido-glycerolové skupiny na postranním řetězci, amido-glycerolová skupina vzniká amidací a selektivní oxidací postranního řetězce. Za velmi krátkou dobu (30 s) tak vznikne hydrazidem modifikovaný hyaluronan-hydrazon-síťovaný hydrogel stabilní při fyziologickém pH. S řízeným uvolňováním aktivního kostního morfogenního proteinu nebyla prokázána cytotoxicita.

Styryl-pyridinium-hyaluronan se stal úspěšným nosičem Paclitaxelu (PTX), jak uvádí experiment **Tao Youhuha a spol.** PTX byl úspěšně zapouzdřen do hydrofobní části micel. Micely byly kulovité, 113 nm velké a měly vysokou účinnost zapouzdření. Pomocí FCS bylo dokázáno, že micely jsou vychytávány makrofágy kostní dřeni a gliomy (mozkovými tumory) U38, což bylo účelem a tento derivát bude nadále používán v medicínských aplikacích.

V roce 2010 se tým **Oh Eun Ju a spol.** zabýval využitím hyaluronanu pro cílenou distribuci léčiv, vytvářeli různé deriváty, např. HA-ADH (dihydrazid kyseliny adipové), HA-NHS (*N*-hydroxy sukcinimid). HA-Dopa (dopamin), HA-TBA (*N*-tetrabutylamonium hyaluronát). Byly síťovány hydrogely čistého hyaluronanu, hyluronových derivátů s čistým hyaluronanem a nakonec i deriváty mezi sebou. K HA-ADH a několika dalším bylo přidáno síťovadlo sulfosukcinimidyl suberát (BS3). Hyaluronové deriváty s dvojnými vazbami, jako jsou HA-AEMA (aminoetyl metakrylát) jsou síťovány pomocí Michaelovy adice s DTT (dithiothreitol). Hydrogely s dvojnými vazbami mohou reagovat s thiolovými deriváty, a díky možnosti tvorby hydrogelu Michaelovou adicí jsou vhodné pro in-situ vytváření hydrogelu přímo v těle.

V roce 2012 zkoumal tým **Li Jing a spol.** dopravu cytostatik do tumoru pomocí hyaluronanu. Jako cytostatikum byl použit Paclitaxel (PTX) a jako fluorescenční sonda Nilská červeň. Micely tvořené HA-ss-DOCA (derivát Hya a deoxycholové kyseliny). Vytvořené redox-citlivé micely byly vtáhnuty přes receptory Hya na karcinomu prsu. Bylo prokázáno, že dopravují hydrofobní cytostatika velmi rychle a receptory v tumoru podporují množení těchto micel.

Jednou z hlavních překážek cílené distribuce léčiv je neúmyslné uvolnění v krevním oběhu. Touto problematikou se zabývali **Yoon Hong a spol.**, kdy se snažili vyvinout nanočástice kyseliny hyaluronové připravené fotozesíťováním akrylátových skupin. Takto připravené nanočástice vykazovaly ve fyziologickém pufru větší rychlost uvolňování PTX. Bylo prokázáno, že v přítomnosti enzymu hyaluronidázy se léčiva uvolňují rychleji ze zesíťovaného hydrogelu pomocí UV záření, než bez síťování. Jako fluorescenční barvivo bylo použito Flamma<sup>TM</sup> (FPR675) a laser o vlnové délce 633 nm.

### 3.2. Práce zabývající se zkoumáním hydrogelů pomocí FCS

**Fatemeh Tabatabaei a spol.** v roce 2011 zkoumali difúzní chování fluoroforu v polymerní síti hydrogelu. Bylo prokázáno, že fluorofor s polymerními vlákny netvoří pevnou vazbu, naopak teplotní rázy (vlny) způsobují, že molekula fluoroforu může volně difundovat mezi sítí, a to napomohlo k hlubšímu pochopení principu fungování cílené distribuce léčiv.

**Raccis Riccardo. a spol.** zkoumali pomocí FCS vliv hustoty zesíťování na permeabilitu a mobilitu fluoroforů v hydrogelových filmech. V tomto experimentu byl použit karboxylovaný poly(*N*-isopropylakrylamid) (PNIPAAm) kovalentně ukotvený na skleněné substráty. Při zvýšení teploty na 32 °C se hydrogelové filmy scvrkly. Jako fluorescenční barviva byla použita Alexa 647 a zelený fluorescenční protein. Tyto sondy prokázaly jen slabou interakci s karboxylovanými poly(*N*-isopropylakrylamid)y. Větší bobtnání při nízkých teplotách ukázalo, že hydrogelové vrstvy jsou homogenní a obě sondy prokázaly Fickianovu difúzi. Závěrem této práce bylo zjištění, že zvyšování teploty negativně ovlivňuje stupeň nabobtnání gelu.

V experimentu **Jung Seog Lee a spol.** byly vyvinuty hydrozomy – uzavřené dvojvrstvé nanoprostory v síti gelu. Systém byl charakterizován i pomocí metody FCS. Jako excitační vlnová délka byla zvolena 488 nm a byly proměřeny vzorky fluorescein-isothiokyanátu (FITC), přičemž dichroické zrcadlo bylo nastaveno na 95% propustnost. Fotodetektořem a fotonásobičem v tomto experimentu byla lavinová fotodioda a detektorem CCD kamera. Byly vytvořeny systémy z polymerosomů s řízeným uvolňováním. Jako biodegradabilní membrána byla použita poly(ethylenglykol)PEG-PDLLA obsahující PNIPAAm, významně snižující rychlost uvolňování látek, které můžeme zakomponovat do hydrozomů.

**Guldbrand Stina a spol.** zkoumali pohyb fluoroforu lidskou kůží. Jako fluorofory byly použity Rhodamin B (RB) a Rhodamin B isothiokyanát (RBITC), které byly vybrány kvůli rozdílné reaktivitě a podobnosti spekter. Použitím metody FCS bylo prokázáno, že RBITC je navázán na biomolekuly v kůži; hodnoty difúzních koeficientů ukázaly, že RB putuje lidskou kůží osmkrát rychleji, než RBITC.

**Koutsopoulos Sotirios a spol.** dosáhli v oblasti cíleného uvolňování léčiv úspěchu v podobě vyvinutí nového typu hydrogelu z  $\text{ac-(RADA)}_4\text{-CONH}_2$  jako jádra a z látky  $\text{ac-(KLDL)}_3\text{-CONH}_2$  jako pláště, kde R je arginin, A alanin, D je kyselina asparagová. Tento typ hydrogelu dokáže postupně uvolňovat látku po dobu třech měsíců a dobu lze i prodloužit. Cílené uvolňování je závislé na sekvenci aminokyselin a hustotě peptidových nanovláken v hydrogelu.

Potřebou separovat doxorubicin (Dox) a jeho derivát volně se tvořící ve vodném prostředí 7,8 – dehydro - 9, 10 - desacetyldoxorubicinon (D\*) se zabývali **Hovorka Ondřej a spol.** Bylo potřeba odlišit signál od těchto dvou sloučenin s pomocí FCS. FLIM analýzou byly zkoumány doby života Dox a D\*.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Prvním cílem měření bylo získat informace o dobách života jednotlivých fluoroforů v modelovém vzorku hydrogelu. Byly použity fluorescenční sondy vhodně vybrané tak, aby byl co největší kvantový výtěžek vzhledem k dostupným vlnovým délkám budícího záření.

Druhým cílem bylo zjistit difúzní časy jednotlivých sond v daných prostředích a jejich příslušející difúzní koeficienty. Byly proměřeny vyhasínací křivky jednotlivých sond v různých místech hydrogelu a bylo analyzováno prostředí, kde se sonda navázala.

### 4.1. Přístroje a vybavení

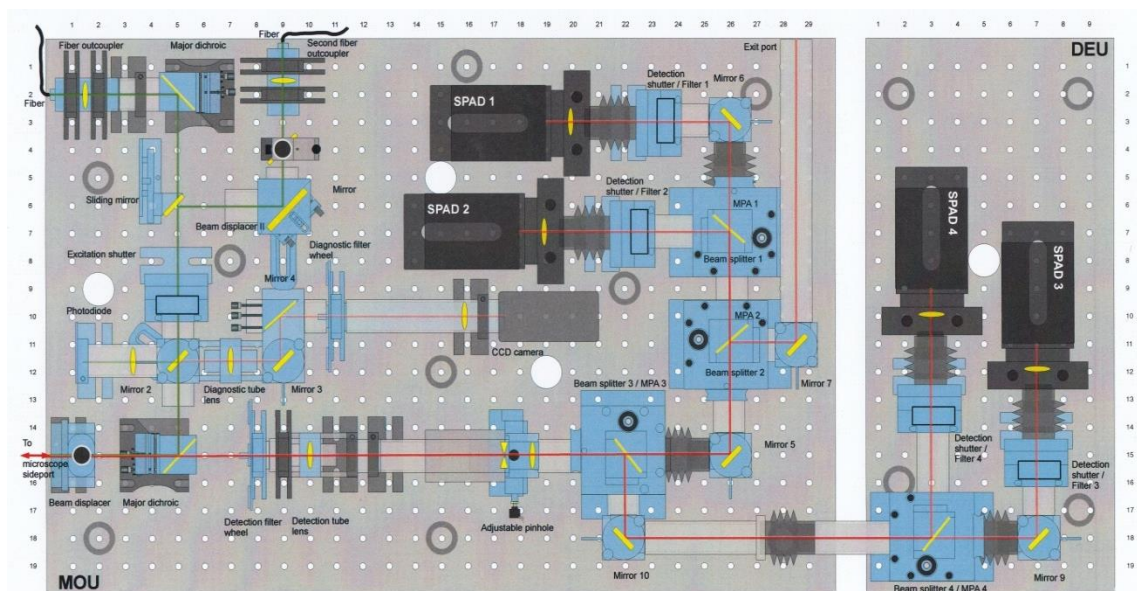
#### Systém MicroTime 200

Systém přístrojů pro měření metodou fluorescenční korelační spektroskopie sestává z inverzního mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačních zdrojů a elektroniky firmy PicoQuant (PicoQuant GmbH) a skeneru se sub-nanometrovým rozlišením firmy Physik Instrumente (Physik instrumente GmbH).

Systém obsahuje excitační zdroje, pulsní laserové diody o frekvencích 90, 64, 50 MHz a vlnových délkách 375, 470, 510 a 640 nm.

Měřicí soustava obsahuje čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z nich jsou zastoupeny detektory typu  $\tau$ -SPAD se šumem nepřekračujícím  $100 \text{ cnts}\cdot\text{s}^{-1}$  a dva zbylé představují detektory MPD-SPAD se šumem pod  $250 \text{ cnts}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dále je přístroj vybaven externím spektrografem s CCD kamerou Newton (Andor), který umožní snímání stacionárních fluorescenčních spekter současně s probíhajícím konfokálním experimentem.

Pro experimenty byla použita následující konfigurace: excitační zdroj 375, 410, 510, 640 nm a frekvence 40 MHz, planapochromatický objektiv UPLSAPO 60 XW s vodní imerzí, dichroické zrcadlo odrážející excitační vlnovou délku a propouštějící emisní vlnové délky, emisní filtry (HQ690/70, 520/35, 405), detektory  $\tau$ -SPAD1-2 (obrázek č. 11).



Obr. č. 11: Schéma měřicího přístroje s naznačením možných průchodů laserových paprsků.

## 4.2. Použité programy

SymPhoTime 64 – software pro sběr a vyhodnocování dat časově rozlišené fluorescence  
Microsoft Excel – software pro vyhodnocení dat  
CellSens Entry- software pro grafické vyhodnocení FLIM analýzy

## 4.3. Použité chemikálie

Tabulka č. 2: Seznam použitých chemikálií

| Název                         | Výrobce                    | CAS/číslo šarže                 |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| NaCl<br>chlorid sodný         | Lach-Ner s.r.o.            | CAS 4647-14-5<br>š.: 06278      |
| hyaluronan sodný 750-1000 kDa | Contipro Biotech<br>s.r.o. | š.: 213-4160                    |
| ATTO 655                      | Sigma-Aldrich              | CAS 80661<br>š. 144022932109P43 |
| perylene                      | Fluka                      | CAS 198-55-0<br>1293053         |
| fluorescein                   | Sigma-Aldrich              | CAS 2321-07-5                   |
| Rhodamin 6G                   | Sigma-Aldrich              | CAS 989-38-8<br>MKBF7515V       |
| CTAB                          | Sigma-Aldrich              | 1293053<br>š.: 059K0041         |
| Milli Q voda                  | Milipore academic          |                                 |

## 4.4. Pracovní postupy

### 4.4.1. Příprava zásobního roztoku HyA

Byla zvolena molekulová hmotnost hyaluronanu 750-1000 kDa a byl připraven roztok o koncentraci  $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Potřebné množství bylo naváženo na analytických vahách a doplněno požadovaným objemem 0,15 M NaCl nebo vody. Pro důkladné rozpuštění byl roztok ponechán 24 hodin na třepačce nebo magnetické míchačce. Zásobní roztok byl dále udržován v chladu.

### 4.4.2. Příprava zásobního roztoku CTAB

Potřebné množství tenzidu bylo naváženo na analytických vahách a doplněno 0,15 M NaCl nebo vodou na objem  $100 \text{ cm}^3$ . Výsledná koncentrace tenzidu byla 200 mM. Roztok byl dále uchovávan při laboratorní teplotě.

### 4.4.3. Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy

Zásobní roztoky použité fluorescenční sondy o koncentracích  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M byly připraveny v rozpouštědle a uchovávány v chladu.

### 4.4.4. Příprava zásobního roztoku rozpouštědla

Jako modelové rozpouštědlo byl použit roztok chloridu sodného o koncentraci 0,15 M. Roztok byl dále uchovávan při laboratorní teplotě.

#### 4.4.5. Příprava roztoků pro fluorescenční měření

Byly připraveny roztoky tak, aby tvořily gel metodou fázové separace. Nejprve bylo do zkumavek pipetováno takové množství fluorescenční sondy, aby ve výsledném roztoku byla koncentrace  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M. Po odpaření rozpouštědla byl pipetován roztok tenzidu, výsledný roztok byl ponechán 24 hodin na třepačce a následně byl přidán roztok hyaluronanu a výsledný roztok byl odstaven na 24 hodin při laboratorní teplotě. Celkový objem roztoku činil 6 ml a z toho bylo vizuálně odhadnuto asi 0,25 ml gelu určeného pro měření metodou FCS.

Byly připraveny také roztoky sondy ATTO 655 v různých prostředích – voda, fyziologický roztok, hyaluronan ve vodě, hyaluronan ve fyziologickém roztoku, CTAB ve vodě, CTAB ve fyziologickém roztoku; a to vždy v koncentracích  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M.

#### 4.5. Nastavení přístroje

Tabulka č. 3: Nastavení přístroje pro jednotlivá měření

| Sonda                  | ATTO 655 | fluorescein | rhodamin | perylene |
|------------------------|----------|-------------|----------|----------|
| Excitace [nm]          | 640      | 470         | 470      | 375      |
| Dichroické zrcadlo     | 640      | 470         | 470      | 375      |
| Emisní filtr           | 690/70   | 520/35      | 520/35   | 405      |
| Konfokální štěrba [μm] | 50       | 50          | 50       | 50       |

#### 4.6. Výsledky a diskuze

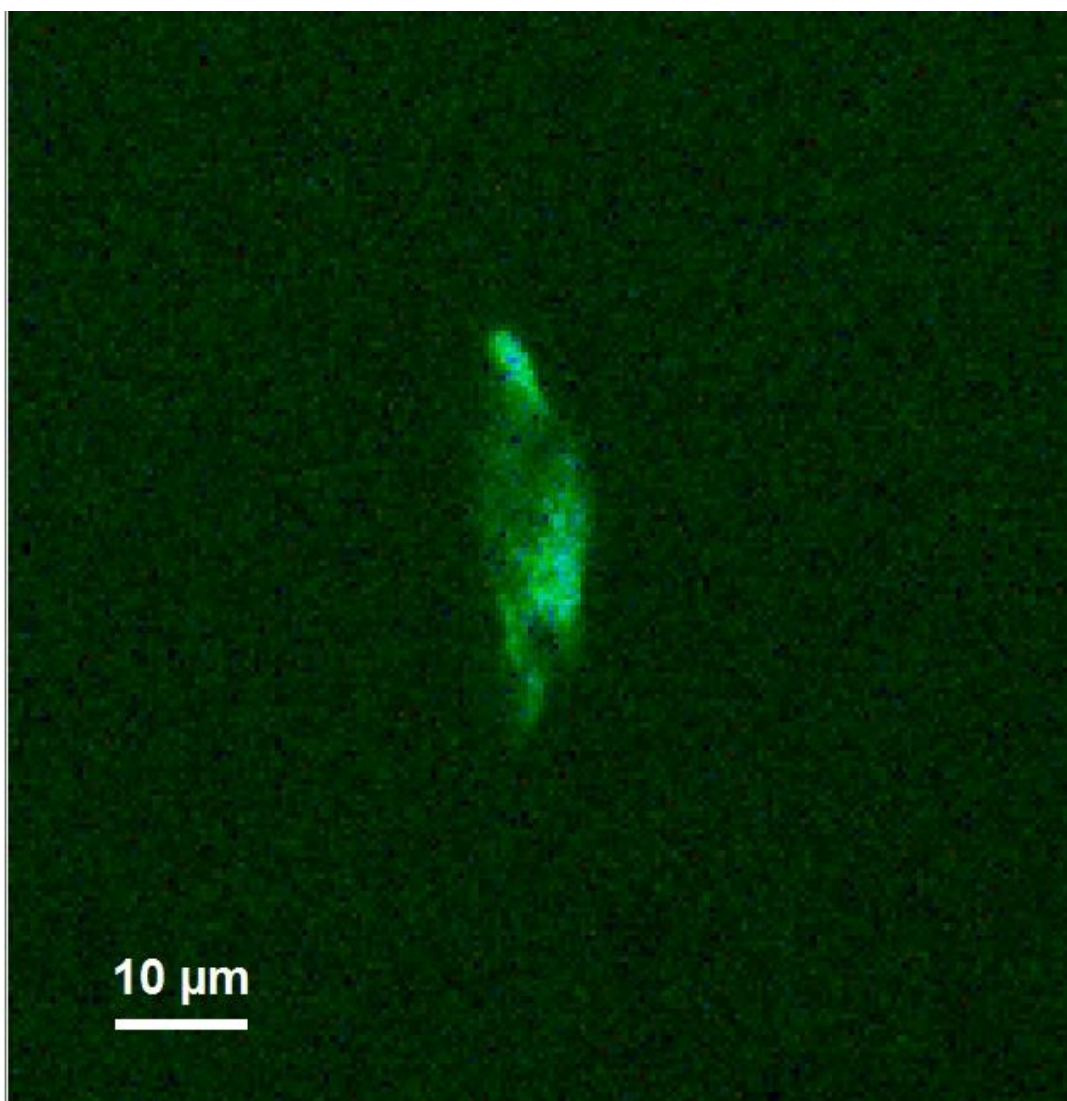
Nejprve byly připraveny gely metodou fázové separace a pro tento experiment byly vybrány fluorescenční sondy fluorescein, rhodamin, perylen, a to ve třech zvolených koncentracích –  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M a  $10^{-7}$  M.

Později se ukázalo, že je třeba zjistit chování sondy v jednotlivých prostředích, a proto byla zvolena pro měření pouze sonda ATTO 655 kvůli potlačení vzniku tripletního stavu. Dále musela být individuálně analyzována také všechna prostředí vyskytující se v gelovém systému – voda, 0,15 M NaCl, hyaluronan, tenzid. Roztoky byly namíchány třikrát a každý z nich byl třikrát analyzován. Nejprve byl připraven zásobní roztok o přesné koncentraci fluorescenční sondy, což bylo ověřeno na spektrofotometru HITACHI pomocí molárního extinkčního koeficientu. Poté byla na přístroji pro měření FCS provedena kalibrace a zjištěné hodnoty efektivního objemu a excentricity byly použity pro další měření. Výsledky kalibrace jsou vyznačeny v tabulce č. 8, kde  $V_{eff}$  je efektivní (konfokální) objem,  $\kappa$  je excentricita, tedy odchýlení od tvaru koule,  $\omega_0$  a  $z_0$  jsou poloměry os konfokálního objemu. Hodnoty jsou velmi důležité pro další výpočty, např. koncentrace. Tabulka č. 8 je zobrazena níže v dokumentu, kde je také detailněji komentována.

Nanášení vzorku gelu bylo poměrně obtížné v tom, že ze začátku gel na podložním sklíčku po delším měření vysychal. Tomu bylo zabráněno nanesením gelu na podložní sklíčko a přiklopením druhého podložního sklíčka. Jako třetí varianta byla použita eppendorfova zkumavka bez víčka, do níž byl až po okraj nalit supernatant a po celé ploše hladiny byl nanesen gel, na gel bylo položeno podložní sklíčko a takto připravený vzorek byl podrobován měření. Obě metody poskytovaly stejné výsledky, u eppendorovy zkumavky je třeba dávat pozor na zaostření do gelu, nikoli na sklo, nebo stěny eppendorfovy zkumavky a u dvou sklíček, které byly díky malému množství gelu velmi blízko u sebe, taktéž na zaostření do gelu a ne na fázové rozhraní. Metoda dvou sklíček se jeví jako přijatelnější.

Během experimentu bylo zjištěno, že nanášené množství vzorku může ovlivnit celkové měření, a to jak ve tvaru křivky, tak i ve výsledných hodnotách. Nezměnily se měřené difúzní časy, ale jejich poměrové zastoupení. Čím méně vzorku bylo nanášeno, tím menší relativní odchylku software vykazoval. Toto pravidlo platí pouze pro gely, u vodných roztoků nebyla zaznamenána žádná změna v měření v závislosti na množství nanášeného vzorku.

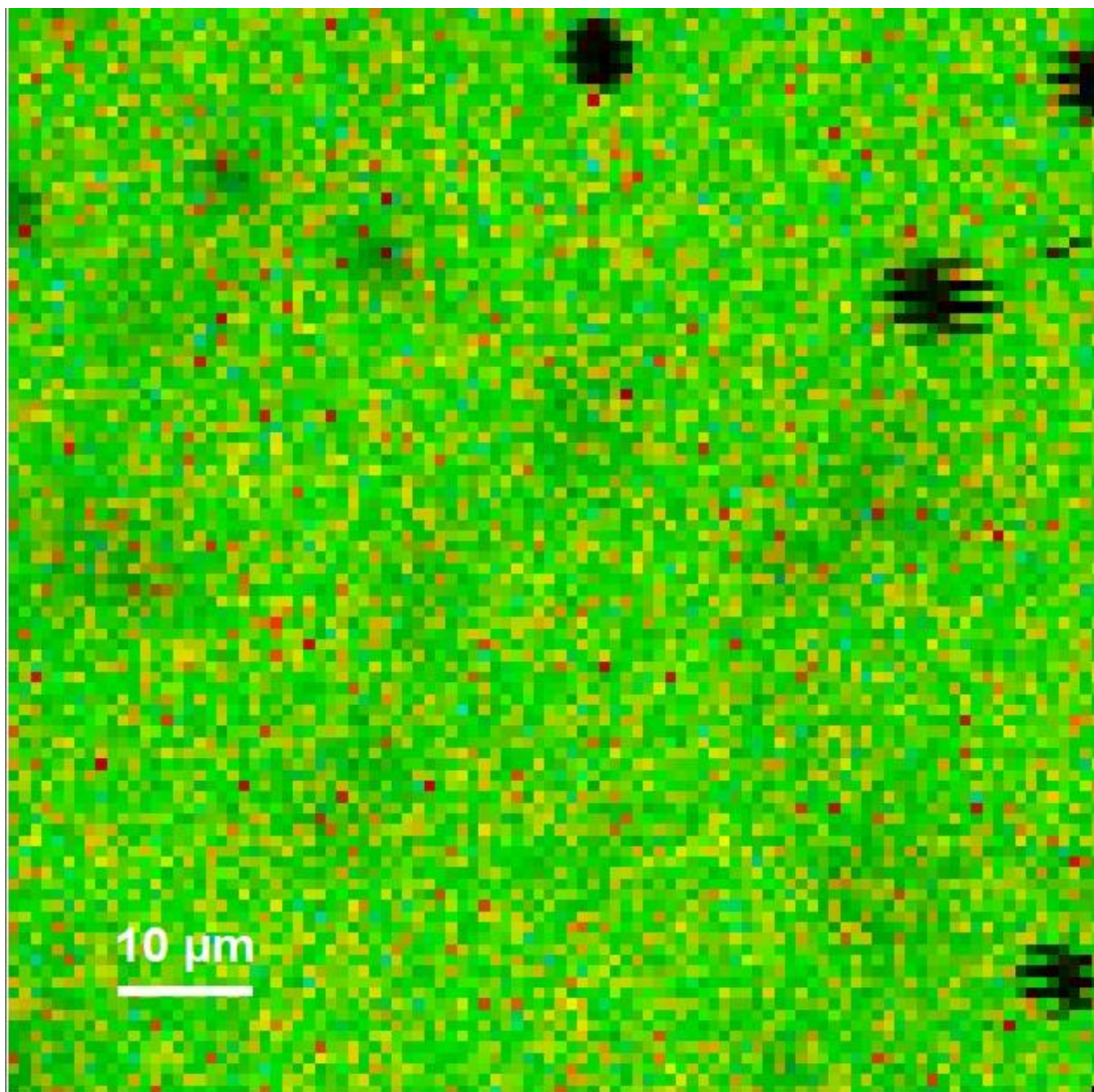
Po nanášení vzorku byla pomocí mikroskopu nalezena požadovaná oblast a objektiv byl zaostřen na toto místo i pomocí počítače. Poté byla zhotovena FLIM analýza, pro orientační přehled se nejprve měřil „Fast FLIM“ a byly skenovány jednotlivé oblasti ve všech osách, následovně volbou „Accurate FLIM“ byla zvolená oblast skenována podrobněji. Možné je také nastavení parametrů jako např. „Dwell time“ – čas, po který se skener zdrží na jednom pixelu, počet pixelů v jednom obrázku, který má maximální rozsah 80x80  $\mu\text{m}$ , nebo volba „mono/bidirectional scan“ (sken v jednom směru/obousměrný sken), jejich rozdíl je ve směru skenování. První zmíněný skenuje vzorek zleva doprava, pak se vrátí zpět na začátek a znovu skenuje zleva doprava. Na rozdíl od „bidirectional scan“, který je sice rychlejší, ale méně přesný, protože při skenování snímá obraz v obou směrech, jak zleva doprava, tak i v opačném směru. Díky této analýze byly zjištěny i drobné nedostatky, vyobrazené na obrázku č. 12.





Obr. č. 12: FLIM analýza krystalku perylenu

FLIM analýza krystalku perylenu ukázala sice plnohodnotné výsledky, ale pro tento experiment bezcenné, neboť krystalky byly přítomny na skle, nikoli v gelu. Sonda v gelu se i po důkladném prozkoumání touto analýzou jevila rovnoměrně rozprostřená. Rozlišení, které tato analýza poskytla, byly jednotky nanometrů. Na obrázku č. 13 byly vidět bubliny ve vzorku, analýza je zaznamenala jako černé skvrny. Také je vidět obousměrný sken i s jeho nedostatky v podobě rozostřeného obrazu.



Obr. č. 13: FLIM analýza fluoresceinu v gelu

V získaném obrázku, který nám ukazuje rozložení relativních četností dob života pomocí barevné škály, nikoli skutečnou barvu emisního záření, je možnost přímo vybrat body, ve kterých poté proměříme FCS křivky. V případě nehomogenních vzorků je to jeden ze způsobů, jak zjistit doby života např. uvnitř a vně krystalku, buňky, nebo agregátu. V našem vzorku hydrogelu byla pomocí FLIM analýzy ověřena homogenita vzorku, tudíž lze měřit FCS křivky kdekoli ve vzorku.

Gelové systémy vyžadují dlouhodobější měření. Je třeba zohlednit fotovybělování vzorku, což bylo kontrolováno změnou intenzity během měření a u sondy ATTO 655 bylo zjištěno, že i po delší době (30 min) vzorek stále vykazuje stejnou intenzitu fluorescence, z čehož můžeme vydedukovat, že doba měření pro nás není omezujícím faktorem, neboť data získané z 15 minutového měření jsou dostačující, a to i v případě gelu. Vodné roztoky vyžadovaly alespoň 3 minuty měření.

Byly také zkoumány rozdíly v době měření u jednoho vzorku a bylo zjištěno, že vzorek měřený kratší čas (3 minuty) a delší čas (10 minut) vykazují stejné vlastnosti, lišící se pouze v procentuálním zastoupení. Obecně se přikláníme k názoru, že je na operátorovi, aby zvolil dobu měření vzorku. Hraje zde roli také koncentrace. Efektivním objemem procházely během měření řádově desítky molekul v případě koncentrace  $10^{-8}$  M. O řád nižší koncentrace vykazovala v efektivním objemu jednotky molekul, což je pro přístroj neoptimálnější hodnota, ale je třeba vzít v úvahu, že musíme měření prodloužit v rámci zmírnění relativní odchylky od výsledných hodnot.

Co se intenzity týče, pro publikování je optimálních minimálně  $10^4$  Counts (Cnts). Jedním z důvodů, proč této intenzity nemusí být dosaženo, a přesto je možné publikování výsledků, je rychlá degradace vzorku. Dalším možným důvodem je špatné nastavení celého přístroje, neboť před měřením je třeba přístroj naladit, jinými slovy vystředit a zaostřit všechny optické prvky podle vlnové délky excitačního paprsku. V našem případě dosahovaly fluorescenční sondy intenzit v průměru  $10^4$ - $10^8$  Cnts.

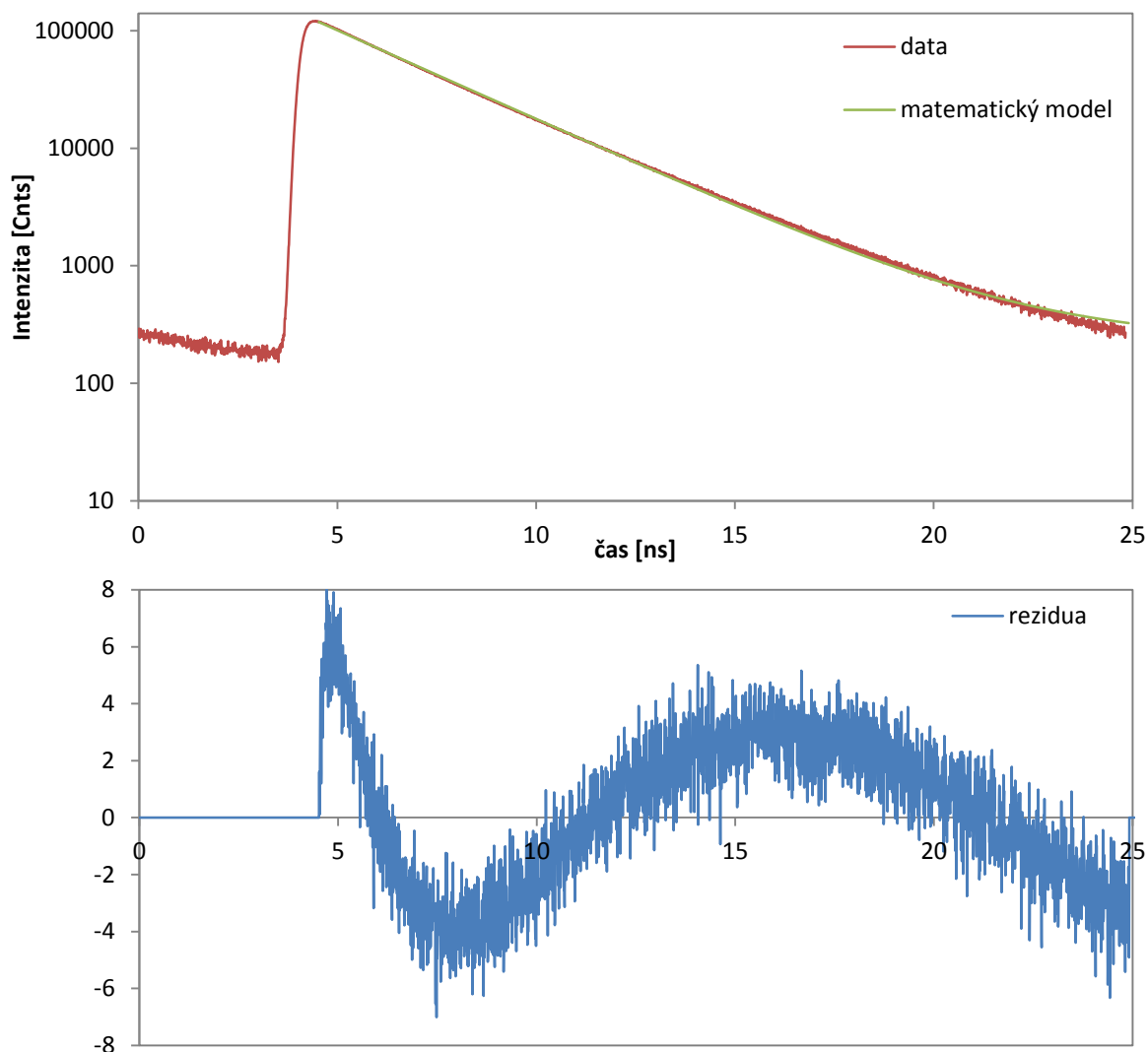
Analýza gelových systémů však ukázala složité výsledky, které nebylo možné interpretovat jednoduchými fyzikálně chemickými zákony bez předchozí znalosti chování sondy v jednotlivých prostředích. Proto byly nejprve změřeny FCS křivky v různých prostředích se sondou ATTO 655. Ty pak byly jednotlivě analyzovány, byly jim přiřazeny doby života pomocí měření TCSPC analýzou a difúzní, popř. tripletní časy pomocí FCS analýzy. Na základě těchto dat pak mohla být interpretována data z vzorků gelů pro sondu ATTO 655.

#### **4.6.1. TCSPC analýza**

Touto analýzou získáme důležité informace o době života fluoroforu. Získaná data se typicky skládají z křivky naměřených dat, proložené funkce poklesu a funkce přístrojové odezvy (IRF), která byla z analýzy vyjmuta. Pokles intenzity fluorescence je na obrázcích 14, 15, 16 vyznačen červeně. Maximum křivky na ose y reprezentuje počet fotonů, které byly zaznamenány detektorem mezi jednotlivými pulzy laseru. V logaritmickém měřítku má monoexponenciální pokles tvar přímky.

Zeleně vyznačená je konvoluce naměřeného poklesu intenzity s odezvou přístroje. Tato proložená funkce poklesu intenzity je také někdy označována jako modelová funkce. U monoexponenciálního modelu získáme přímo dobu života, v případě multiexponenciálních modelů dostáváme navíc hodnotu A, která nám určuje zastoupení jednotlivých dob života ve vzorku. Logaritmické měřítko je zvoleno pro přesnější odečet v oblasti nízkých intenzit, které jsou tak lépe patrné. Vzhledem k celkovému množství zachycených fotonů je oblast nízkých intenzit zanedbatelná.

Níže na obrázcích je modře vyznačená reziduální analýza. Každý bod reziduální analýzy je kalkulován vzhledem ke standardní odchylce každého bodu. V případě vhodného modelu jsou hodnoty symetricky rozmístěny vždy kolem nuly, a to náhodně. Jejich průměrná hodnota je tedy přibližně nulová a ideální vzhled křivky je takový, aby co nejvíc kopírovala osu  $x$  v grafu reziduální analýzy.



Obr. č. 14: Ukázka TCSPC analýzy – monoexponenciální křivka

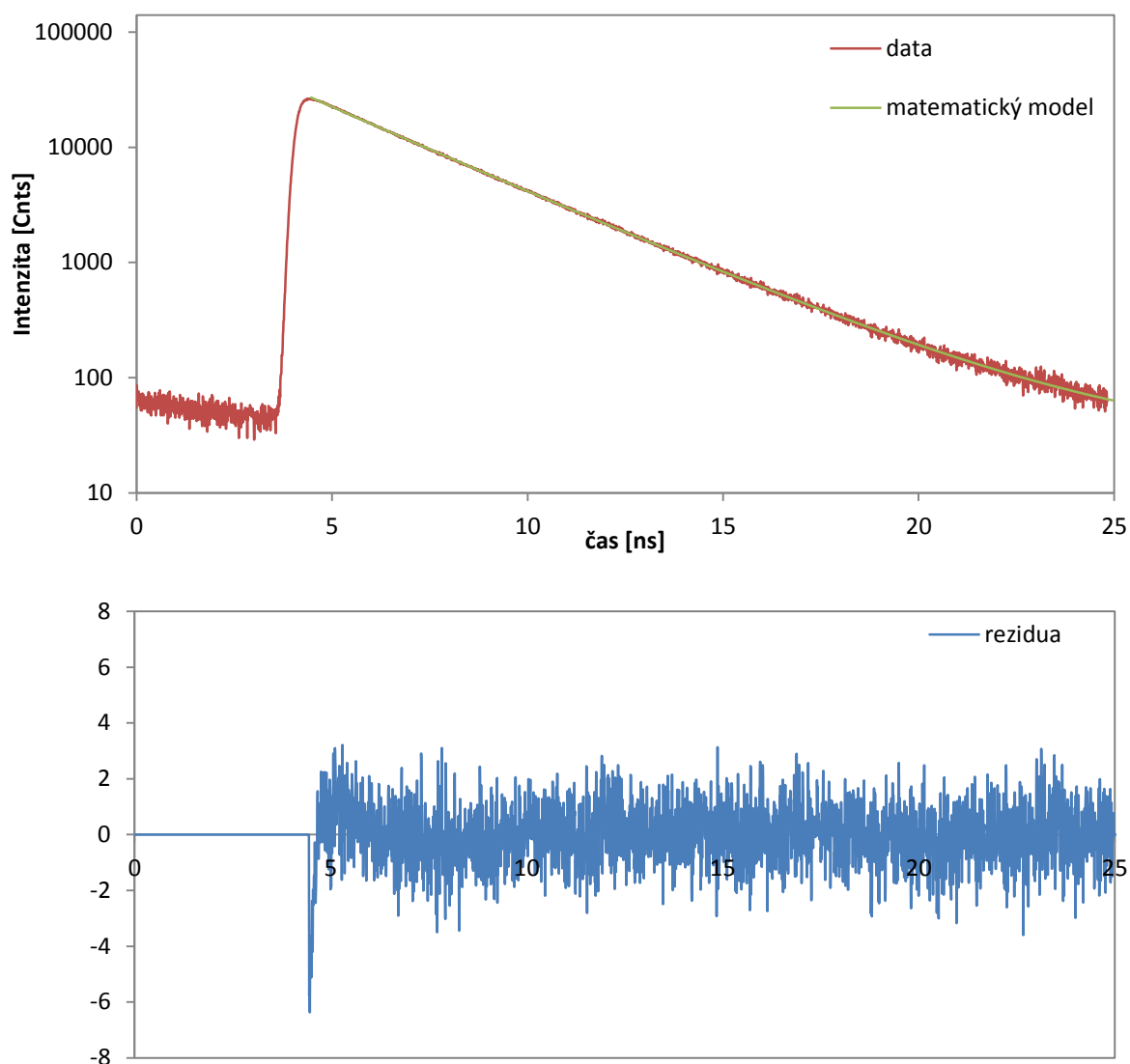
Je třeba pozorovat dva parametry – chí kvadrát, který nám udává rozdělení pravděpodobnosti a měl by se pohybovat okolo hodnoty 1 a reziduální analýzu, kterou vidíme na obrázcích 14, 15, 16 vždy modře vyznačenou. V případě že vzorek bude mít dvě doby života podobající se svou hodnotou, reziduální analýza prokáže systematickou odchylku a rozložení bodů reziduální analýzy nebude náhodné, nebude kopírovat tvar osy  $x$  a bude třeba zvolit multiexponenciální model.

Tab. č. 4: Rozdělení pravděpodobnosti u monoexponenciálního modelu

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| $\tau$ [ns] | $2,863 \pm 0,002$ |
| A [kCnts]   | $118,7 \pm 0,1$   |
| $\chi^2$    | 7,1               |

Na obrázku č. 14 je patrné, že reziduální analýza, jejíž rozdělení není náhodné, je nevyhovující a chí kvadrát nabyl hodnoty 7,1, což je od ideální hodnoty velmi vzdálené. Monoexponenciální model tedy není vhodný pro tato data, a bude nutné navýšit počet exponenciálních funkcí.

U biexponenciálního modelu na obrázku č. 15 je již patrné vyrovnání reziduí okolo jejich osy a  $\chi^2$  kvadrát změnil hodnotu na 1,3, což znamená vylepšení oproti předchozímu modelu. Pro větší přesnost byl použit i triexponenciální model, viz obrázek č. 16.

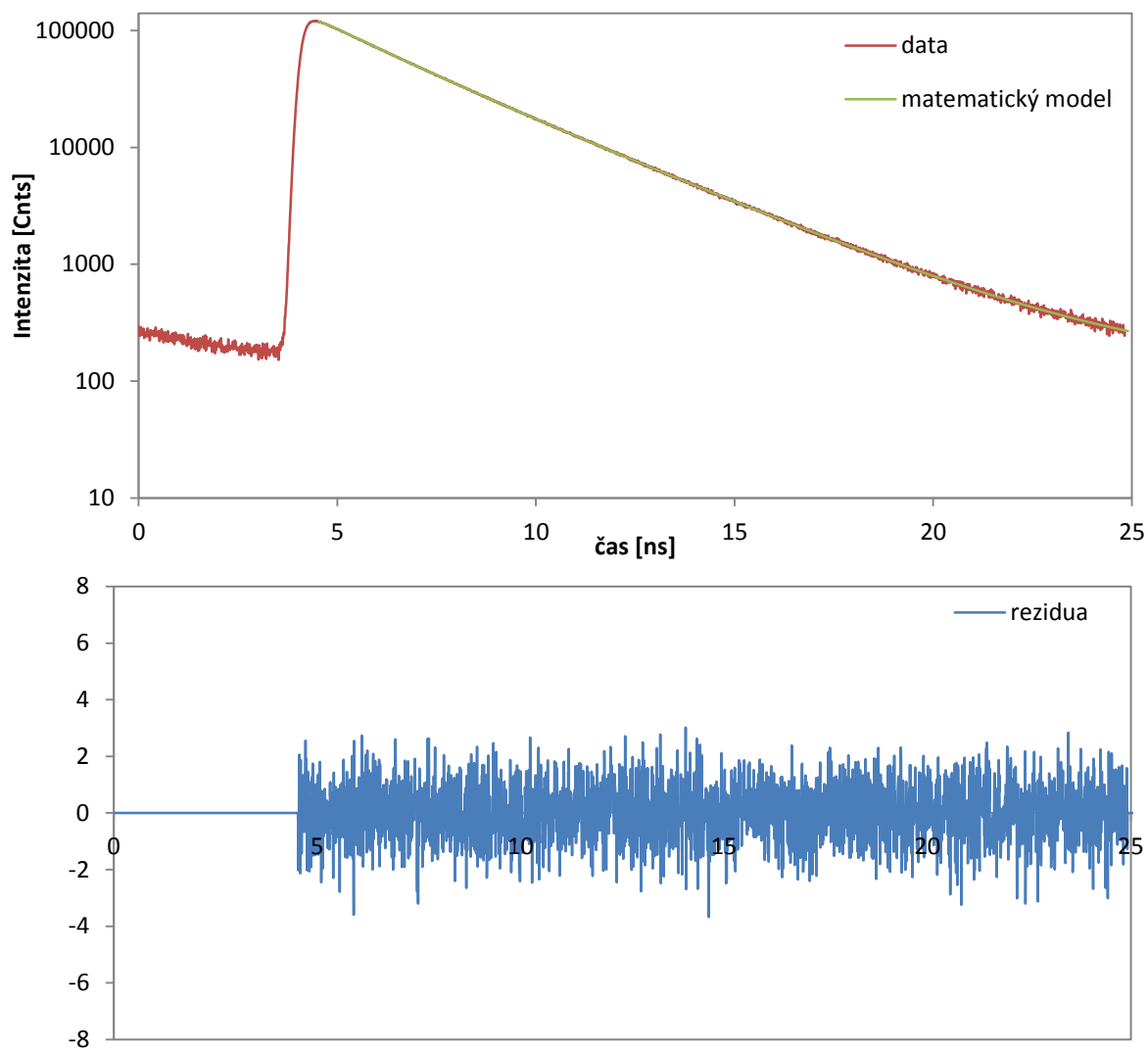


Obr. č. 15: Ukázka TCSPC analýzy – biexponenciální křivka

Tab. č. 5: Rozdělení pravděpodobnosti u biexponenciálního modelu

|               |                |
|---------------|----------------|
| $\tau_1$ [ns] | $3,3 \pm 0,1$  |
| $\tau_2$ [ns] | $2,1 \pm 0,1$  |
| $A_1$ [kCnts] | $71,5 \pm 5,3$ |
| $A_2$ [kCnts] | $50,2 \pm 5,4$ |
| $\chi^2$      | 1,3            |

Na obrázku č. 16 je vyobrazen triexponenciální model s  $\chi^2$  kvadrátem 1,02, což je optimální hodnota, rezidua jsou vyrovnaná, ale je třeba zohlednit i další parametry. V tomto případě rozhoduje amplituda rozložení jednotlivých časů. Na obrázku 16 má třetí z amplitud zápornou hodnotu a tudíž nedává smysl. Je třeba se tedy vrátit k biexponenciálnímu modelu, který byl o něco méně ideální, ale zato reálný.

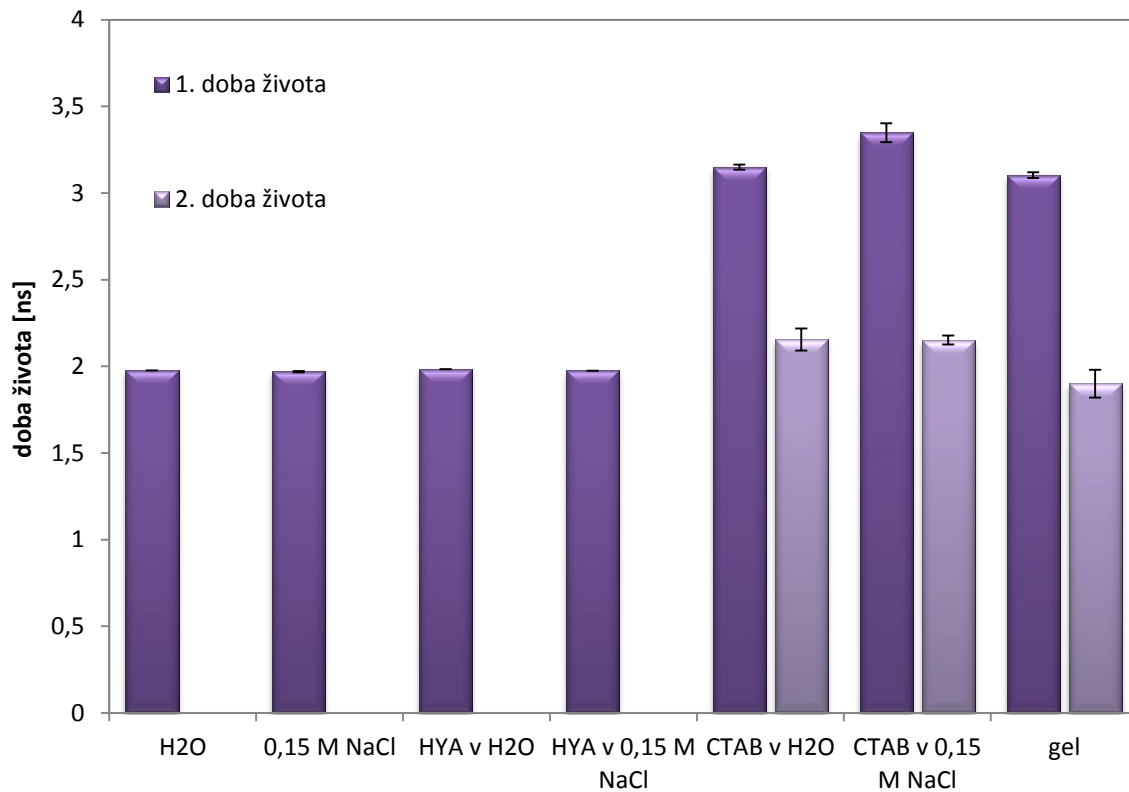


Obr. č. 16: Ukázka TCSPC analýzy – triexponenciální křivka

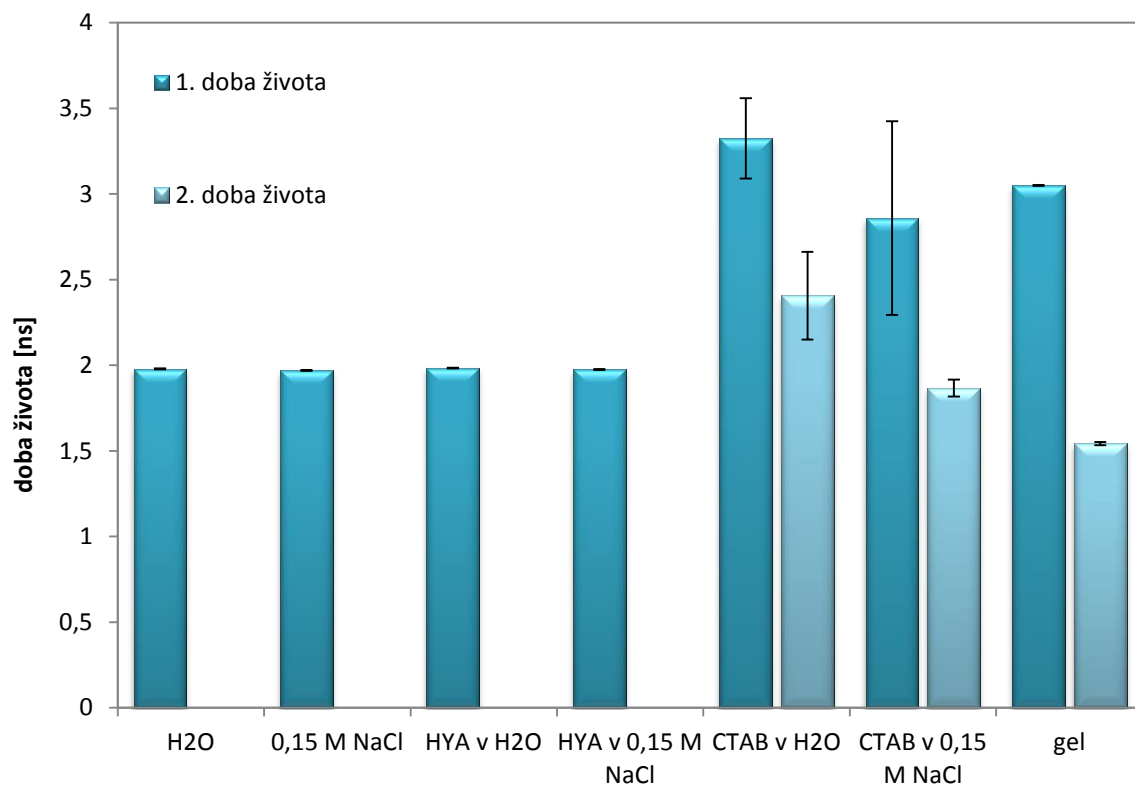
Tab. č. 6: Rozdělení pravděpodobnosti u triexponenciálního modelu

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| $\tau_1$ [ns] | $3,160 \pm 0,004$ |
| $\tau_2$ [ns] | $1,83 \pm 0,02$   |
| $\tau_3$ [ns] | $0,22 \pm 0,02$   |
| $A_1$ [kCnts] | $88,3 \pm 0,7$    |
| $A_2$ [kCnts] | $35,0 \pm 0,5$    |
| $A_3$ [kCnts] | $-3,9 \pm 0,2$    |
| $\chi^2$      | 1,02              |

TCSPC analýzou také získáme informace o relativním zastoupení jednotlivých dob života. Na obrázku 17 a 18 jsou znázorněny doby života pro jednotlivá prostředí a gel se sondou ATTO 655.



Obr. č. 17: Znázornění dob života pro koncentraci  $10^{-8}$  M ATTO 655



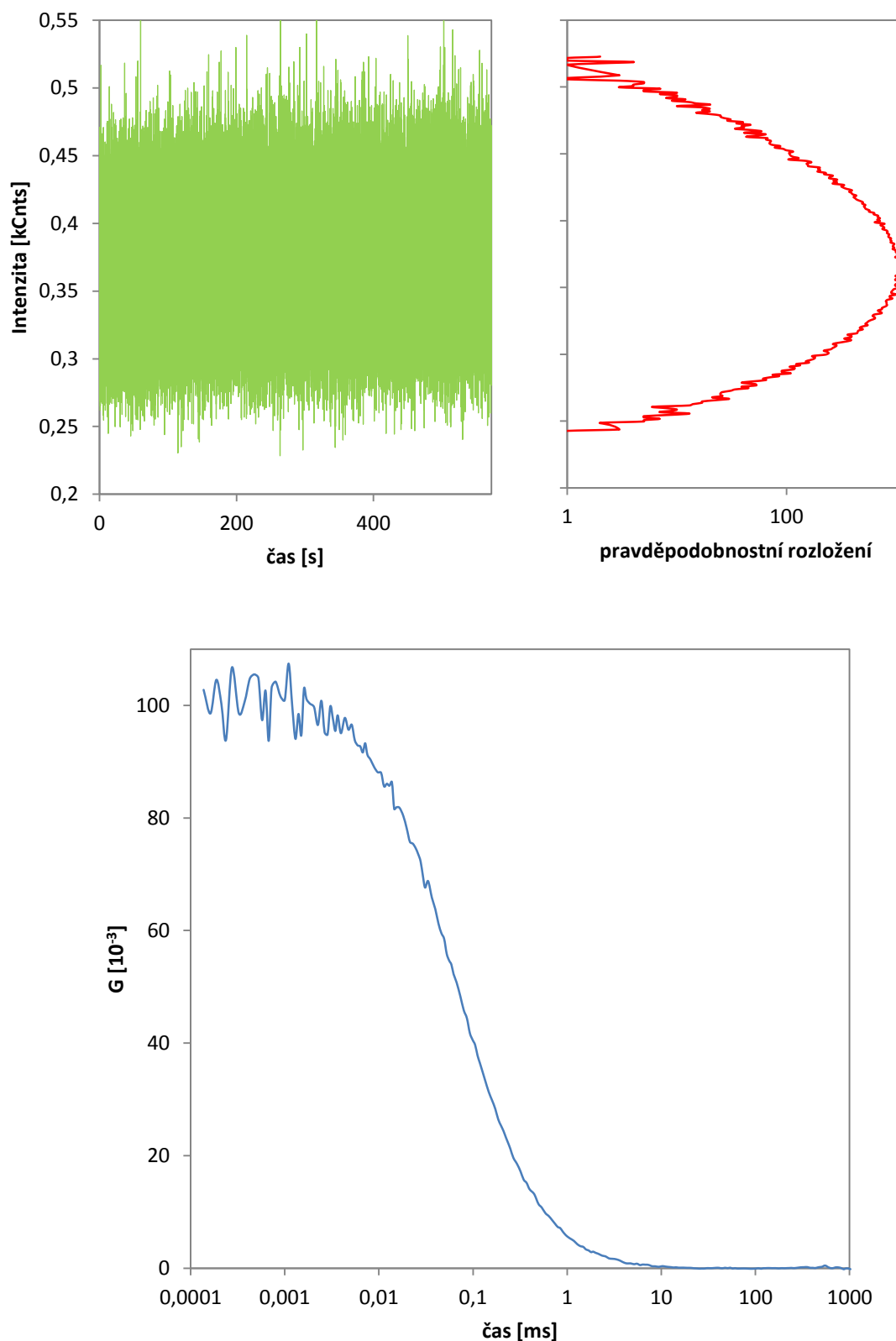
Obr. č. 18: Znázornění dob života pro koncentraci  $10^{-9}$  M ATTO 655

U jednoduchých systémů jako je vodné prostředí, nebo prostředí 0,15 M NaCl, popřípadě prostředí hyaluronanu byl potvrzen předpoklad jedné doby života fluorescenční sondy, a to v obou koncentracích sondy. Doba života sondy se pohybuje okolo hodnoty 2 ns s velmi malou odchylkou od průměrné hodnoty. Vysvětlením je, že sonda neinteraguje s prostředím, ale dochází k prosté difúzi, a ani viskóznější prostředí hyaluronanu nedonutilo sondu ke zpomalení difúze. Můžeme tedy předpokládat, že ač se hyaluronan navenek jeví jako viskóznější oproti vodě, mezimolekulový prostor je podobný jako např. u vody a sonda tak putuje prostředím se stejnou rychlostí. Zároveň lze říci, že nedochází k žádným interakcím sondy s prostředím, které by ovlivnily dobu života. Roztok hyaluronanu byl pouze 0,5% , je diskutabilní zda by více koncentrovaný roztok poskytoval jiné hodnoty dob života, a do jaké míry by se změnily, popř. zkoumání závislosti koncentrace na prodlužování doby života sondy se jeví velmi zajímavým pro další experimenty.

V obou grafech prezentujících různé koncentrace sondy můžeme pozorovat, že dvě doby života se projeví pouze tam, kde se vyskytuje prostředí CTAB, tedy v samotných roztocích sondy rozpuštěné v CTAB a v gelu, nezávisle na přítomnosti 0,15 M NaCl. V rámci standardních odchylek je vidět že v roztoku CTAB ve vodě, v 0,15 M NaCl, i v gelu se delší doby života pohybují velmi blízko hodnoty 3 ns. U vyšší koncentrace sondy se nezávislost přítomnosti chloridových iontů projevuje i u kratších dob života sondy. V tomto případě dvě doby života přisuzujeme interakci sondy s hlavou micely, neboť sonda ATTO 655 je hydrofilní. V případě hydrofobicity sondy by se dala uvažovat i teorie zapouzdření fluorescenční sondy do hydrofobní části micely, tedy interakce s dlouhými uhlovodíkovými řetězci molekuly CTAB, což bude navrženo k dalšímu zkoumání.

#### **4.6.2. FCS analýza**

Touto analýzou získáme podrobnější informace o chování molekuly fluorescenční sondy v systému. Nejprve musíme nechat data kroskorelovat mezi dvěma detektory. Získáme tak mnohem přesnější výsledky, než při měření pouze na jeden detektor. Na obrázku č. 19 vidíme v horní části obrázku zeleně vyznačenou fluktuaci intenzity po celou dobu měření na časové ose, kde můžeme zkontrolovat i relativní zastoupení jednotlivých intenzit pomocí diagramu v pravém horním rohu (červeně). Zbylá část obrázku již patří samotné FCS křivce, která má sigmoidní tvar, byla podrobena kroskorelaci mezi dvěma detektory, které byly použity k měření, a je připravena k fitování.

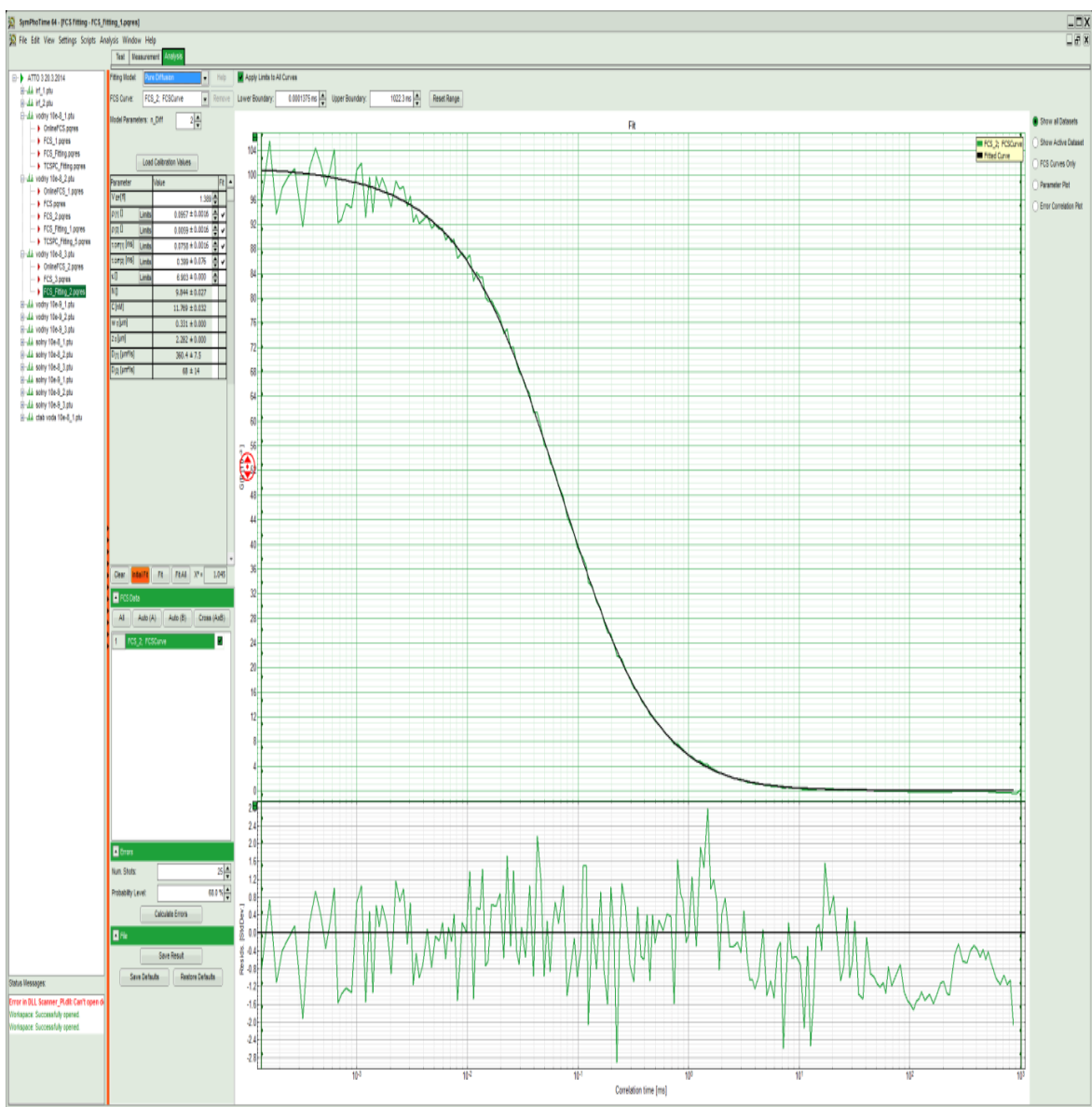


Obr. č. 19: Data získaná během FCS analýzy

Poté máme možnost zvolit několik matematických modelů, jako např. prostá difúze, triplet, triplet kombinovaný s libovolným počtem difúzních časů, apod. Stejně jako u TCSPC analýzy je přihlíženo hlavně k ch<sup>2</sup> kvadrátu, reziduíům a amplitudám. Jedním z možných způsobů jak



může vyhodnocování vypadat, je zobrazeno na obrázku č. 20., který prezentuje vzorek sondy ATTO 655 ve vodném prostředí. Po zvážení všech aspektů byl zvolen matematický model prostá difúze, který se zdá být nejlépe vyhovující.



Obr. č. 20: Uživatelské rozhraní analýzy programu SymPhoTime 64

Takto postupujeme u všech dalších vzorků a výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 7, kde různově vyznačené jsou časy, které byly přisouzeny samotné sondě ATTO volně difundující v prostředí, zeleně u vzorků CTAB byly vyznačeny časy, kdy sonda byla zachycena v micelle a modře jsou vyznačeny prosté rotační časy molekuly. V případě gelových roztoků pozorujeme několikanásobné prodloužení časů, což může být způsobeno jednak micelami, které jsou v gelu nedílnou součástí jeho struktury, tak i sterickým efektům, které molekule brání ve volném pohybu prostředím.

Tabulka č. 7: Difúzní časy ( $\tau_D$ ) a difúzní koeficienty ( $D$ ) jednotlivých vzorků sondy ATTO 655

| $c_{\text{ATTO655}} = 10^{-8} \text{ M}$ | $\tau_D$ [ms] | $\tau_D 2$ [ms] | $D 1$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] | $D 2$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] | $\tau_t$ [ $\mu\text{s}$ ] |
|--|---------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                    | 0,32 ± 0,10   | 0,078 ± 0,006   | 91 ± 27                            | 353 ± 26                           |                            |
| <b>NaCl</b>                              | 0,22 ± 0,03   | 0,072 ± 0,005   | 127 ± 16                           | 380 ± 27                           |                            |
| <b>Hya v H<sub>2</sub>O</b>              | 0,25 ± 0,05   | 0,081 ± 0,003   | 109 ± 18                           | 338 ± 14                           |                            |
| <b>HyA v NaCl</b>                        | 0,65 ± 0,04   | 0,086 ± 0,004   | 43 ± 4                             | 318 ± 13                           |                            |
| <b>CTAB v H<sub>2</sub>O</b>             | 1,93 ± 0,55   | 0,469 ± 0,009   | 15 ± 4                             | 58 ± 1                             |                            |
| <b>CTAB v NaCl</b>                       | 1,93 ± 0,45   | 0,206 ± 0,006   | 15 ± 3                             | 130 ± 4                            |                            |
| <b>gel</b>                               | 2,36 ± 0,23   |                 | 12 ± 1                             |                                    | 2,3 ± 0,5                  |
| $c_{\text{ATTO655}} = 10^{-9} \text{ M}$ | $\tau_D$ [ms] | $\tau_D 2$ [ms] | $D 1$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] | $D 2$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] | $\tau_t$ [ $\mu\text{s}$ ] |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                    | 0,28 ± 0,06   | 0,077 ± 0,007   | 99 ± 22                            | 356 ± 34                           |                            |
| <b>NaCl</b>                              | 0,23 ± 0,04   | 0,075 ± 0,002   | 120 ± 20                           | 364 ± 9                            |                            |
| <b>Hya v H<sub>2</sub>O</b>              | 0,24 ± 0,01   | 0,074 ± 0,007   | 230 ± 94                           | 269 ± 153                          |                            |
| <b>HyA v NaCl</b>                        | 0,46 ± 0,15   | 0,084 ± 0,004   | 63 ± 17                            | 327 ± 14                           |                            |
| <b>CTAB v H<sub>2</sub>O</b>             | 2,25 ± 0,37   | 0,458 ± 0,007   | 12 ± 2                             | 60 ± 1                             |                            |
| <b>CTAB v NaCl</b>                       | 1,02 ± 0,48   | 0,206 ± 0,009   | 30 ± 11                            | 133 ± 6                            |                            |
| <b>gel</b>                               | 2,98 ± 0,17   |                 | 9 ± 1                              |                                    | 1,8 ± 0,4                  |

Difúzní koeficienty nám dávají v tomto případě informaci o viskozitě prostředí, čím větší hodnota difúzního koeficientu tím méně viskóznější prostředí. Můžeme zde pozorovat jistý trend, který nám říká, že fyziologickým roztokem molekuly sondy putují obecně snadněji než ve vodném prostředí a oproti vodným roztokům jsou roztoky hyaluronanu více viskóznější, což je ale patrné již na první pohled.

Zajímavější výsledky nejspíše poskytne prostředí CTAB. Difúzní koeficient zde prudce poklesl oproti předchozím systémům, takže můžeme dedukovat, že zde dochází k radikální změně prostorového chování a pohybu molekuly sondy v roztoku. Na základě předchozích znalostí víme, že tento pokles difúzních koeficientů přisuzujeme přítomnosti micel, neboť právě přítomnost micel poskytuje další místo pro interakce fluorescenční sondy. Jelikož sonda ATTO 655 je hydrofilní a nebude se tedy zapouzdřovat do vnitřního prostoru micel, můžeme předpokládat, že interaguje s jejím obalem, tedy s hydrofilní částí. Tato interakce pak může způsobovat zpomalování putování sondy v roztoku a po zprůměrování dat přístrojem získáme nižší difúzní koeficient, než např. ve vodném prostředí, kde se micely nevyskytují. Dále vidíme rozdíl v hodnotách stanovených za pomoci různých koncentrací sondy. Koncentrovanější roztok poskytuje dva totožné výsledky dlouhých difúzních časů, na rozdíl od méně koncentrovaného roztoku, kde je patrný pokles v prostředí 0,15 M NaCl. Vzhledem k četnosti měření se přikláníme k názoru, že pro dané měření je vhodnější zvolit nižší

koncentraci sondy, neboť konfokálním objemem procházejí jednotky molekul, což je pro systém optimální.

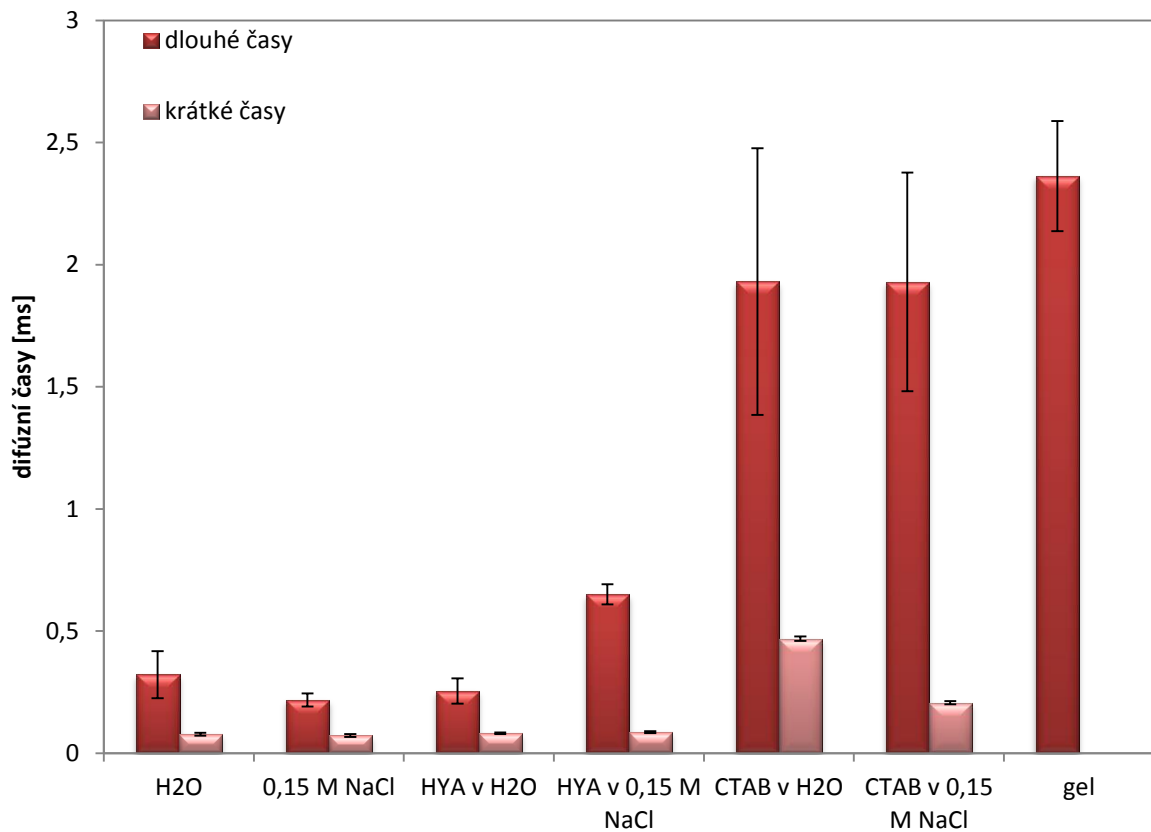
Gelové systémy nám poskytují ještě třetí dimenzi pozorování, a to sterické efekty. Na první pohled je gel čirý, tuhý a velmi viskózní, z čehož je možno předpokládat interakce sondy s prostorovou sítí gelu a tím i delší difúzní časy, což nám měření potvrdilo.

V tabulce č. 8 vidíme kromě difúzních časů i tripletní čas, který byl zaznamenán pouze u gelu. Hodnota efektivního objemu  $V_{\text{eff}}$  byla pomocí kalibrace stanovena na 1,389 femtolitrů,  $\rho_1$  a  $\rho_2$  je pravděpodobnostní rozdělení jednotlivých časů,  $\tau_D$  je difúzní čas,  $\tau_t$  je tripletní čas,  $\kappa$  je excentricita,  $N$  značí počet molekul prošlých konfokálním objemem a  $D_1$  a  $D_2$  jsou relativní difúzní koeficienty. Efektivní objem a excentricita nemají směrodatnou odchylku, jelikož nebyly počítány zprůměrováním více hodnot, ale stanoveny již na začátku experimentu kalibrací konfokálního objemu.

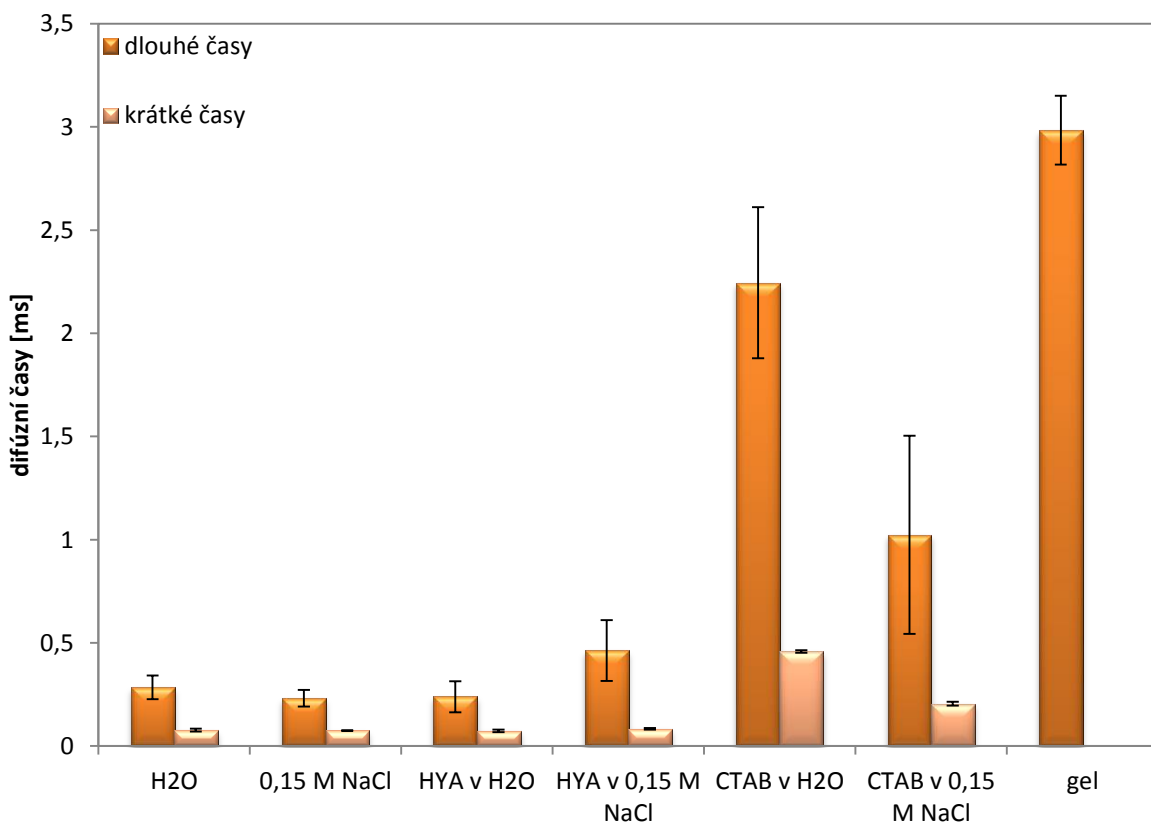
Tabulka č. 8: Analyzované hodnoty pro gelový systém se sondou ATTO 655

| koncentrace   | $10^{-8}$ M      | $10^{-9}$ M     |
|---|------------------|-----------------|
| <b><math>V_{\text{eff}}</math> [fl]</b>                       | 1,39             | 1,39            |
| <b><math>\rho_1</math></b>                                    | $0,03 \pm 0,01$  | $0,23 \pm 0,03$ |
| <b><math>\tau_D</math> [ms]</b>                               | $2,36 \pm 0,23$  | $2,98 \pm 0,17$ |
| <b><math>\tau_t</math> [<math>\mu</math>s]</b>                | $2,31 \pm 0,52$  | $1,76 \pm 0,42$ |
| <b><math>\kappa</math></b>                                    | 6,9              | 6,9             |
| <b><math>N</math></b>   | $42,40 \pm 9,47$ | $4,68 \pm 0,75$ |
| <b><math>D_1</math> [<math>\mu\text{m}^2/\text{s}</math>]</b> | $11,66 \pm 1,17$ | $9,18 \pm 0,51$ |

Pro lepší znázornění s vyobrazením chybových úseček u každého vzorku jsou přiloženy dva grafy, z nichž každý reprezentuje jednu koncentraci vzorků sondy ATTO 655 ve zvolených prostředích. Na obrázku 21 a 22 můžeme tedy pozorovat, že dlouhé difúzní časy rostou u CTAB a gelu, ale zároveň je měření těchto vzorků zatíženo největší chybou. U CTAB je to přisuzováno mikroheterogenitě prostředí, neboť nemůžeme zaručit, aby přístroj v danou chvíli měřil pouze v micelách, a nebo pouze mimo micely, proto po zprůměrování hodnot dochází k odlišnostem v rozmezí 18 - 25 %. U gelu je třeba zohlednit i viskozitu prostředí v kombinaci s mikroheterogenitou a výsledkem je chyba měření 6-8 % v závislosti na koncentraci.



Obr. č. 21: Graf naznačující rozložení difúzních časů mezi jednotlivými vzorky s koncentrací  $10^{-8} M$



Obr. č. 22: Graf naznačující rozložení difúzních časů mezi jednotlivými vzorky s koncentrací  $10^{-9} M$

## 5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala studiem hydrofilních koloidů pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie. Byla vypracována rešerše na téma hydrogely a jejich měření pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Ke studiu těchto systémů byla zvolena jako hlavní sonda ATTO 655 a pro počáteční měření i sondy fluorescein, rhodamin a perylen. Systémy byly zkoumány při jedné koncentraci tenzidu a hyaluronanu a při proměnlivé koncentraci fluorescenční sondy.

Doby života byly analyzovány pomocí TCSPC, dílčí časy FCS analýzou. V případě CTAB se jeví vhodné využití i FLCS analýzu, která nám oddělí jednotlivé doby života.

Během analýzy dat získáme mnoho informací – doby života, které nás informují o látkách, nebo prostředí, ve kterém se látky nacházejí. V našem případě zkoumáme pouze vlivy prostředí, neboť pracujeme s jednou fluorescenční sondou v roztoku. U sondy ve vodě a ve fyziologickém roztoku bylo analýzou zjištěno, že ATTO 655 vykazuje pouze jednu dobu života a dva difúzní časy, z nich ten kratší je sdílen se všemi ostatními prostředími a ten delší vysvětluje chování molekuly v prostředí.

Naopak CTAB vykazovalo dvě doby života, což můžeme vysvětlit interakcemi micel se sondou. Nejjednodušším vysvětlením je, že sonda interaguje s hydrofilní hlavou micely, která obsahuje bromidový aniont. Doby života u roztoku CTAB byly dále analýzou rozděleny mezi dva difúzní časy, ale stejně tak bychom mohli předpokládat jeden difúzní čas a jeden tripletní čas. Na základě reziduí jsme se přiklonili k faktu, že vodné roztoky CTAB triplet netvoří, na rozdíl od gelů, kde je triplet průkazný. Rozdíl mezi vodou a fyziologickým roztokem jako rozpouštědly byl průkazný pouze u nižší koncentrace sondy, což bylo vysvětleno tím, že nižší koncentrace disponuje lepšími hodnotami počtu molekul procházejícími konfokálním objemem, a je tedy považována za přesnější, na rozdíl od vyšší koncentrace a delšího difúzního času, kde se hodnoty u obou rozpouštědel vyrovnaly.

U roztoků kyseliny hyaluronové docházelo k drobným změnám závislých na době měření. Pro analýzu byly tedy rozhodující hodnoty z delších měření. U vodných roztoků byly vyhodnoceny kratší difúzní časy než u roztoků ve fyziologickém prostředí, a tento jev byl pozorován u obou zvolených koncentrací. Přisuzujeme to interakcím chloridových aniontů s funkčními skupinami sondy ATTO 655, kdy právě z tohoto důvodu mohlo docházet ke zpomalování vyhasínání. Rozdíly mezi jednotlivými prostředími jsou však ve stovkách mikrosekund. Přestože byly roztoky sondy ve vodném roztoku hyaluronanu mnohem viskóznější než sonda v hyaluronanu v 0,15 M NaCl, nestačilo to na přechod molekuly do tripletního stavu, z čehož lze tvrdit, že viskozita prostředí hraje určitou roli, ale ne definitivní.

Pro interpretaci chování hydrogelů byly velmi důležité předchozí měření, neboť právě s nimi porovnáváme získané výsledky a z nich usuzujeme jednotlivé interakce mezi systémy. Hydrogely obsahující NaCl, CTAB a sondu; vykazují dvě doby života, jeden až dva difúzní časy a jeden triplet. Dvě doby života jsou přisuzovány micelám, které v gelu tvoří CTAB a tripletní čas by mohl být způsoben viskozitou prostředí, neboť v porovnání s roztoky byl hydrogel tuhý a nestékal z podložního sklíčka. Molekula sondy se v prostorové síti gelu tedy mohla zdržovat déle než v méně viskóznějších roztocích. Musíme také zohlednit sterický faktor, protože sonda ATTO 655 je velká organická molekula a póry gelu mohou být menší a molekulu zdržovat pouze na základě jejího objemu. Dále musíme zvážit interakce s prostorovou sítí gelu, která je tvořena jak dlouhými řetězci hyaluronanu, tak i micelami z CTAB, které jsou nedílnou součástí struktury. Krátký difúzní čas by tedy mohl patřit volnému pohybu molekuly v disperzním prostředí gelu, triplet interakcím s prostorovou sítí.

Také bylo zjištěno, že gel do sebe pohltí desetkrát více sondy než vodné roztoky téže koncentrace.

Metoda fluorescenční korelační spektroskopie tedy splňuje předpoklady pro měření složitějších systémů, jako jsou hydrogely. Je třeba upravit hierarchii měření oproti roztokům s ideálnějšími vlastnostmi pro měření, jako je malá viskozita, nebo pouze sonda s rozpouštědlem, ale ve výsledku se i u složitějších systémů s náročnější interpretací můžeme úspěšně dopracovat k cíli.

Cíle bakalářské práce byly splněny a otevřel se nový způsob zkoumání těchto systémů pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie, ve kterém bude velmi zajímavé pokračovat v další práci. Zajímavým se budou jevit hydrofobní sondy, které by mohly simulovat cytostatika, a výzkum cílených nosičů léčiv by mohl být posunut zase o krok dál.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

### Teoretická část

[1] NECAS, J., BARTOSKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): areview. *Veterinarni medicina*. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397-411.

[2] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R.: *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Springer Science + Business Media, 2006, v. 351, s. 2-10.

[3] SCOTT, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30.11.2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>

[4] LAPCIK, Lubomir, Jr., Lubomir LAPCIK, Stefaan De SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABRECEK. ChemInform: Hyaluronan. *ChemInform*. 2010, vol. 30, issue 12, no-no. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.199912338>.

[5] PATIL, Kanchankumar P., Deepak K. PATIL, Bhushan L. CHAUDHARI a Sudhir B. CHINCHOLKAR. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, vol. 111, issue 3, s. 286-288. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.10.012>.

[6] GOTOH, S, J ONAYA, M ABE, K MIYAZAKI, A HAMAI, K HORIE a K TOKUYASU. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993, vol. 52, issue 11, s. 817-822. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.52.11.817>.

[7] PAVICIC, Tatjana, Gerd G. GAULITZ, Peter LERSCH, Khadija SCHWACH-ABDELLAOUI, Birgitte MALLE, Hans Christian KORTING a Mike FARWICKA. Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2011, roč. 10, č. 9.

[8] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. roč. 1999, s. 421-427. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_07\\_421-427.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf)

[9] *Surfactants: chemistry, interfacial properties, applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2001, 661 s. ISBN 04-445-0962-3.

[10] RAY, PARESH CHANDRA, HONGTAO YU a PETER P. FU. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2009, vol. 27, issue 1, s. 1-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10590500802708267>.

[11] *A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory* Bernard Valeur and Mario N. Berberan-Santos J. Chem. Educ., 2011, 88 (6), pp 1-2 [doi:10.1021/ed100182h](https://doi.org/10.1021/ed100182h)

[12] LAKOWICZ, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition, Kluwer Academic/Plenum Publ., New York, 1999

[13] SILINSH, By Edgar A. *Organic molecular crystals: their electronic states*. S.l.: Springer, 1980. ISBN 978-364-2814-662.

[14] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_02\\_125-129.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf)

[15] GREGOR, Ingo, Jörg ENDERLEIN a R. LOPEZ-DELGADO. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Photochemical*. 2007, vol. 6, issue 1, s. 615-620. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-1634-4\\_32](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-1634-4_32).

[16] HUMPOLÍČKOVÁ, Jana, Aleš BENDA, Jan SÝKORA, Radek MACHÁŇ, Teresa KRAL, Barbara GASINSKA, Joerg ENDERLEIN a Martin HOF. Equilibrium Dynamics of Spermine-Induced Plasmid DNA Condensation Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2008, vol. 94, issue 3, L17-L19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.122408>.

[17] Swift SR, Trinkle-Mulcahy L. Basic principles of FRAP, FLIM, and FRET. *Proceedings of the Royal Microscopical Society* 2004;39:3-10.

[18] WEIGEL, Paul. H. Hyaluronan Synthases. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30.11.2013]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hapdf/HA06.pdf>



## Rešerše

**Censi Roberta a spol.** CENSI, Roberta, Piera Di MARTINO, Tina VERMONDEN a Wim E. HENNINK. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2012, vol. 161, issue 2, s. 680-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.002>.

**Patterson Jennifer a spol.** PATTERSON, Jennifer, Ruth SIEW, Susan W. HERRING, Angela S.P. LIN, Robert GULDBERG a Patrick S. STAYTON. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*. 2010, vol. 31, issue 26, s. 6772-6781. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.0>.

**Kim Iris a spol.** KIM, Iris L., Robert L. MAUCK a Jason A. BURDICK. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011, vol. 32, issue 34, s. 8771-8782. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.0>.

**Martínez-Sans Elena a spol.** MARTÍNEZ-SANZ, Elena, Dmitri A. OSSIPOV, Jöns HILBORN, Sune LARSSON, Kenneth B. JONSSON a Oommen P. VARGHESE. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *Journal of Controlled Release*. 2011, vol. 152, issue 2, s. 232-240. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.003>.

**Tao Youhuha a spol.** TAO, Youhua, Jing XU, Mingqing CHEN, Huiyu BAI a Xiaoya LIU. Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 88, issue 1, s. 118-124. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.075>.

**Oh Eun Ju a spol. :** OH, Eun Ju, Kitae PARK, Ki Su KIM, Jiseok KIM, Jeong-A YANG, Ji-Hyun KONG, Min Young LEE, Allan S. HOFFMAN a Sei Kwang HAHN. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*. 2010, vol. 141, issue 1, s. 2-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.010>.

**Li Jing a spol.** LI, Jing, Meirong HUO, Jing WANG, Jianping ZHOU, Jumah M. MOHAMMAD, Yinlong ZHANG, Qinnv ZHU, Ayman Y. WADDAD a Qiang ZHANG. Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials*. 2012, vol. 33, issue 7, s. 2310-2320. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.0>.

**Yoon Hong a spol.** YOON, Hong Yeol, Heebeom KOO, Ki Young CHOI, Ick Chan KWON, Kuiwon CHOI, Jae Hyung PARK a Kwangmeyung KIM. Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2013, vol. 34, issue 21, s. 5273-5280. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.0>.

**Fatemeh Tabatabaei a spol. :** TABATABAEI, Fatemeh, Olaf LENZ a Christian HOLM. Simulational study of anomalous tracer diffusion in hydrogels. *Colloid and Polymer Science*. 2011, vol. 289, 5-6, s. 523-534. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-011-2393-0>.

**Raccis Riccardo. a spol. :** RACCIS, Riccardo , R. Roskamp, I. Hopp, B. Menges, K. Koynov, U. Jonas, W. Knoll, H.-J. Butt, G. Fytas. Probing mobility and structural inhomogeneities in grafted hydrogel films by fluorescence correlation spectroscopy. *Soft Matter*. 2011, vol. 7, 7042-7053.

**Lee a spol.:** LEE, Jung Seog, Wei ZHOU, Fenghua MENG, Dianweng ZHANG, Cees OTTO a Jan FEIJEN. Thermosensitive hydrogel-containing polymersomes for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010, roč. 146, č. 33. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.002>  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910004074>)

**Guldbbrand Stina a spol.:** GULDBRAND, Stina, Vladimir KIREJEV, Carl SIMONSSON, Mattias GOKSÖR, Maria SMEDH a Marica B. ERICSON. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy as a tool for measuring molecular diffusion within human skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, vol. 84, issue 2, s. 430-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.001>.

**Koutsopoulos Sotirios a spol.:** KOUTSOPOULOS, Sotirios a Shuguang ZHANG. Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *Journal of Controlled Release*. 2012, vol. 160, issue 3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.014>.

**Hovorka Ondřej a spol. :** HOVORKA, Ondřej, Vladimír ŠUBR, David VĚTVIČKA, Lubomír KOVÁŘ, Jiří STROHALM, Martin STROHALM, Aleš BENDA, Martin HOF, Karel ULBRICH a Blanka ŘÍHOVÁ. Spectral analysis of doxorubicin accumulation and the indirect quantification of its DNA intercalation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010, vol. 76, issue 3, s. 514-524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.008>.

## 7. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 7.1. Seznam zkratek

| Zkratka | Význam   |
|---------|--|
| Cnts    | counts (počet fotonů prošlých jednotkovým objemem za jednotku času)                                      |
| CTAB    | cetyltrimethylamonium bromid   |
| FCS     | Fluorescence correlation spectroscopy (fluorescenční korelační spektroskopie)                            |
| FLCS    | Fluorescence life-time correlation spectroscopy (časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie) |
| FLIM    | Fluorescence life-time imaging (vytváření obrázků podle dob života)                                      |
| HyA     | hyaluronan   |
| IRF     | instrument response function (funkce přístrojové odezvy)   |
| TCSPC   | Time-correlated single photon counting (metoda časově korelovaného čítání fotonů)                        |
| THF     | tetrahydrofuran  |

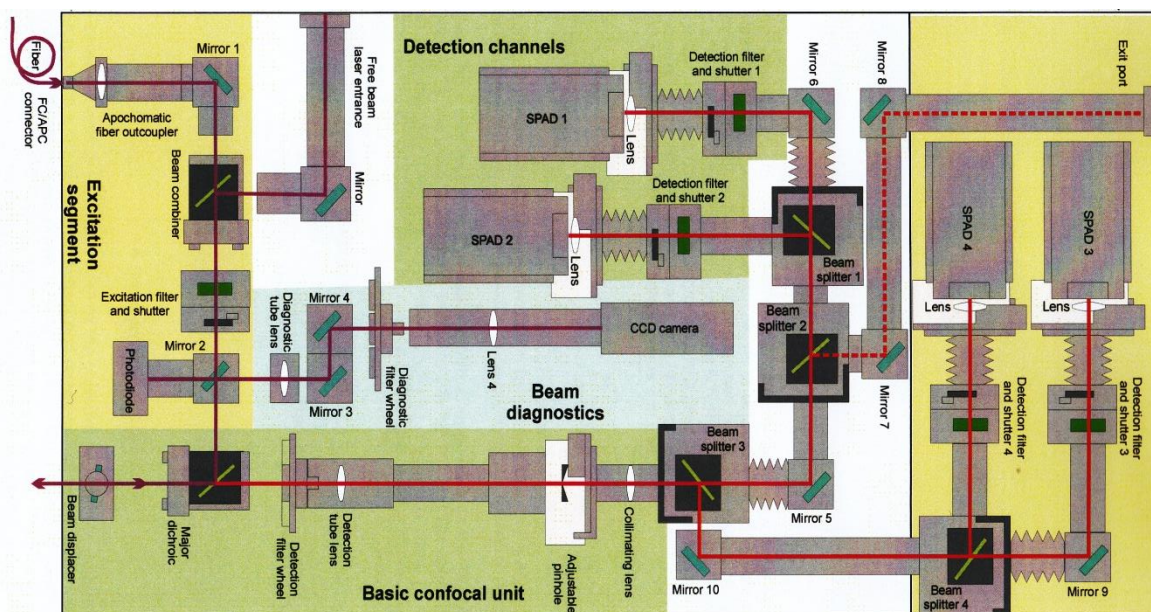
### 7.2. Seznam symbolů

| Symbol      | Název veličiny  |
|-------------|---|
| $C$         | koncentrace částic  |
| $D$         | difúzní koeficient  |
| $\delta$    | okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty                        |
| $\Phi_F$    | kvantový výtěžek  |
| $G(\tau)$   | autokorelační funkce  |
| $I$         | intenzita signálu   |
| $\eta$      | počet fotonů detekovaných z jedné molekuly za jednu sekundu               |
| $N$         | počet molekul   |
| $N_A$       | počet molekul látkou absorbovaných  |
| $N_E$       | počet molekul látkou emitovaných  |
| $T$         | celkový čas   |
| $\tau_D$    | difúzní čas   |
| $\tau_\tau$ | tripletní čas   |
| $W$         | prostorové rozložení emitovaného světla                                   |
| $w_0$       | charakteristický rozměr detekčního objemu v ohniskové rovině objektivu    |
| $z_0$       | charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu |

## 8. PŘÍLOHY



Příloha č. 1: Přístrojové vybavení pro měření metodou FCS



Příloha č. 2: Schéma hlavní měřicí jednotky s detektorových prostorem