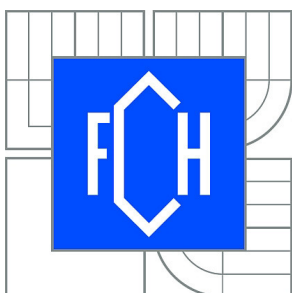


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

TECHNIKA ANISOTROPIE A ČASOVĚ ROZLIŠENÉ ANISOTROPIE VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

ANISOTROPY AND TIME-RESOLVED ANISOTROPY TECHNIQUES IN COLLOIDAL SYSTEMS RESEARCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PETRA UCEKAJOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0812/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Petra Ucekajová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová, Ph.D. Ing. Jakub Mondek	

Název diplomové práce:

Technika anisotropie a časově rozlišené anisotropie ve výzkumu koloidních systémů

Zadání diplomové práce:

- 1) Shromáždit literární poznatky o využití techniky anisotropie a časově rozlišené anisotropie ve výzkumu koloidních systémů.
- 2) Seznámit se s technikami anisotropie dostupné na řešitelském pracovišti..
- 3) Navrhnout, provést a porovnat hodnoty a průběhy anisotropie v roztoku a v kondenzovaných systémech polymer-tenzid s vhodnou fluorescenční sondou.
- 4) Zhodnotit výsledky z kapalných a kondenzovaných fází z hlediska mikroviskozity a shrnout využitelnost dostupných technik pro daný typ výzkumu.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

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

Bc. Petra Ucekajová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, 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

V rámci této diplomové práce byly z hlediska mikroviskozity zkoumány kapalně a kondenzované systémy tvořené hyaluronanem (Hya) a kationtovým tenzidem cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB). U vzorků byly měřeny excitační a emisní spektra, doba života, anizotropie ustálené fluorescence a časově-rozlišená anizotropie fluorescence. Nejprve byl studován vznik hydrofobních domén v systému Hya-CTAB při koncentracích CTAB nižších než jeho kritická micelární koncentrace ve vodném prostředí a v prostředí 0,15M NaCl. Ukázalo se, že ve vodném prostředí dochází ke vzniku malých hydrofobních domén navázaných na řetězci Hya a od určité vyšší koncentrace CTAB dochází k fázové separaci a vzniku kondenzované fáze. Vlivem přídavku NaCl pak dochází k přebudování tohoto systému, které pravděpodobně vede ke vzniku volných micel v roztoku. Dále byly zkoumány kondenzované fáze systému Hya-CTAB-NaCl při vysokých koncentracích tenzidu v průběhu čtrnáctidenního stárnutí. Ukázalo se, že hydrofobní domény jsou z hlediska mikroviskozity stále, zato u hydrofilních částí dochází k jejímu postupnému snižování.

ABSTRACT

In this diploma thesis were investigated in terms of microviscosity liquid and condensed systems composed of hyaluronan (Hya) and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The excitation and emission spectra, lifetime, steady-state fluorescence anisotropy and time-resolved fluorescence anisotropy of the samples were measured. First, was studied the formation of hydrophobic domains in the system Hya-CTAB at concentration of CTAB lower than its critical micelle concentration in an aqueous solution and 0.15M NaCl. It was found that in an aqueous solution small hydrophobic domains linked to chains Hya are formed. Then an increasing concentration of CTAB leads to phase separation and formation of gel. Due to the addition of NaCl then leads to the reorganization of this system and probably the formation of free micelles in the solution. Were also studied condensed phase of system Hya-CTAB-NaCl at high concentrations of surfactant during fourteen days of ageing. It was found that the microviscosity of hydrophobic domains is constant, but the microviscosity of hydrophilic parts gradually decreases.

KLÍČOVÁ SLOVA

Anizotropie fluorescence, hyaluronan, CTAB, interakce, perylen, rhodamin 6G, mikroviskozita.

KEY WORDS

Fluorescence anisotropy, hyaluronan, CTAB, interaction, perylene, rhodamine 6G, microviscosity.

UCEKAJOVÁ, P. *Technika anisotropie a časově rozlišené anisotropie ve výzkumu koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 83 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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 studentky

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a také konzultantovi Ing. Jakubu Mondekovi za trpělivost, pomoc při řešení problémů a odborný dohled. Mé velké poděkování pak patří mé rodině a příteli za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Fotoluminiscence.....	9
2.1.1	<i>Fluorescence</i>	10
2.1.2	<i>Fosforescence</i>	10
2.1.3	<i>Zpožděná fluorescence</i>	10
2.1.4	<i>Excitační a emisní spektra molekul</i>	11
2.1.5	<i>Doba života</i>	11
2.1.6	<i>Kvantový výtěžek</i>	12
2.1.7	<i>Fluorescenční sondy</i>	13
2.1.7.1	Perylen.....	13
2.1.7.2	Rhodamin 6G	15
2.2	Polarizovaná fluorescence, anizotropie fluorescence.....	16
2.2.1	<i>Definice a základní vztahy</i>	17
2.2.1.1	Ustálená anizotropie.....	17
2.2.1.2	Polarizační stupeň.....	17
2.2.1.3	Časově-rozlišená anizotropie.....	17
2.2.1.4	Aditivní zákon anizotropie	18
2.2.1.5	Fundamentální anizotropie	19
2.2.2	<i>Měření anizotropie fluorescence</i>	19
2.2.2.1	Princip měření ustálené anizotropie fluorescence	19
2.2.2.2	G-faktor	20
2.2.2.3	Magický úhel.....	21
2.2.2.4	Princip měření časově-rozlišené anizotropie – TCSPC metoda	21
2.2.3	<i>Použití měření anizotropie fluorescence</i>	22
2.3	Mikroviskozita, fluidita, jejich stanovení pomocí fluorescenčních sond	23
2.3.1	<i>Viskozita, její význam na mikroskopické úrovni</i>	23
2.3.2	<i>Pojem mikroviskozita, ekvivalentní viskozita</i>	24
2.3.3	<i>Metody stanovení ekvivalentní viskozity</i>	25
2.3.3.1	Molekulární rotory	25
2.3.3.2	Intermolekulární zhášení	25
2.3.3.3	Tvorba intermolekulárního excimeru	26
2.3.3.4	Tvorba intramolekulárního excimeru	26
2.3.3.5	Anizotropie fluorescence.....	27
2.4	Kyselina hyaluronová, hyaluronan	28
2.4.1	<i>Struktura, fyzikální a chemické vlastnosti</i>	28
2.4.1.1	Struktura v roztoku.....	29
2.4.2	<i>Biosyntéza</i>	31
2.4.3	<i>Výskyt, biologické funkce</i>	32
2.4.4	<i>Využití</i>	32
2.5	Asociativní (micelární) koloidy.....	32

2.5.1	<i>Struktura tenzidu</i>	33
2.5.2	<i>Hromadění tenzidů na fázovém rozhraní, vznik micel</i>	33
2.5.3	<i>Struktura, vlastnosti micel</i>	34
2.5.4	<i>Klasifikace tenzidů</i>	34
2.5.4.1	<i>CTAB</i>	35
2.6	<i>Interakce polyelektrolyt-opačně nabitý tenzid</i>	35
2.6.1	<i>Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy</i>	37
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	39
3.1	<i>Měření anizotropie ustálené fluorescence</i>	39
3.2	<i>Měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence</i>	40
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1	<i>Materiály</i>	43
4.1.1	<i>Chemikálie</i>	43
4.1.2	<i>Přístroje a zařízení</i>	43
4.2	<i>Metody</i>	44
4.2.1	<i>Příprava zásobních roztoků</i>	44
4.2.2	<i>Příprava vzorků</i>	44
4.2.2.1	<i>Kapalné vzorky</i>	44
4.2.2.2	<i>Gelové vzorky</i>	45
4.2.3	<i>Vlastní měření – podmínky, nastavení přístrojů</i>	45
4.2.3.1	<i>Excitační a emisní spektra</i>	46
4.2.3.2	<i>Anizotropie ustálené fluorescence</i>	46
4.2.3.3	<i>Doba života</i>	46
4.2.3.4	<i>Časově-rozlišená anizotropie fluorescence</i>	46
4.2.4	<i>Vyhodnocení</i>	47
4.2.4.1	<i>Statistika</i>	47
4.2.4.2	<i>Doba života fluoroforu</i>	47
4.2.4.3	<i>Časově-rozlišená anizotropie fluorescence</i>	48
4.2.4.4	<i>Vyhodnocení mikroviskozity prostředí</i>	50
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
5.1	<i>Perylen ve směsi glycerol/voda</i>	51
5.1.1	<i>Doba života perylenu ve směsi glycerol/voda</i>	51
5.1.2	<i>Závislost anizotropie ustálené fluorescence na viskozitě homogenního prostředí...</i>	51
5.1.3	<i>Závislost průměrné rotační korelační doby na viskozitě homogenního prostředí ...</i>	52
5.2	<i>Rhodamin 6G ve směsi glycerol/voda</i>	53
5.2.1	<i>Doba života rhodaminu 6G ve směsi glycerol/voda</i>	53
5.2.2	<i>Závislost anizotropie ustálené fluorescence na viskozitě homogenního prostředí...</i>	53
5.2.3	<i>Závislost průměrné rotační korelační doby na viskozitě homogenního prostředí ...</i>	54
5.3	<i>Perylen v micelárních roztocích CTAB</i>	55
5.3.1	<i>Doba života perylenu</i>	56
5.3.2	<i>Excitační a emisní spektrum perylenu v micelárním roztoku</i>	56

5.3.3	<i>Anizotropie ustálené fluorescence</i>	57
5.3.4	<i>Časově-rozlišená fluorescence</i>	57
5.3.5	<i>Mikroviskozita micelárního jádra</i>	57
5.4	Sledování interakcí mezi hyaluronanem a CTAB v kapalně fázi.....	59
5.4.1	<i>Vznik hydrofobních domén</i>	59
5.4.1.1	Vodné prostředí.....	59
5.4.1.2	Prostředí 0,15M NaCl.....	61
5.4.2	<i>Vznik hydrofobních domén – doba života perylenu</i>	62
5.4.2.1	Vodné prostředí.....	62
5.4.2.2	Prostředí 0,15M NaCl.....	62
5.4.3	<i>Mikroviskozita hydrofobních domén</i>	63
5.5	Kondenzovaná fáze v systému Hya-CTAB-NaCl.....	65
5.5.1	<i>Hydrofobní domény v průběhu stárnutí gelu</i>	65
5.5.1.1	Doba života perylenu.....	65
5.5.1.2	Anizotropie ustálené fluorescence perylenu.....	65
5.5.1.3	Časově-rozlišená anizotropie perylenu.....	65
5.5.2	<i>Hydrofilní část gelu v průběhu jeho stárnutí</i>	66
5.5.2.1	Doba života rhodaminu 6G.....	66
5.5.2.2	Anizotropie ustálené fluorescence rhodaminu 6G.....	66
5.5.2.3	Časově-rozlišená anizotropie rhodaminu 6G.....	66
5.5.3	<i>Shrnutí mikroviskozity jednotlivých částí gelu v průběhu jeho stárnutí</i>	67
5.5.4	<i>Gelová fáze v porovnání se supernatantem</i>	68
6	ZÁVĚR	70
7	LITERATURA	72
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	79
8.1	Seznam zkratk.....	79
8.2	Seznam symbolů.....	80
9	PŘÍLOHY	82
9.1	Příloha 1 – průběh gelace.....	82
9.2	Příloha 2 – měření gelových vzorků na Fluorologu.....	83
9.3	Příloha 3 – nástavec na gelové vzorky, Fluorocube.....	83

1 ÚVOD

Měření anizotropie fluorescence, ať už v ustáleném nebo časově rozlišeném módu patří mezi perspektivní fluorescenční techniky a využívá se k získávání informací v široké škále aplikací.

Jelikož v dnešní době neustále narůstá počet pacientů trpících nádorovým onemocněním, snaží se výzkumníci z celého světa vytvořit a uvést do praxe účinnější, ale i zároveň šetrnější způsob léčby než ty, které se doposud využívají. Jako jedna z možností se nabízí použití cíleného nosiče léčiv, který by umožňoval dosažení a udržení optimální koncentrace léčiva přímo v postiženém místě na co nejdélší dobu. Díky cílené distribuci by došlo ke snížení toxicity cytostatika vůči zdravým buňkám a taktéž ke snížení potřebných dávek léčiva, což by vedlo k výraznému snížení rizika nežádoucích vedlejších účinků léčby na organismus.

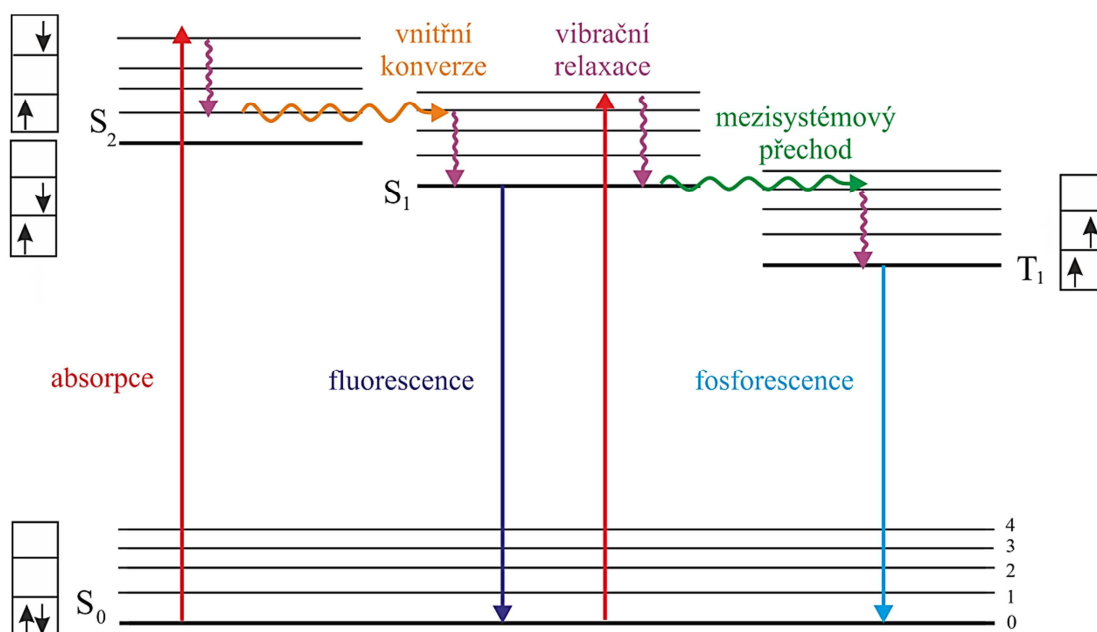
V rámci přispění alespoň malým dílem k této problematice byla metoda anizotropie fluorescence v této diplomové práci použita ke studiu mikroviskozitních vlastností kapalných a kondenzovaných systémů založených na interakcích mezi hyaluronanem a kationtovým tenzidem cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB), které by mohly být potenciálně využitelné právě k cílené distribuci cytostatika. Hyaluronan, látka tělu vlastní a jinak prospěšná, je nádorovými buňkami „přitahována“ vlivem hojně se na nich vyskytujících specifických receptorů. Hyaluronan tyto buňky obalí a vyživuje, což jim umožní přežít a rozmnožovat se. Rostoucím tumorem jsou pak přitahovány další a další molekuly hyaluronanu. Tento fakt dal vzniknout myšlence použít ho jako základní součást cíleného nosiče cytostatika. Bohužel, řetězec hyaluronanu není sám o sobě schopen nést hydrofobní léčivo a proto je potřeba další látky, která má schopnost navázat se na jeho řetězec a zároveň vytvořit takové prostředí, ve kterém by se dané léčivo mohlo solubilizovat. Tuto schopnost mají právě tenzidy díky své amfifilní struktuře molekuly.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je jev, při kterém dochází vlivem absorpce primárního záření o vhodné vlnové délce k excitaci molekuly, přičemž následuje její de-excitace spojená s emisí sekundárního záření v ultrafialové či viditelné oblasti.

Při absorpci vhodného elektromagnetického záření (UV, VIS) molekulou přejde její valenční elektron ze základní singletové hladiny do stavu s vyšší energií. Z kvantově-mechanického hlediska je nejpravděpodobnější vyšší **singletový stav**, ve kterém jsou spiny dvojice elektronů antiparalelní. Naproti tomu u **tripletových stavů** jsou spiny elektronů orientovány paralelně. Z vyššího energetického stavu se následně molekula deexcituje pomocí různých deaktivčních procesů. Ze spektroskopického hlediska jsou důležitější **zářivé přechody**, při kterých dochází k emisi světelného kvanta. Podle uplatněného typu zářivého přechodu pak rozdělujeme fotoluminiscenci na **fluorescenci**, **fosforescenci** a **zpožděnou fluorescenci**. Dle Kashova pravidla zářivé přechody nastávají z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu. Pokud se elektron nachází na vyšší vibrační hladině, dochází nejprve k relaxaci vibrační energie, případně k vnitřní konverzi, což jsou velmi rychlé **nezářivé procesy**. Při vnitřní konverzi elektron přejde mezi elektronovými stavy se stejnou spinovou multiplicitou (např. $S_2 \rightarrow S_1$). K nezářivým procesům patří i mezisystémový přechod, při kterém elektron vykoná zakázaný přechod mezi stavy s odlišnou multiplicitou (např. $S_1 \rightarrow T_1$). U nezářivých procesů, probíhajících mezi jednotlivými rotačně-vibračními hladinami různých elektronových stavů, se celková energie systému na rozdíl od zářivých procesů nemění.



Obr. 1 Jabloňského diagram – schématická reprezentace elektronových energetických hladin v molekule a přechodů mezi nimi.

2.1.1 Fluorescence

Při fluorescenci dochází ke spinově povolenému, tudíž i velmi rychlému, zářivému přechodu elektronu obvykle z rovnovážné hladiny S_1 do některé z vibračních hladin stavu základního S_0 . Řádově se jedná o dobu v rozmezí nanosekund.

Fluorescence se řídí několika hlavními pravidly a zákony [1, 2, 3]. Prvním z nich je **Stokesův zákon**, který říká, že vlnová délka emise při luminiscenci je větší nebo stejná než vlnová délka excitačního světla, z čehož vyplývá, že emisní spektrum fluoroforu je oproti absorpčnímu posunuto k delším vlnovým délkám (nižší energie). Je to způsobeno tím, že se část energie vytratí při přechodu z vyšších vibračních hladin do nejnižší vibrační hladiny při vibrační relaxaci. Výsledný posuv spekter se nazývá Stokesův posuv (viz Obr. 2).

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

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

2.1.2 Fosforescence

Z excitovaného singletového stavu S_1 může elektron přejít mezisystémovým přechodem na některou z energeticky odpovídajících vibračních hladin tripletového stavu T_1 . Vibrační relaxací se potom dostane na jeho nejnižší vibrační hladinu, odkud přejde do stavu základního S_0 za současného vyzáření fotonu. Aby byl při tomto přechodu dodržen Pauliho vylučovací princip, musí dojít ke změně orientace elektronového spinu, což způsobí, že doba záření při fosforescenci je daleko delší než u fluorescence. Typicky se jedná o čas v rozmezí 10^{-3} – 10^0 ms [2]. Fosforescence je méně častá než fluorescence. Bývá pozorována při nižších teplotách, u nichž je menší pravděpodobnost nezářivých procesů, které jí konkurují.

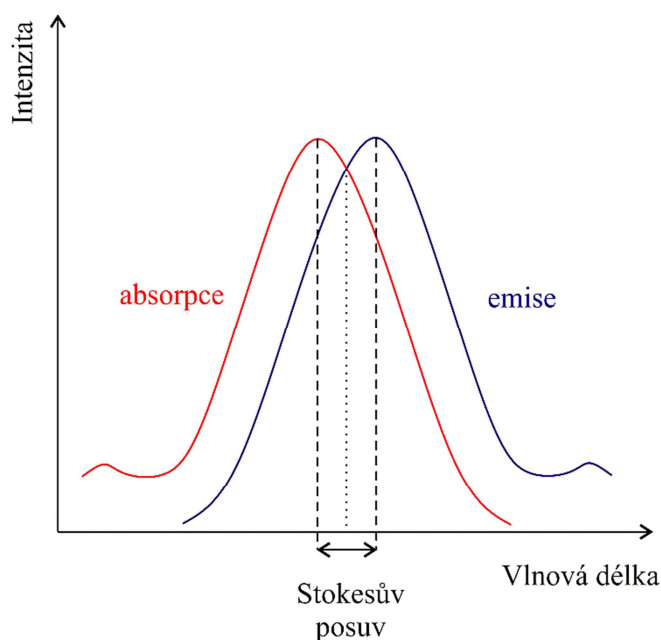
2.1.3 Zpožděná fluorescence

O zpožděné fluorescenci hovoříme, pokud excitovaný elektron přejde mezisystémovým přechodem mezi stavy S_1 a T_1 , v rámci stavu T_1 se excituje do vyšší vibrační hladiny (převážně díky teplu) a poté se vrátí reverzním mezisystémovým přechodem zpět do singletového stavu S_1 , z jehož nejnižší vibrační hladiny se zářivým přechodem dostane do základního stavu S_0 . Doba dohasínání v tomto případě zhruba odpovídá době dohasínání fosforescence měřené za stejných podmínek a emisní spektrum je totožné se spektrem při okamžité fluorescenci.

2.1.4 Excitační a emisní spektra molekul

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

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



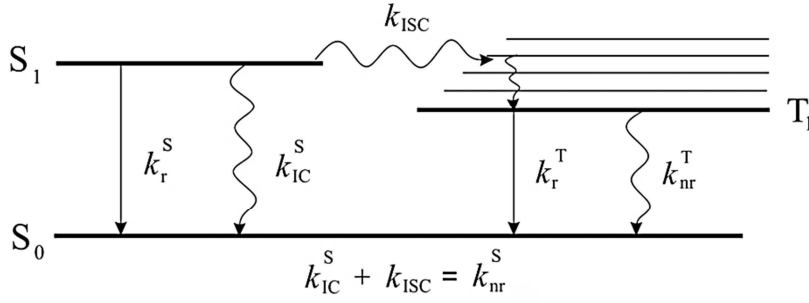
Obr. 2 Znárodnění Stokesova posuvu a zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem fluorescence.

2.1.5 Doba života

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

Na následujícím Obr. 3 jsou schematicky shrnuty rychlostní konstanty možných procesů depopulace excitovaných stavů. Jednotlivé indexy znamenají:

r – zářivý přechod	IC – vnitřní konverze	S – přechod $S_1 \rightarrow S_0$
nr – nezářivý přechod	ICS – mezisystémový přechod	T – přechod $T_1 \rightarrow S_0$



Obr. 3 Schématické znázornění depopulace excitovaných stavů [3].

Po excitaci velmi krátkým pulzem záření určitý počet molekul fluoroforu přejde do vyššího energetického stavu díky absorpci fotonu. Posléze se navrátí do základního stavu S_0 zářivými či nezářivými přechody. Tento proces může být pro molekulu fluoroforu „A“ popsán rovnicí:

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

Po integraci rovnice (1) získáme vztah:

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

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

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

Intenzita fluorescence i_F po excitaci velmi krátkým pulzem záření v čase $t = 0$ je v každém okamžiku přímo úměrná koncentraci excitovaných molekul $[A^*]$, přičemž faktorem úměrnosti je rychlostní konstanta zářivé deexcitace k_r^S :

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

2.1.6 Kvantový výtěžek

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

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

Jinými slovy lze kvantový výtěžek vyjádřit jako poměr počtu emitovaných fotonů vzhledem k počtu fotonů absorbovaných.

S ohledem na rovnici (4) a její integraci přes celý průběh dohasínání dostaneme pro kvantový výtěžek výraz:

$$\frac{1}{[A^*]_0} \int_0^{\infty} i_F(t) dt = k_r^S \tau_s = \Phi_F. \quad (6)$$

Pokud zavedeme zářivou dobu života τ_r jako $1/k_r^S$, pak můžeme kvantový výtěžek vyjádřit rovnicí:

$$\Phi_F = \frac{\tau_s}{\tau_r}. \quad (7)$$

2.1.7 Fluorescenční sondy

Pomocí fluorescenčních sond můžeme získat velké množství informací v široké škále odvětví. Většinou se pomocí nich studují fyzikálně-chemické, biochemické nebo biologické systémy. Obecně lze tyto sondy rozdělit do tří skupin: vnitřní sondy, kovalentně vázané sondy neboli fluorescenční značky a fyzikálně vázané fluorescenční sondy.

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

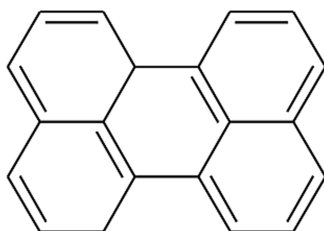
Fluorescenčními značkami jsou nevlastní fluorofory, které se kovalentně váží na danou zkoumanou látku. Mohou sloužit ke značení určité molekuly, což pak dovoluje její následné zobrazování, lokaci v buňce nebo sledování jejich určitých vlastností, například difúzních. Příkladem mohou být fluorescein-5-isothiokynát (FITC) a tetramethylrhodamin-5-isothiokynát (TRITC), které se používají v imunofluorescenčních metodách.

Poslední skupinou jsou **fyzikálně vázané fluorescenční sondy**. Většinou se jedná o malé organické molekuly, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a jejich fotofyzikální chování je silně závislé na vlastnostech prostředí, ve kterém se nacházejí (pH, polarita, iontová síla, viskozita, tlak, teplota, přítomnost zřáhšeče a další). Vzhledem k nepřebornému množství sond s rozdílnými vlastnostmi, které umožňují získat určité informace o daném systému, je volba vhodné fluorescenční sondy klíčovou součástí experimentu.

2.1.7.1 Perylen

Perylen je jednou z fyzikálně vázaných fluorescenčních sond, které mohou být využity k anizotropnímu měření. Jedná se o polycyklický aromatický uhlovodík, jehož molekula je tvořena dvěma molekulami naftalenu spojenými vazbami uhlík-uhlík mezi 1. a 8. pozicemi.

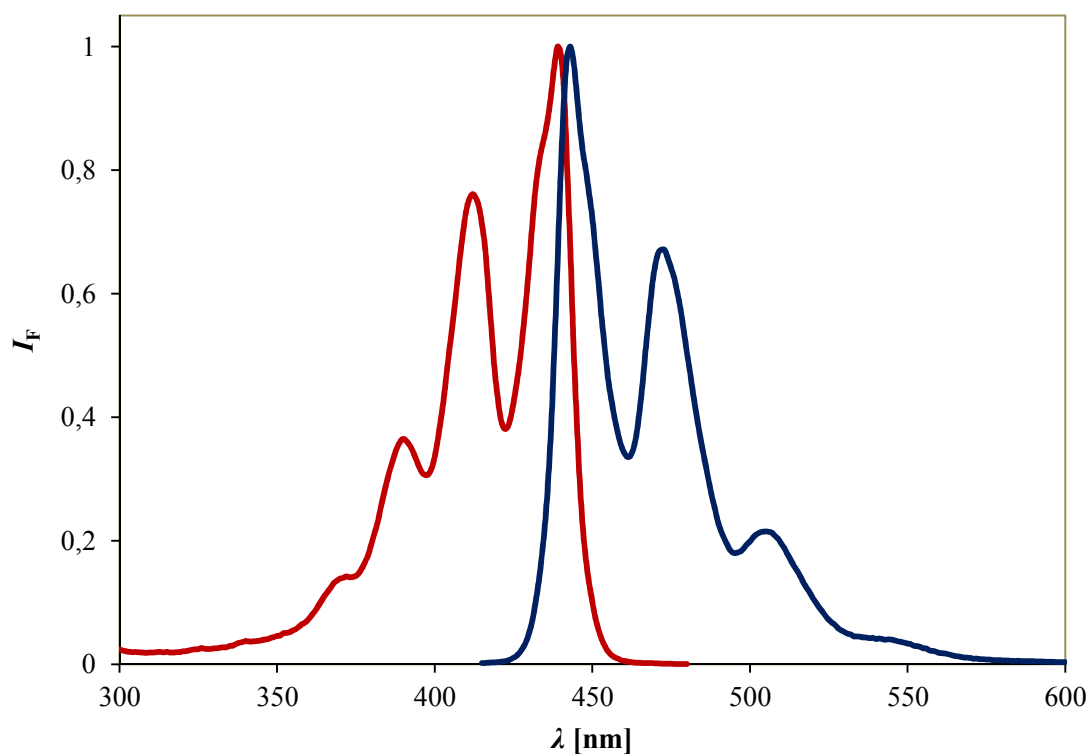
Perylen je dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědel, vhodná jsou pro něj nepolární rozpouštědla s nízkou permitivitou jako je aceton a *n*-heptan. Ve vodě je téměř nerozpustný, ale může být solubilizován v micelárním roztoku. Jeho luminiscenční vlastnosti jsou přímo ovlivňovány jeho rozpustností v daném prostředí, proto se perylen zejména využívá jako fluorescenční sonda pro fosfolipidické membrány. Má vysoký kvantový výtěžek fluorescence, vysokou tepelnou i fotochemickou stabilitu.



Obr. 4 Molekula perylenu.

Perylen v mikrokrytalické formě vytváří v excitovaném stavu excimery s charakteristickou emisí v červené oblasti viditelného spektra ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) a dobou života fluorescence 65 ns [4, 5]. V rozpuštěné formě při nízkých koncentracích perylen excimery nevytváří.

Excitační a emisní spektrum perylenu v roztoku (viz Obr. 5) ukazuje významné struktury v závislosti na jednotlivých vibračních hladinách základního a excitovaného stavu a platí mezi nimi zákon zrcadlové symetrie.

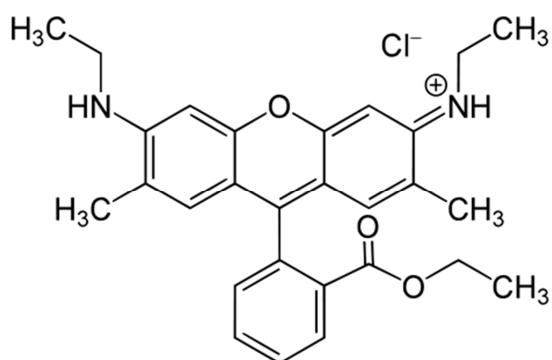


Obr. 5 Normalizované excitační a emisní spektrum perylenu (o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) v micelárním roztoku CTAB (koncentrace 2 mM). Červeně je znázorněno excitační spektrum, modře emisní.

Molekula perylenu má planární diskovitý tvar, u něhož se předpokládá, že rotace v rovině bude výrazně rychlejší než rotace mimo rovinu, při které musí odhrnovat molekuly rozpouštědla. Chová se tedy jako anizotropní rotor.

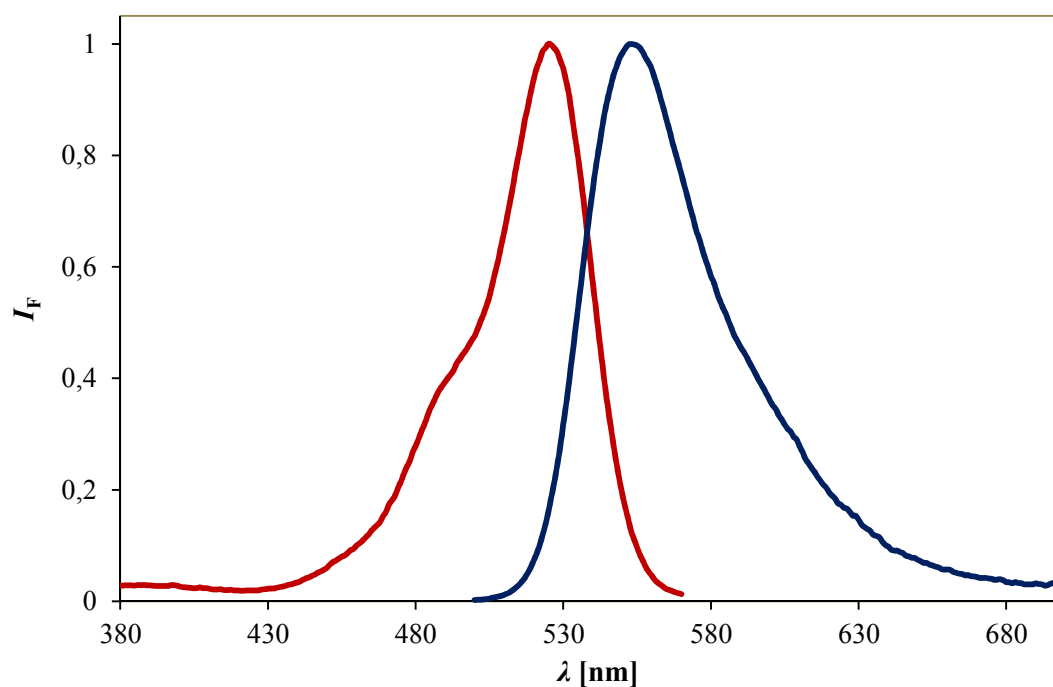
2.1.7.2 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G je vysoce fluoreskující barvivo patřící do skupiny rhodaminů, jejichž struktura je založená na heterocyklické sloučenině fluoronu (viz Obr. 6). Obecně lze rhodaminy využít jako fluorescenční sondy jak fyzikálně, tak i kovalentně vázané. Používají se především v biotechnologických aplikacích jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, fluorescenční korelační spektroskopie a další [6].



Obr. 6 Molekula rhodaminu 6G.

Rhodamin 6G je rozpustný ve vodě a alkoholech (methanol, ethanol, propanol, butanol, isopropylalkohol, methoxyethanol, ethoxyethanol, monoethylenglykol, diethylenglykol, triethylenglykol, polyethylenglykol atd.). Jeho výhodou je fakt, že na rozdíl od fluoresceinu nejsou jeho fotofyzikální charakteristiky závislé na pH, navíc je i odolnější vůči fotovybělování.



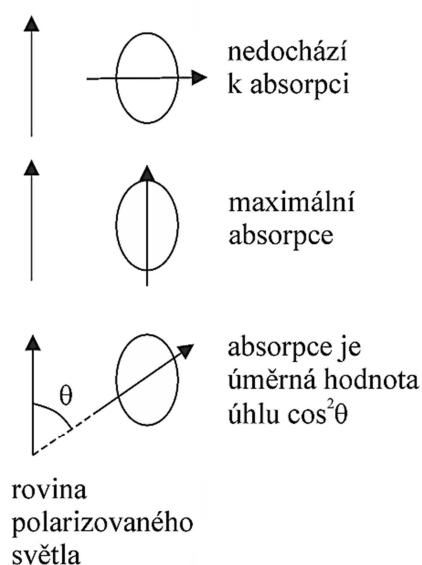
Obr. 7 Normalizované excitační a emisní spektrum rhodaminu 6G (koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ M) ve vodě. Červeně je znázorněno excitační spektrum, modře spektrum emisní.

Rhodamin 6G má ve vodném prostředí při vyšších koncentracích (od $1 \cdot 10^{-5}$ M výše) tendenci vytvářet dimery, jejichž emise má maximum oblasti mezi 560–585 nm. V alkoholech rhodamin dimery nevytváří, převládá v nich tedy monomerová emise s emisním maximem kolem 550 nm [7, 8, 9].

2.2 Polarizovaná fluorescence, anizotropie fluorescence

Měření ustálené (*steady-state*) i časově rozlišené (*time-resolved*) lineárně polarizované fluorescence patří mezi významné metody pro stanovování fyzikálních a chemických molekulárních vlastností a nalézá využití v širokém poli aplikací.

Toto měření je založeno na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem. Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, pak se přednostně excitují ty molekuly fluoroforů, které mají vektor absorpčního přechodového momentu orientován v rovině elektrického vektoru budícího záření. Shoda elektrického vektoru záření a absorpčního přechodového momentu fluoroforu nemusí být přesná, excitovat se mohou i ty molekuly, které mají nenulový průmět absorpčního momentu do směru polarizace záření. Pravděpodobnost absorpce fotonu je pak úměrná $\cos^2\theta$, kde θ je úhel, který svírá dipólový moment přechodu molekuly s rovinou polarizace excitujícího záření. Tento jev se nazývá **fotoselekce** (viz Obr. 8).



Obr. 8 Fotoselekce [3].

V homogenním roztoku jsou molekuly fluoroforů náhodně orientovány, tudíž po ozáření vzorku polarizovaným světlem dojde k selektivní excitaci, což má za následek vznik částečně orientované populace fluoroforů, které mají absorpční přechodové momenty orientovány podél elektrického vektoru polarizovaného záření.

Absorpční a emisní přechodové momenty svírají určitý úhel s molekulární osou fluoroforu (mohou být i oba orientovány ve stejném směru). Vlivem toho, že molekula fluoroforu během doby života fluorescence vykoná mnoho pohybů – převážně rotačních, dochází k tomu, že

emitované záření již není ve shodě se zářením absorbovaným, ale je pootočené o určitý úhel – nastává **depolarizace**. Toto pootočení je závislé na rozsahu a rychlosti rotační difúze, která souvisí s viskozitou rozpouštědla a taktéž s tvarem a velikostí rotující molekuly. Pokud bude rotace molekuly fluoroforu brzděna prostředím s vysokou viskozitou, naměříme velmi malou míru depolarizace, naopak pro malou molekulu ve fluidním prostředí bude emise záření depolarizována úplně a hodnota naměřené anizotropie se bude blížit k nule.

2.2.1 Definice a základní vztahy

Anizotropie fluorescence (r) se používá pro vyjádření míry polarizace fluorescence založené na fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem v opticky izotropním vzorku [3].

2.2.1.1 Ustálená anizotropie

Pro kontinuální excitaci můžeme hodnotu ustálené anizotropie \bar{r} vyjádřit rovnicí:

$$\bar{r} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}}, \quad (8)$$

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

2.2.1.2 Polarizační stupeň

Dalším vyjádření polarizace fluorescence je tzv. polarizační stupeň \bar{p} , jenž je roven:

$$\bar{p} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (9)$$

Dle rovnic (8) a (9) existuje mezi \bar{p} a \bar{r} přepočtení vztah:

$$\bar{r} = \frac{2\bar{p}}{3 - \bar{p}}. \quad (10)$$

Nicméně pro vyjádření polarizace emise se častěji využívá anizotropie díky tomu, že je normalizována dle celkové intenzity fluorescence, která je rovna $I_T = I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}$, tudíž její hodnota nezávisí od koncentrace fluoroforu.

2.2.1.3 Časově-rozlišená anizotropie

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

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)}, \quad (11)$$

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

$$i_{\parallel}(t) = \frac{i(t)}{3} [1 + 2r(t)], \quad (12a)$$

$$i_{\perp}(t) = \frac{i(t)}{3} [1 - r(t)]. \quad (12b)$$

Vztah mezi ustálenou a časově-rozlišenou anizotropií je dán:

$$\bar{r} = \frac{\int_0^{\infty} r(t)i(t)dt}{\int_0^{\infty} i(t)dt}. \quad (13)$$

2.2.1.4 Aditivní zákon anizotropie

Celková anizotropie směsi, ve které jsou jednotlivé složky i charakterizovány hodnotou anizotropie r_i a přispívají k celkové intenzitě fluorescence frakcí $f_i = I_i / I$, je rovna součtu individuálních anizotropií:

$$r = \sum_i f_i r_i. \quad (14)$$

Tento vztah platí jak pro ustálenou, tak časově-rozlišenou anizotropii.

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

$$f_i(t) = \frac{a_i \exp(-t / \tau_i)}{I(t)}, \quad (15)$$

kde $I(t)$ je rovno:

$$I(t) = \sum_i a_i \exp(-t / \tau_i). \quad (16)$$

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

$$r(t) = \sum_i \frac{a_i \exp(-t / \tau_i)}{I(t)} r_i(t). \quad (17)$$

Z rovnice (17) vyplývá, že v čase t je hodnota anizotropie závislá na relativním podílu z celkové intenzity fluorescence ve stejném čase. Tento fakt potvrzuje i definice emisní anizotropie založená na praktickém měření celkových komponent I_{\parallel} a I_{\perp} . Hodnota $r(t)$ by tedy měla být vnímána spíše jako „technická“ nebo „zřejmá“ anizotropie, jelikož v sobě neodráží celkovou orientaci relaxace po fotoselekcii, jak je tomu v případě populace jednoho druhu fluoroforu.

2.2.1.5 *Fundamentální anizotropie*

Jedná se o teoretickou hodnotu anizotropie při absenci veškerého pohybu fluoroforu. V praxi je rotačnímu pohybu molekuly bráněno v rigidním prostředí. Naměřená hodnota anizotropie, označovaná jako **limitní anizotropie**, je pak vždy o něco menší než vypočítaná teoretická hodnota pro daný fluorofor.

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

$$r_0 = \frac{1}{5}(3\cos^2\beta - 1). \quad (18)$$

Maximální hodnoty $r_0 = 0,4$ pak nabývá pro $\beta = 0^\circ$ (paralelní přechodové momenty) a minimální hodnoty $r_0 = -0,2$ pro $\beta = 90^\circ$ (kolmé přechodové momenty).

2.2.2 **Měření anizotropie fluorescence**

2.2.2.1 *Princip měření ustálené anizotropie fluorescence*

Běžně se používají dva typy měření (viz Obr. 9). Častější z nich je tzv. L-formát, při kterém se používá pouze jeden emisní kanál, a jednotlivé polarizované složky emise jsou detekovány postupně. Druhým je tzv. T-formát, ve kterém jsou kolmé a paralelní složky emise pozorovány současně prostřednictvím samostatných kanálů, což vyžaduje jejich stejnou odezvu.

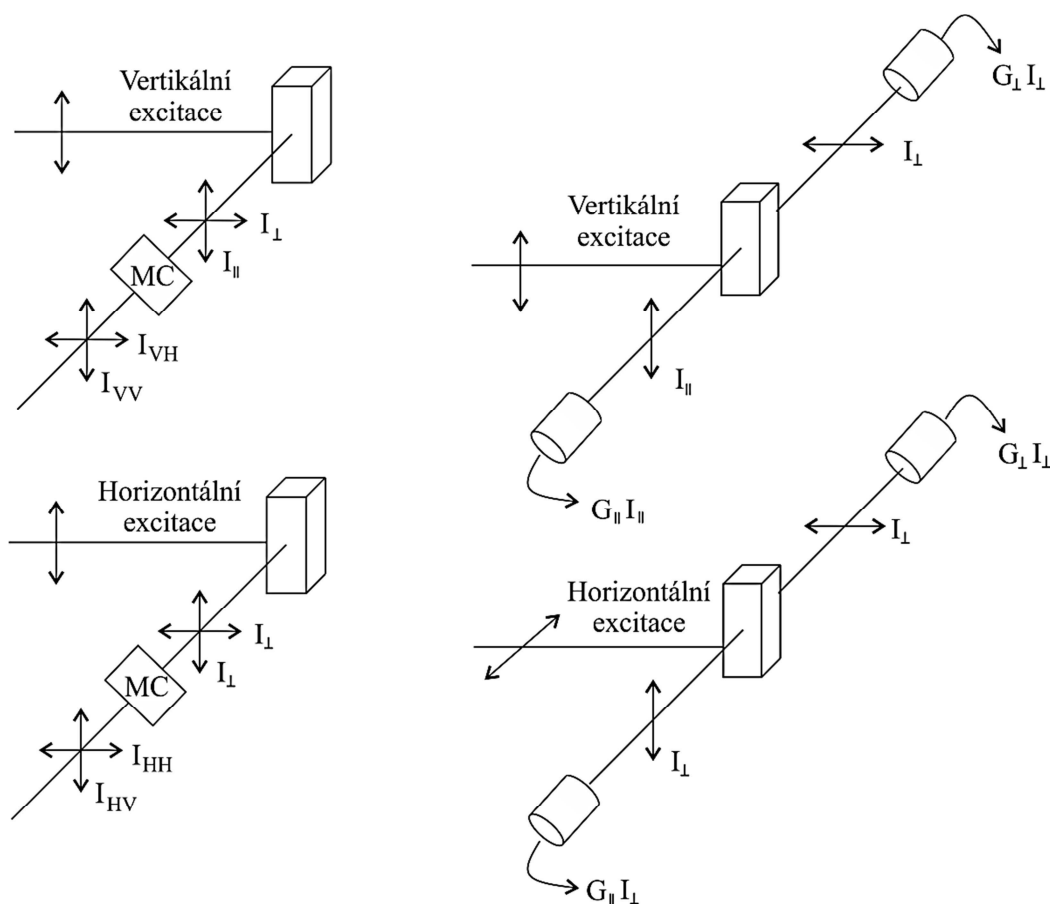
V **L-formátu** je vzorek postupně excitován různě polarizovaným zářením, přičemž emise je sledována pomocí monochromátoru, který je obvykle umístěn kolmo na budící paprsek. Konkrétně se jedná o čtyři měření při nastavení polarizátorů – I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} a I_{HH} , přičemž poslední dvě měření souvisí s G-faktorem (viz 2.2.2.2), který při zachování všech optických parametrů přístroje není třeba pokaždé měřit.

U spektrofluorimetru v **T-formátu** se měření provádí následovně. Nejprve je excitační polarizátor nastaven ve vertikální orientaci pro měření paralelních a kolmých signálů (R_V), poté je přestaven na orientaci horizontální (R_H). Emisní polarizátory mají po celou dobu měření stejnou orientaci. Poměr R_V/R_H pak dá následující rovnici:

$$\frac{R_V}{R_H} = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}. \quad (19)$$

Pomocí něj pak hodnotu anizotropie fluorescence vypočítáme ze vztahu:

$$r = \frac{I_{\parallel} / I_{\perp} - 1}{I_{\parallel} / I_{\perp} + 2}. \quad (20)$$



Obr. 9 Schéma měření ustálené anizotropie fluorescence. Vlevo – L-formát, vpravo – T-formát.

2.2.2.2 G-faktor

Pro vertikální a horizontální složky polarizované emise se reakce optických prvků a detektoru záření může velmi lišit. Tento rozdíl v citlivosti detekčního kanálu lze (v každé emisní vlnové délce) korigovat G-faktorem, který představuje poměr citlivosti detekčního systému pro vertikálně a horizontálně polarizované světlo.

Anizotropie ustálené fluorescence pak může být spočítána dle rovnice:

$$r = \frac{I_{VV} - G(\lambda_{em})I_{VH}}{I_{VV} + 2G(\lambda_{em})I_{VH}}. \quad (21)$$

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

$$G(\lambda_{em}) = \frac{I_{HV}(\lambda_{em})}{I_{HH}(\lambda_{em})}. \quad (22)$$

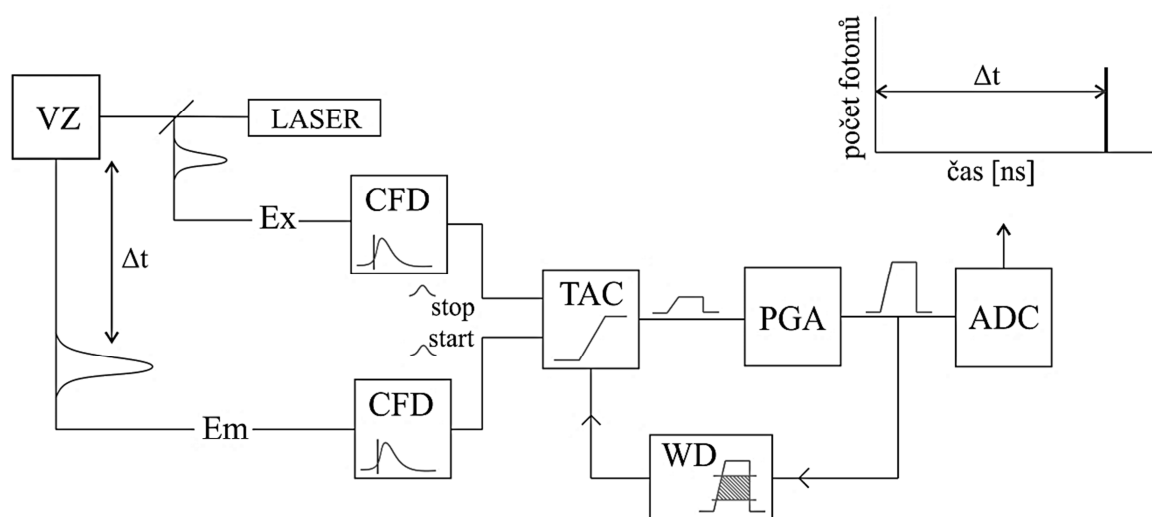
2.2.2.3 Magický úhel

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

2.2.2.4 Princip měření časově-rozlišené anizotropie – TCSPC metoda

V kapalném vzorku se po excitaci lineárně polarizovaným zářením vzniklá jednoosá distribuce excitovaných molekul stává náhodnou vlivem rotační difúze – nastává depolarizace fluorescence. V případě volného otáčení molekul fluoroforu se anizotropie fluorescence rozkládá na nulu, zatímco pokud je rotaci fluoroforu bráněno, dosáhne anizotropie časově nezávislé hodnoty r_{∞} , tzv. residuální anizotropie. Analýza časového rozpadu anizotropie pak poskytuje přímé informace o orientační dynamice, která závisí na velikosti a tvaru rotujících částic a fluiditě mikroprostředí.

Pod zkratkou TCSPC se ukrývá „time-correlated single photon counting“, což je metoda časově korelovaného čítání fotonů, která patří pod pulzní časově-rozlišené techniky a využívá se především pro stanovení doby života, ale je vhodná i pro další měření, například časově-rozlišenou anizotropii fluorescence či časově-rozlišená spektra. Její princip je založen na faktu, že pravděpodobnost detekce fotonu v čase t po excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v tomto čase. Na Obr. 10 je schematicky vyobrazen princip měření pomocí této metody.



Obr. 10 Princip měření metodou TCSPC – dle [2]. Jednotlivé zkratky jsou vysvětleny v odstavci níže.

Nejprve je vzorek (VZ) excitován pulzem záření, přičemž na jeden excitační pulz připadá méně jak jeden detekovaný foton – typicky je detekován jeden foton zhruba na sto excitačních pulzů. Excitační pulz zároveň posílá i signál elektronice, který jde do prvního kanálu přes diskriminátor (CFD – constant function discriminator), který přesně změří čas jeho příchodu. Dál signál putuje do konvertoru času na amplitudu (TAC – time-to-amplitude convertor), ve kterém spustí růst napětí lineárně s časem. Mezitím excitovaný vzorek vykazuje fluorescenci a detekované fotony jsou zaznamenávány druhým kanálem. V diskriminátoru je pak určen přesný čas jejich dopadu. Z něho jde signál dál do konvertoru TAC, ve kterém svým příchodem zastaví nárůst napětí. Dosažená hodnota napětí je pak úměrná časovému zpoždění mezi excitačním a emisním signálem. Napětí je pak podle potřeby zesíleno v zesilovači (PGA – programmable gain amplifier) a převedeno na číselnou hodnotu v analogově-digitálním konvertoru (ADC – analog-to-digital convertor). Kvůli minimalizaci falešných hodnot signálu je napětí omezeno určitým rozsahem hodnot. Jestliže signál nespadá do tohoto rozsahu, je potlačen pomocí WD diskriminátoru (window discriminator). Napětí převedené na digitální hodnotu je uloženo jako jedna událost s naměřenou časovou prodlevou. Tento proces se neustále opakuje do dosažení určeného počtu detekovaných fotonů. Pro správné vyhodnocení poklesu intenzity fluorescence je potřeba minimálně 4 000 fotonů [2, 3].

Při měření anizotropie se naměří jednotlivé dohasínací křivky fluorescence pro paralelní a kolmou orientaci polarizátorů. Z naměřených časových závislostí vertikálně a horizontálně polarizované emise se časová závislost anizotropie fluorescence vypočítá dle vztahu (11).

2.2.3 Použití měření anizotropie fluorescence

Tato metoda nachází uplatnění v širokém poli aplikací. Při spektroskopických experimentech lze pomocí anizotropie fluorescence studovat excitační polarizační spektra – rozdíly mezi jednotlivými excitovanými stavy molekuly. Dále můžeme pomocí této metody studovat problematiku polymerů, konkrétně dynamiku polymerních řetězců, lokální viskozitu polymerního prostředí, orientaci molekul v pevných polymerech či migraci excitační energie podél polymerních řetězců. Při sledování micelárních systémů lze pomocí ní stanovit mikroviskozitu uvnitř micel, jejich fluiditu a některé další parametry. Také se využívá ve výzkumu biologických membrán, konkrétně ke studiu jejich vlastností jako je rigidita, ke stanovování teploty jejich fázového přechodu nebo k pozorování změn vlastností membrány po přidavku aditiv. V molekulární biologii se využívá ke stanovení velikosti a tvaru proteinů, jejich dynamických vlastností, denaturaci, dále ke sledování interakcí mezi proteiny nebo jejich asociací s dalšími molekulami, taktéž ke studiu systémů protein-DNA či pro stanovení flexibility řetězců nukleových kyselin. Anizotropie fluorescence nachází i uplatnění v imunologii a imunoanalýze, kde se využívá ke sledování reakcí mezi antigenem a protilátkou.

2.3 Mikroviskozita, fluidita, jejich stanovení pomocí fluorescenčních sond

2.3.1 Viskozita, její význam na mikroskopické úrovni

V makroskopickém měřítku je viskozita brána jako fyzikální veličina, která udává poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami při proudění skutečné kapaliny. V 17. století se jí jako první zabýval Isaac Newton, který popsal vztah mezi napětím a rychlostí deformace jako přímou úměru, tzn.

$$\tau = \eta \frac{dv}{dx}, \quad (23)$$

kde τ je tečné napětí tekutiny, $\frac{dv}{dx}$ je gradient rychlosti toku ve směru kolmém na směr proudění a η je součinitel viskozity (vnitřního tření) neboli dynamická viskozita.

V 19. století G. G. Stokes vytvořil vztah pro odporovou sílu proudící kapaliny F působící na kouli o poloměru r :

$$F = 6\pi\eta r v, \quad (24)$$

kde η je dynamická viskozita kapaliny a v je její konstantní rychlost proudění. Součin $6\pi\eta r$ je označován jako tzv. **třecí koeficient**, který je roven poměru viskozitních sil a rychlosti.

V roce 1906 pak Albert Einstein vytvořil práci zabývající se difúzí částic, ve které definoval difúzní koeficient koule Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D = \frac{kT}{\xi}, \quad (25)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a ξ značí třecí koeficient. Pro rotační a translační koeficienty pak platí vztahy:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (26)$$

$$D_r = \frac{kT}{8\pi\eta r^3} = \frac{kT}{6\eta V}, \quad (27)$$

kde r je hydrodynamický poloměr koule a V je její hydrodynamický objem.

Ve všech fluorescenčních technikách, umožňujících vyhodnocení fluidity mikroprostředí pomocí fluorescenční sondy, je základní fyzikální veličinou difúzní koeficient (buď rotační, nebo translační) odrážející viskozitní zátěž prostředí na molekulu sondy. Nicméně neexistuje vyhovující vztah mezi tímto difúzním koeficientem a viskozitou prostředí, ačkoliv jich bylo navrženo velké množství. Rovnice (26) a (27) platí jen pro pevné koule makroskopického měřítko, za které fluorescenční sondu považovat nelze, především díky velikosti její molekuly, která bývá stejně velká nebo menší než molekuly tvořící okolní prostředí, které se má pomocí ní charakterizovat. Problém také vzniká v případě organizovaných soustav, například u micelárních systémů, biologických membrán apod., které nejsou izotropní.

Z těchto faktů vyplývá, že u viskozity, jakožto makroskopického parametru, nemůžeme pomocí fluorescenčních sond získat její absolutní hodnotu [3].

2.3.2 Pojem mikroviskozita, ekvivalentní viskozita

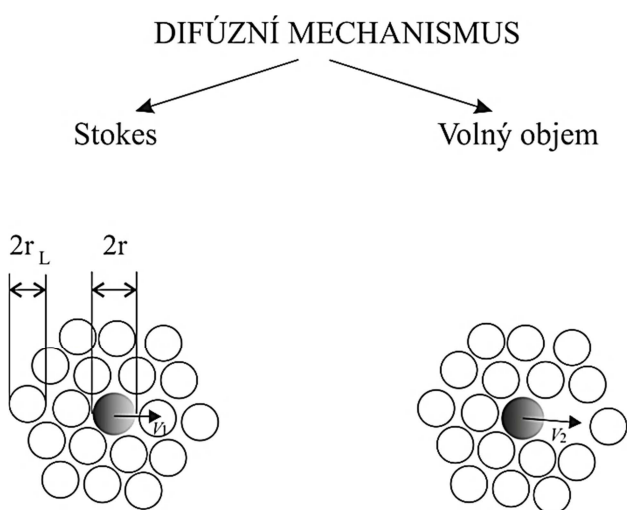
Pojem „mikroviskozita“ je často používán, ačkoliv nemůžeme pomocí fluorescenčních sond opět stanovit její absolutní hodnotu, jako tomu je u viskozity. Proto nejlepším vyjádřením výsledků měření je tzv. **ekvivalentní viskozita**, která odpovídá viskozitě homogenního prostředí, ze kterého by měla použitá fluorescenční sonda stejnou odezvu jako při měření daného mikroprostředí. Problémem je volba referenčního rozpouštědla z toho důvodu, že se odezva sondy může ve stejně viskózních rozpouštědlech lišit v závislosti na jejich chemické povaze.

Existují různé modifikace Einstein-Stokesova vztahu, které zohledňují mikroskopické vlivy (tvar, volný objem, interakce mezi rozpouštědlem a sondou atd.). Obecně lze pak pro mikroprostředí přepsat rovnici (27) do tvaru:

$$D_r = \frac{kT}{6\eta V s g}, \quad (28)$$

kde s je vazebný faktor a g je tvarový faktor. V případě nabitých molekul by měly být do výsledné rovnice pro difúzní koeficient zavedeny i další faktory, například třecí síla vzniklá indukovanou polarizací okolních molekul rozpouštědla.

Další mikroskopický přístup k problému viskozity vyvinuli Gierer a Wirtz [3]. Jejich teorie bere v úvahu konečnou tloušťku rozpouštědla a existenci otvorů mezi jeho molekulami (tzv. volný objem). Fluorescenční sonda se totiž v prostředí může pohybovat dvěma různými mechanismy (viz Obr. 11). Prvním z nich je klasický Stokesův mechanismus (difúzní proces probíhá s posunem molekul rozpouštědla), druhým je Giererův mechanismus, který popisuje volnou objemovou difúzi, při které se rozpuštěná molekula stěhuje do děr mezi molekulami rozpouštědla.



Obr. 11 Difúzní translační procesy. Šedě je znázorněna rozpuštěná molekula, bíle molekuly rozpouštědla – dle [3].

Na základě těchto mechanismů pak určili pro translační difúzní koeficient na molekulární úrovni následující vztah:

$$D = \frac{kT}{\xi_{micro}}, \quad (29)$$

kde ξ_{micro} představuje mikroskopický frikční koeficient, který v sobě zahrnuje Stokesův i Giererův mechanismus (volná difúze).

$$\frac{1}{\xi_{micro}} = \frac{1}{\xi_{stokes}} + \frac{1}{\xi_{vol.objem}}. \quad (30)$$

Význam efektu volného objemu je potřeba při difúzi na molekulární úrovni zdůraznit. Empirický vztah mezi mikroviskozitou a volným objemem byl navržen Doolittlem v podobě:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{V_0}{V_f}\right), \quad (31)$$

kde η_0 je konstanta, V_0 , resp. V_f je van der Waalsův, resp. volný objem rozpouštědla.

2.3.3 Metody stanovení ekvivalentní viskozity

Volba vhodné metody závisí na systému, který má být studován. Příkladem může být studium viskozity mikroheterogenního systému, při kterém se kvůli rušivým vlivům difúze více hodí použití molekulových rotorů nebo fluoroforu, který vytváří intramolekulární excimer, než metod založených na zhášení, případně tvorbě intermolekulárního excimeru.

2.3.3.1 Molekulární rotory

Molekulární rotory procházejí v excitovaném stavu změnou geometrie v důsledku vnitřní rotace specifických skupin, která je spojena s přenosem náboje. Této rotaci brání prostředí, ve kterém se sonda vyskytuje, což se projeví na kvantovém výtěžku fluorescence Φ_F , který je přímo úměrný viskozitě prostředí η dle následující rovnice (a , κ jsou konstanty):

$$\frac{\Phi_F}{1 - \Phi_F} = a\eta^\kappa. \quad (32)$$

Z důvodu volného objemu molekul prostředí a srovnatelné velikosti rotujícího segmentu sondy s molekulami okolí plyne, že naměřená ekvivalentní viskozita pomocí molekulových rotorů bude vždy menší, než skutečná makroskopická viskozita prostředí.

2.3.3.2 Intermolekulární zhášení

Intermolekulární zhášení patří mezi translační difúzní procesy, které jsou závislé na viskozitě prostředí. Jeho studiem můžeme získat informace o fluiditě daného mikroprostředí v případě, že probíhá ve srovnatelném časovém rozsahu jako je doba excitovaného stavu fluoroforu.

Obecně lze popsat zhášení jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence bez změny fluorescenčního emisního spektra. Rozlišujeme dva typy zhášení,

a to dynamické a statické. Při dynamickém zhášení dochází ke srážce excitované molekuly fluoroforu s molekulou zhášeče, po níž se fluorofor nezářivě navrácí do základního stavu. Tyto molekuly se nijak chemicky nezmění na rozdíl od statického zhášení, kdy se po kontaktu fluoroforu v základním stavu s molekulou zhášeče vytvoří nefluoreskující komplex.

Pro studium mikroviskozity prostředí se využívá dynamického zhášení, které se řídí základní Stern-Volmerovou rovnicí:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_s [Q], \quad (33)$$

kde Φ_0 , (I_0) je kvantový výtěžek fluorescence (intenzita fluorescence) v systému bez zhášeče, Φ , (I) jsou hodnoty pro systém s molekulou zhášeče, k_q je rychlostní konstanta zhášení, τ_s je doba excitovaného stavu fluoroforu a $[Q]$ je koncentrace zhášeče v systému.

Jestliže je tento bimolekulární proces difúzně kontrolován, rychlostní konstanta zhášení k_q může být nahrazena rychlostní konstantou difúze k_1 . Pokud je hodnota k_1 nezávislá na čase, pak ji lze vyjádřit jako:

$$k_1 = 4\pi NR_c D, \quad (34)$$

kde N je $N_A/1000$, kde N_A je Avogadrova konstanta, R_c je vzdálenost mezi molekulou fluoroforu a zhášeče při jejich nejbližším přiblížení (v centimetrech) a D je vzájemný difúzní koeficient rovný součtu difúzního koeficientu fluoroforu a difúzního koeficientu zhášeče.

2.3.3.3 Tvorba intermolekulárního excimeru

Tato metoda je založena na obdobném principu jako intermolekulární zhášení. Také se jedná o difúzní proces, pro který platí základní Stern-Volmerova rovnice (33). Excimer neboli excitovaný dimer vzniká při srážce excitované molekuly fluoroforu s další molekulou stejného fluoroforu v základním stavu. Ve fluidním prostředí je dominantní excimerová emise, se zvyšující se viskozitou prostředí pak roste emise monomeru.

Poměr intenzity fluorescence monomeru a excimeru můžeme vyjádřit jako funkci rychlostní konstanty difúze (k_1) za předpokladu, že rychlost rozpadu excimeru je nižší než doba života, vztahem:

$$\frac{I_E}{I_M} = \frac{k_r^M}{k_r^E} k_1 \tau_E [M], \quad (35)$$

kde k_r^M je rychlostní konstanta fluorescence monomeru, k_r^E je rychlostní konstanta fluorescence excimeru, τ_E je doba života excimeru a $[M]$ koncentrace monomeru.

Z rovnic (33), (35) vyplývá, že intenzita fluorescence excimeru je přímo úměrná difúznímu koeficientu sondy v prostředí, tudíž nepřímo úměrná viskozitě.

2.3.3.4 Tvorba intramolekulárního excimeru

Intramolekulární excimery mohou být vytvořeny mezi bifluorickými molekulami skládajícími se ze dvou identických fluoroforů propojených krátkým pružným řetězcem.

Na rozdíl od tvorby intermolekulárního excimeru není tento proces translační, ale vyžaduje těsné přiblížení obou fluoroforů v důsledku vnitřní rotace v průběhu doby života jejich excitovaného stavu. Jelikož účinnost tvorby excimeru v tomto případě nezávisí na koncentraci fluoroforu, můžeme přepsat rovnici (35) do tvaru:

$$\frac{I_E}{I_M} = \frac{k_r^M}{k_r^E} k_1 \tau_E. \quad (36)$$

Informace o fluiditě prostředí je pak získávána stejným způsobem jako v případě metody využívající tvorbu intermolekulárního excimeru.

2.3.3.5 Anizotropie fluorescence

Tato metoda pro stanovení viskozitních poměrů v okolí sondy je založena na principu měření polarizované fluorescence, které je popsána v kapitole 2.2.

Fluorescenční sondy pro tento typ měření by měly mít symetrickou molekulu s vhodnou orientací přechodových momentů, jejichž rotace může být považována za izotropní. Dále by neměly specificky interagovat s okolními molekulami a také by těmito molekulami neměla být rušena jejich emise.

Pro izotropní pohyb sondy v **izotropním prostředí** jsou hodnoty okamžité anizotropie $r(t)$ a ustálené anizotropie \bar{r} spojeny s rotačním difúzním koeficientem D_r těmito vztahy:

$$r(t) = r_0 \exp(-6D_r t), \quad (37)$$

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_0} (1 + 6D_r \tau_s). \quad (38)$$

Rovnici (38) jako první použil Francis Perrin, proto bývá označována jako **Perrinova rovnice**, ačkoliv v jeho době byla tato rovnice psána s polarizačním poměrem, nikoliv s anizotropií fluorescence.

V zásadě by hodnota viskozity η ($= kT/6VD_r$) mohla být spočítána z Einstein-Stokesova vztahu (23) za předpokladu známého hydrodynamického objemu V , jehož hodnota ale nemůže být vypočítána pouze na základě jednoduché geometrické úvahy, ale musí být do něj zahrnut i solvatační obal.

Pro rotační korelační čas (čas, za který se molekula pootočí o 1 radián) $\tau_{rot} = (6D_r)^{-1}$ lze přepsat rovnice (37), (38) do tvaru:

$$r(t) = r_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau_{rot}}\right), \quad (39)$$

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau_s}{\tau_{rot}}\right). \quad (40)$$

Změny korelačního času se na základě změn externích podmínek (teploty, tlaku, přidavku aditiva) dobře odráží změny ve fluiditě média, což opět zdůrazňuje fakt, že všechny hodnoty „mikroviskozit“ vypočítané dle Einstein-Stokesovy rovnice mohou být sporné.

V případě **anizotropních prostředí**, jakými jsou lipidové dvojvrstvy nebo tekuté krystaly, kde je rotačnímu pohybu sondy bráněno, již rovnice (37)–(40) určitě platí. V těchto případech neklesá hodnota anizotropie k nule, ale k rovnovážné hodnotě r_∞ . Pro sondu s tyčinkovitým tvarem a za předpokladu, že má pouze jeden rotační korelační čas, lze emisní anizotropii zapsat ve tvaru:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \exp\left(\frac{-t}{\tau_{\text{rot}}}\right) + r_\infty. \quad (41)$$

Časově-rozlišená anizotropie fluorescence neposkytuje pouze informace o fluiditě prostředí prostřednictvím korelačního času τ_{rot} , ale i o uspořádání média prostřednictvím poměru r_0 / r_∞ .

Z praktického hlediska je měření ustálené anizotropie při kontinuální excitaci jednodušší než časově-rozlišené techniky, nicméně je možné použít jej jen v případě izotropní rotace v izotropním médiu a znalosti doby života fluorescenční sondy. Je nutné mít na paměti, že rozdíly v hodnotě ustálené anizotropie vyplývající ze změny vnějších podmínek, například teploty, nemusí být jen příčinou změny rychlosti otáčení molekuly sondy, ale také vlivem změny její doby života.

Časově-rozlišené techniky jsou mnohem „mocnější“ metodou, ale také náročnější na přístrojové vybavení. Jsou vhodné pro studium fluidity a struktury organizovaných soustav jako jsou vodné micely, reverzní micely a mikroemulze, lipidové dvojvrstvy, syntetické neiontové vezikuly a kapalně krystaly. Také jsou vhodné pro stanovení mobility segmentů polymerů nebo ke sledování interakcí mezi antigenem a protilátkou.

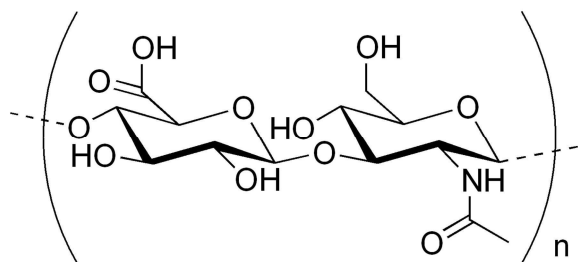
2.4 Kyselina hyaluronová, hyaluronan

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan, který objevil a popsal Karel Meyer s asistentem Johnem Palmerem. V roce 1934 ji extrahovali z očního sklivce skotu. O dvacet let později Karel Meyer určil její přesnou chemickou strukturu. Její název byl odvozen z řeckého slova *hyaloid* (sklovitý) a uronové kyseliny, kterou v ní Meyer s Palmerem objevili společně s glukosaminem. Fakt, že kyselina hyaluronová se v živých organismech převážně vyskytuje ve formě polyaniontu, konkrétně ve formě sodné nebo draselné soli, nikoliv protonované kyseliny, se v současnosti odráží na častěji používaném označení hyaluronan (Hya). V průběhu 40. let 20. století byla kyselina hyaluronová dále izolována z očního sklivce prasat, hovězí krve, pupeční šňůry, kohoutích hřebínků a hemolytických streptokoků [10].

2.4.1 Struktura, fyzikální a chemické vlastnosti

Kyselina hyaluronová je přísně lineární polymer, který je složen z opakujících se disacharidových jednotek – kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu, které jsou

střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou (viz Obr. 12). Tyto vazby jsou navíc stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky.



Obr. 12 *Struktura kyseliny hyaluronové.*

V kompletní molekule hyaluronanu dosahuje počet disacharidových jednotek hodnoty 10 000 a více, přičemž každá z nich odpovídá 400 Da. Délka takového řetězce pak činí zhruba 10 μm a jeho molekulová hmotnost se pohybuje okolo 4 MDa.

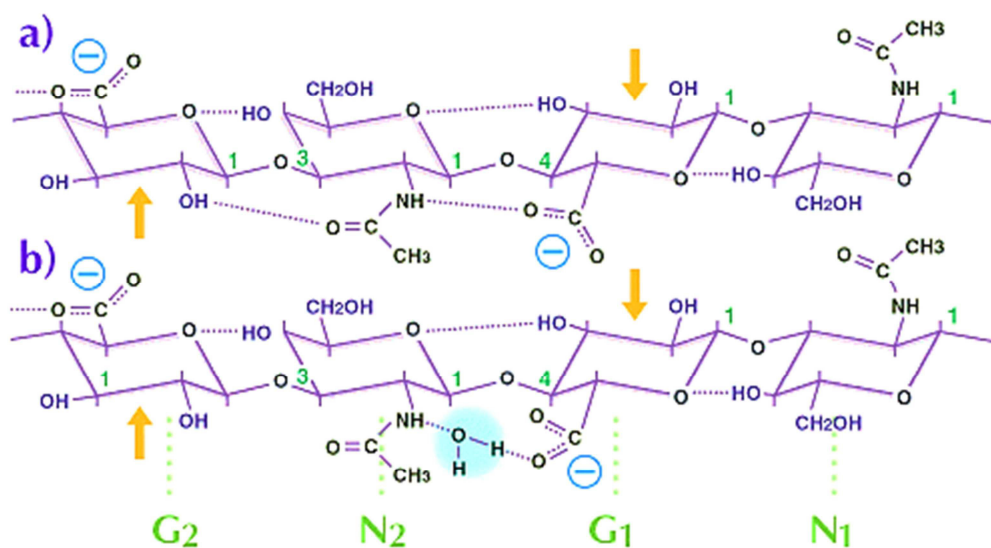
2.4.1.1 *Struktura v roztoku*

Ve vodném roztoku má hyaluronan charakter polyaniontu díky disociaci karboxylových skupin. Z jeho primární struktury vyplývají důležité následky pro sekundární strukturu v roztoku. Struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní, jelikož glukóza v β -konfiguraci dovoluje objemnějším skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální pozici, zatímco malé molekuly zabírají stericky méně příznivou axiální polohu. Důsledkem tohoto uspořádání je výskyt hydrofobních oblastí, tzv. „hydrophobic patch“, které jsou právě tvořeny vodíky v axiální poloze [10, 11, 12].

Dle **Scotta J. E. a spol.** zaujímají řetězce hyaluronanu v roztoku specifickou strukturu, kterou popisuje představa náhodně svinutého klubka, tzv. „random coil“ [13]. Řetězec hyaluronanu obsahuje dva typy vazeb. Prvním z nich jsou relativně pevné vazby v uzavřených cukerných kruzích, které udržují tvar cukerných zbytků. Jednotlivé cukry jsou navzájem spojeny glykosidickými vazbami obsahujícími atom kyslíku. Tyto vazby jsou navíc stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky. Z Obr. 13 je patrné, že i voda hraje důležitou roli při stabilizaci struktury hyaluronanu. Z kyslíkového atomu glykosidického můstku vycházejí dvě vazby směřující do ramen písmene „V“. Substituenty (cukerné kruhy) připojené na konci těchto vazeb mohou rotovat o 360° . Pomocí molekulárního modelování bylo prokázáno, že ze sterických důvodů nemají substituenty úplnou volnost v tom, jakou konfiguraci vzhledem k atomu kyslíku zaujmou, nicméně existuje několik možností uspořádání pro každý druh glykosidického můstku. Násobek počtu můstků a množství na nich možných konfigurací vazeb pak dává obrovský počet možných tvarů molekulové kostry hyaluronanu. Tento fakt vede k tomu, že se uspořádání řetězce hyaluronanu může jevit jako náhodné, přestože tomu tak není.

Nukleární magnetická rezonance potvrdila přítomnost uspořádané struktury hyaluronanu v roztoku, v němž je každá disacharidová jednotka oproti té předchozí otočena o 180° . Dvě otáčky činí 360° , což znamená návrat k původní orientaci. Proto je tato struktura nazývána jako dvakrát stočená šroubovice, tzv. „two-fold helix“.

Důležitým faktem je, že u řetězce hyaluronanu uspořádaném ve dvakrát stočené šroubovici se zhruba po stejně dlouhých úsecích vyskytují hydrofobní oblasti. Přítomností hydrofilních a hydrofobních oblastí se tento polysacharid řadí mezi amfifilní látky. Z tohoto důvodu pak jeho molekula zaujímá v roztoku strukturu náročnou na prostor.

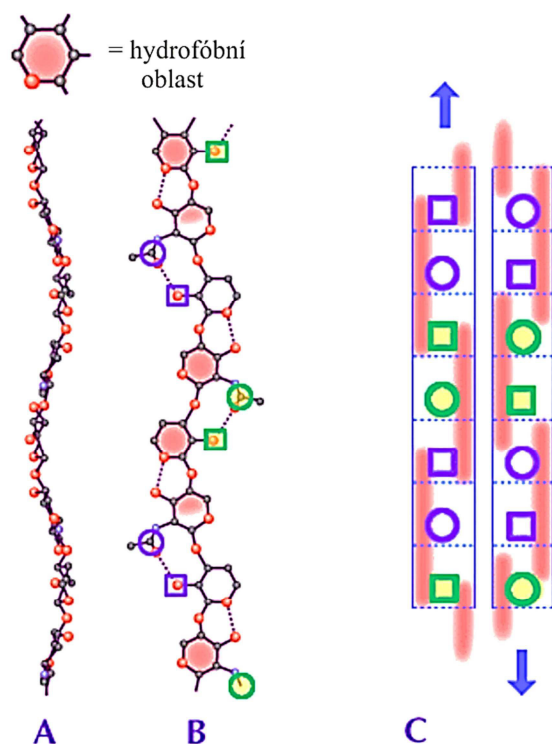


Obr. 13 Tetrasacharid z řetězce hyaluronanu složený ze dvou opakujících se disacharidových jednotek vykazujících preferovanou konfiguraci v roztoku. G – zbytek kyseliny glukuronové, N – N-acetylglukosamin. Tečkovanou čarou jsou vyznačeny vodíkové vazby, které jsou potencionálně přítomny v každém tetrasacharidu hyaluronanu. V nevodném rozpouštědle (např. dimethylsulfoxid) je vodný můstek (b) mezi acetamidem N_2 a karboxylem G_1 nahrazen vodíkovou vazbou (a) [13].

Vzniklá doménová struktura hyaluronanu má charakteristické vlastnosti. Společně s rozpouštědlem mohou do domény difundovat malé molekuly jako je voda, živiny či elektrolyty. Naopak velké molekuly (např. proteiny) jsou z ní částečně vytlačovány vlivem jejich velkého hydrodynamického objemu. Čím větší tyto molekuly jsou, tím méně místa je pro ně v hyaluronové doméně. Tento fakt vede ke zpomalení jejich difúze skrz doménu, což má za následek jejich nižší koncentraci v doméně oproti okolnímu prostředí bez hyaluronanu. Řetězce hyaluronanu se v roztoku neustále pohybují, tudíž se v doméně kontinuálně mění velikost efektivních pórů. Statisticky v ní existují póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností, což znamená, že všechny látky mohou procházet hyaluronovou sítí, avšak s různým stupněm zpomalení v závislosti na jejich velikosti [10].

Řetězce hyaluronanu mají schopnost vytvářet agregáty samy se sebou, za což jsou částečně zodpovědné přitažlivé síly mezi hydrofobními oblastmi. Plochá sekundární struktura hyaluronanu (podobná stužce) má specifické vlastnosti – obě její strany jsou identické, ale antiparalelní. To má za následek, že co je možné na jedné straně stužky, je možné i na straně druhé. Agregáty tedy mohou vznikat z obou dvou stran. Elektrické repulze mezi zápornými náboji, které by podporovaly disociaci agregátů, jsou překonány hydrofobními interakcemi

a také vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou. Jelikož se jedná o interakce velmi krátkého dosahu, hraje důležitou roli komplementarita cukerných zbytků. Interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu je vyobrazena na Obr. 14.



Obr. 14 Interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu [13]. *A, B* – zobrazení molekul hyaluronanu, červené místa na *B* značí hydrofobní oblasti na řetězci, čtverce reprezentují karboxylovou skupinu, kruhy skupinu acetamidovou. *C* znázorňuje schéma možného duplexu mezi dvěma řetězci hyaluronanu (boční pohled). Dvě participující molekuly jsou navzájem antiparalelní. Tečkované čáry ohraničují cukerné jednotky, červené pásy značí hydrofobní oblasti.

2.4.2 Biosyntéza

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

Glykosaminoglykany, mezi které hyaluronan patří, jsou většinou syntetizovány v Golgiho aparátu uvnitř buňky a poté jsou připojeny k proteinům v jádře. Nicméně hyaluronan je na rozdíl od nich syntetizován v plazmatické membráně a není propojen s žádným jaderným proteinem. Samotná syntéza probíhá na vnitřní straně buněčné membrány, kde se pomocí hyaluronansyntáz střídavě váží příslušné monosachridové zbytky na konec řetězce. Rostoucí řetězec je pak vytlačován skrz membránu do extracelulárního matrix, kde může hyaluronan vytvářet komplexy s proteiny a stává se tak součástí pericelulárního obalu [14].

Některé bakteriální kmeny jsou také schopné syntetizovat hyaluronan obdobně jako savci, kvůli usnadnění jejich patogenního způsobu života. Příkladem může být lidský patogen *Streptococcus pyogenes* nebo zvířecí patogen *Pasteurella multocida*, jimiž produkováný hyaluronan má shodnou strukturu s hyaluronanem v savčích tkáních. Bakterie si z hyaluronanu vytvoří silnou obalovou vrstvu, čímž se stanou nerozpoznatelnými pro imunitní systém hostitele a napadený organismus se jim pak nemůže účinně bránit [15].

2.4.3 Výskyt, biologické funkce

Hyaluronan se prakticky vyskytuje ve všech tkáních obratlovců a také jej můžeme nalézt u některých bakteriálních kmenů, např. *Streptococcus* a *Pasteurella*, u nichž bývá součástí buněčné stěny. V lidském těle je základní stavební jednotkou mezibuněčné matrix. Ve větší míře se nachází v synoviální tekutině, pupeční šňůře, očním sklivci a kůži. Průměrný muž vážící 70 kg má okolo 15 g hyaluronanu v těle, z nichž je denně jedna třetina degradována a opět nasyntetizována [16].

Hyaluronan má díky své schopnosti vázat se na receptory vliv na řadu významných procesů a funkcí buněk, taktéž na změny genové exprese. Konkrétní biologická aktivita je ovlivněna jeho molekulovou hmotností, délkou řetězce a okolností, za kterých je syntetizován. Podle toho pak reaguje s různými receptory a spouští různé signální dráhy. Nízko a vysokomolekulární hyaluronan mají často opačné buněčné odezvy [16, 17].

Vysokomolekulární hyaluronan (od 500 kDa do 2 MDa) je jedním z nejdelších polymerů v extracelulární matrix živočichů. Vyznačuje se anti-angiogenními účinky, potlačuje imunitní odezvu organismu a inhibuje proliferaci a migraci buněk. V synoviální tekutině slouží jako lubrikant a tlumič nárazů, zlepšuje metabolismus chondrocytů a inhibuje degradaci kloubní chrupavky. Jako součást pericelulární matrix zabraňuje prostupu virů a bakterií k buňce, napomáhá hojení ran a produkci nové granulační tkáně během zánětu. Naopak nízkomolekulární hyaluronan (20–500kDa) má pro-angiogenní účinky, podporuje buněčnou proliferaci a migraci a působí jako stimulátor zánětlivé cytokineze. Oligomery (do 10 kDa) mají jedinečné biologické funkce. Například 6-, 8-, 10-mery podporují proliferaci endoteliálních buněk [16].

2.4.4 Využití

Díky svým vlastnostem a biologické kompatibilitě je hyaluronan látka velmi využívaná v medicínských aplikacích od přípravků na hojení ran, přes oční chirurgii, ortopedii a revmatologii, plastickou chirurgii, až po umělé oplodnění metodou PISCI. Dále se využívá v kosmetických aplikacích, zejména k přípravě gelů a krémů proti vráskám a stárnutí kůže. Rozvoj zažívá použití hyaluronanu v tkáňovém inženýrství a také jeho využití pro cílenou distribuci nebo řízené uvolňování léčiv.

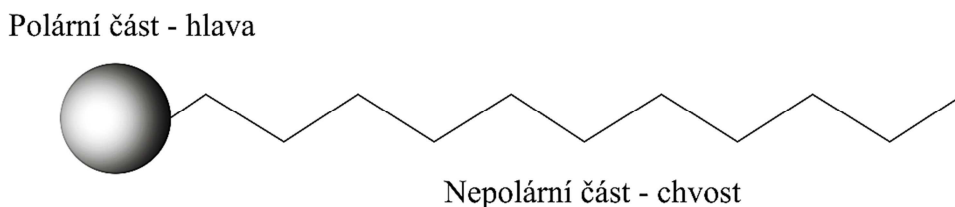
2.5 Asociativní (micelární) koloidy

Tyto soustavy bývají klasifikovány jako lyofilní, ačkoliv se v některých směrech chovají jako dvoufázové systémy. Koloidně disperzní částice, tzv. **micely** zde vznikají vratnou asociací z pravých roztoků určitých nízkomolekulárních látek, tzv. tenzidů. Z termodyna-

mického hlediska se jedná o stabilní systémy a lze pro ně do jisté míry používat termodynamiku pravých roztoků [18].

2.5.1 Struktura tenzidu

Schopnost látky vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekuly. Vyžaduje, aby molekula měla dvě části, jednu lyofilní, tj. s velkou afinitou k rozpouštědлу, která v něm zajišťuje dobrou rozpustnost, a zároveň druhou část – lyofobní, která se v daném prostředí nerozpouští (viz Obr. 15). Neochota lyofobní části ke kontaktu s rozpouštědlem vede k následné asociaci. Molekuly s takovou strukturou označujeme jako **amfifilní** neboli **amfipatické**. Pokud hovoříme o tenzidech ve vodném prostředí, nazýváme tyto části jako hydrofilní a hydrofobní. Hydrofilní hlavu tvoří polární skupina, hydrofobní část je tvořena jedním nebo více uhlíkatými řetězci, které obsahují více jak osm atomů uhlíku.

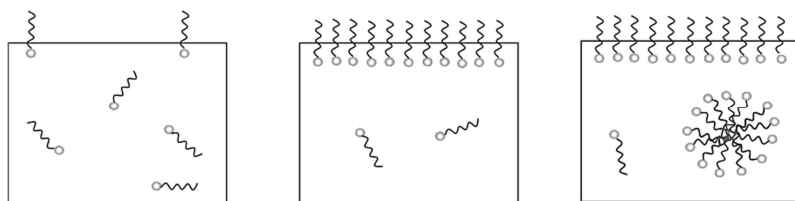


Obr. 15 Schématické znázornění molekuly tenzidu.

2.5.2 Hromadění tenzidů na fázovém rozhraní, vznik micel

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

Ve velkých zředěních tvoří asociativní PAL pravé roztoky, avšak zvyšování jejich koncentrace může vést až ke vzniku micel (Obr. 16).



Obr. 16 Adsorpce tenzidů na fázovém rozhraní, micelizace [19].

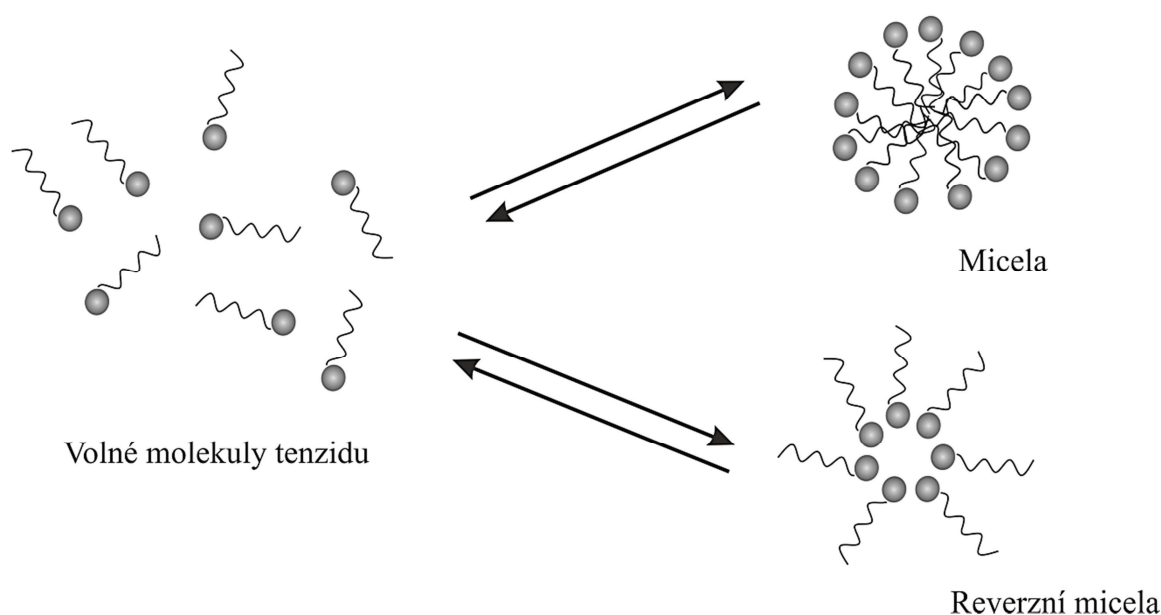
Agregace je tedy závislá na koncentraci tenzidu a probíhá ve dvou krocích. V první řadě nastane fázová separace, jednotlivé molekuly tenzidů se hromadí na fázovém rozhraní, hydrofilní části míří do roztoku, hydrofobní části tenzidů míří ven z roztoku. Díky tomu dochází ke snížení povrchového napětí, zvýšení osmotického tlaku a změně dalších fyzikálních vlastností roztoku. Jakmile se povrch roztoku nasýtí molekulami tenzidu, začnou v něm vznikat micely. Tento okamžik souvisí s pojmem **kritická micelární koncentrace (CMC)**, což je hraniční hodnota koncentrace daného tenzidu, do které se vyskytoval

v roztoku pouze v unimolekulární formě, ale od které již začíná vytvářet koloidní útvary, tzn. micely.

2.5.3 Struktura, vlastnosti micel

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

Základní rozdělení micel dle struktury je odvozeno od prostředí, ve kterém dané micely vznikají. Jádrem micely má vždy opačný charakter než použité prostředí. Ve vodném (polárním) prostředí je jádro micely tvořeno propletenými uhlovodíkovými řetězci molekul PAL, kdežto v nepolárním prostředí vzniká tzv. reverzní micela s jádrem tvořeným polárními hlavami tenzidu (viz Obr. 17). Díky tomu se uvnitř micely mohou rozpouštět látky nerozpustné v daném prostředí, i když se celá micela jeví jako rozpustná.



Obr. 17 Tvorba micel v závislosti na zvoleném prostředí. Polární prostředí – micela, nepolární prostředí – reverzní micela.

Důležitou charakteristikou micel je tzv. **agregační číslo**, které udává, z kolika molekul PAL je micela tvořena. Jeho hodnota bývá u běžných a u reverzních micel rozdílná. U běžné micely se většinou jedná řádově o stovky a vyšší, u reverzních micel toto číslo zpravidla nenabývá větší hodnoty než deset.

2.5.4 Klasifikace tenzidů

Tenzidy dělíme dle schopnosti disociovat ve vodném roztoku na iontové (ionogenní) a neiontové (neionogenní). Iontové pak dále dělíme podle náboje polární skupiny na kationtové, aniontové a amfoterní.

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

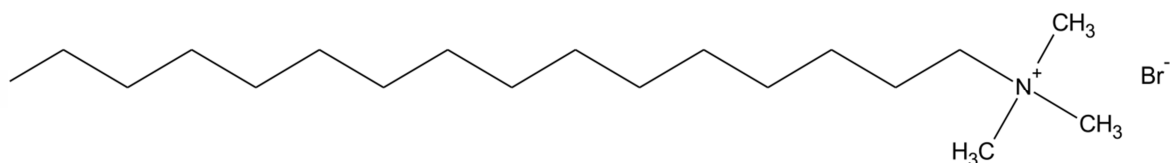
Amfoterní tenzidy obsahují dvě hydrofilní skupiny, jednu zásaditou a jednu kyselou, které jsou schopny v roztoku disociovat v závislosti na pH prostředí. V alkalickém prostředí se tedy chovají jako aniontové tenzidy, v kyselém jako kationtové. Kyselou funkční skupinou bývá karboxylová nebo sulfoskupina,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

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

U **kationtových tenzidů** je ve většině případů kladný náboj nesen atomem dusíku. Primární, sekundární i terciální aminy jsou jako tenzidy využitelné jen v protonovaném stavu, proto je nelze používat při příliš nízkém či vysokém pH. Oproti tomu kvartérní dusíkaté báze nejsou pH sensitivní, jedná se o nosiče stálého náboje a jsou tedy využitelné v celém rozsahu pH hodnot.

2.5.4.1 CTAB

Pod zkratkou CTAB se ukrývá kationtový tenzid nazývaný cetrimonium bromid (též cetyltrimethylamonium bromid či systematicky hexadecyltrimethylamonium bromid), jehož struktura je vyobrazena na Obr. 18. Jedná se o bílou krystalickou látku, která má díky přítomnosti cetrimoniového kationtu antiseptický účinek proti bakteriím a plísním. Používá se například pro syntézu zlatých nanočástic [20], jako pufr při extrakci DNA [21], ale nalezneme ho i v kondicionérech na vlasy.



Obr. 18 Molekula CTAB.

Jeho kritická micelární koncentrace ve vodě je při teplotě 25 °C rovna 1 mM. Ve vodném prostředí mají micely tvořené molekulami CTAB agregační číslo 62, v 13M KBr pak jejich agregační číslo vzroste na hodnotu 139 [22].

2.6 Interakce polyelektrolyt-opačně nabitý tenzid

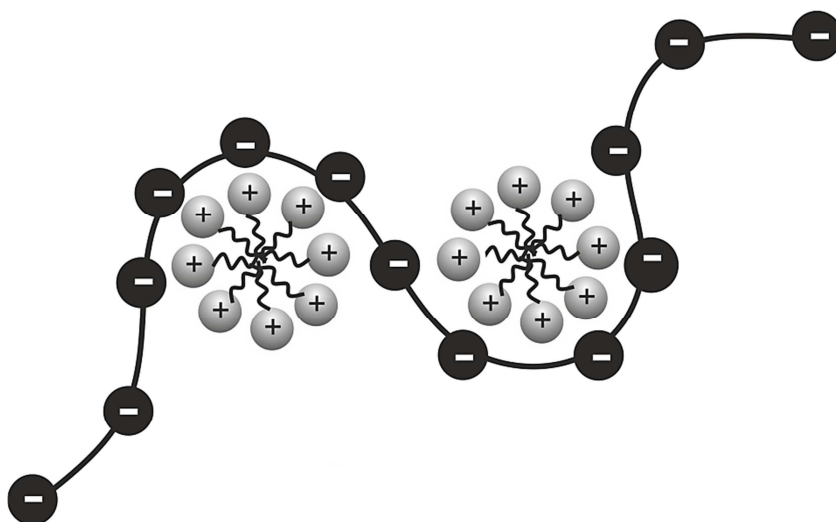
V roztoku je každý polyion obklopen ekvivalentním množstvím nízkomolekulárních opačně nabitých iontů, které vlivem velkého elektrostatického náboje zůstávají v těsné blízkosti jeho řetězce [18]. Na iontovou atmosféru polyelektrolytu má kromě hustoty jeho náboje vliv i náboj jeho protiiontů. Čím větší náboj protiionty mají, tím intenzivněji se kolem polyiontu shlukují. Mezi ionty stejného náboje pak v populaci vázaných iontů převládají ionty s menšími rozměry.

Pokud do roztoku polyelektrolytu přidáme určité množství opačně nabitých molekul tenzidu, začne vlivem přitažlivých elektrostatických sil docházet k agregačnímu procesu, jehož výsledkem jsou malé útvary – minimicely, které bývají také označovány jako micely

indukované polyelektrolytem. Koncentraci, od které dochází k tomuto agregačnímu procesu, označujeme jako **kritickou agregační koncentraci (CAC)**. Její hodnota bývá o několik řádů nižší než je kritická micelární koncentrace daného tenzidu a agregační čísla těchto útvarů jsou nižší než v případě volných micel [23,24].

Tento agregační proces je velmi podobný klasické micelizaci v roztoku, jelikož má stejnou řídicí sílu – tendenci uhlovodíkového řetězce tenzidu minimalizovat kontakt s vodou. Jakmile jsou minimicely vytvořeny, váží se silně na polyion jako multivalentní protiionty. Při různých termodynamických měřeních a měřeních transportních vlastností bylo zjištěno, že jejich distribuce podél řetězce není rovnoměrná jako je tomu v případě jednoduchých protiiontů, ale jejich vázání na něj má kooperativní charakter [25].

Vázání molekul tenzidu na polyelektrolyt vykazuje podobnou závislost na délce alkylového řetězce tenzidu jako u běžné micelizace. Tenzidy s delším uhlíkatým řetězcem se na polyelektrolyt váží mnohem silněji a již při nižších koncentracích než tenzidy s kratšími řetězci [26].



Obr. 19 Znárodnění interakce mezi iontovým tenzidem a opačně nabitým polyelektrolytem.

Důležitou roli hraje i hydrofobní/hydrofilní charakter polyelektrolytu [27]. Hydrofilní polyelektrolyty nemají potřebu omezovat kontakt svého řetězce s vodou. Nemají tedy ani tendence účastnit se micelárních formací, proto je interakce polymer-tenzid v těchto případech založená pouze na elektrostatických interakcích. U hydrofilních polyelektrolytů je pak většina micel běžných tenzidů tvořená bez zapojení částí řetězce, pouze jsou na polyion vázány Coulombickými interakcemi jako multivalentní protiionty. V případě, že je řetězec polyelektrolytu dostatečně flexibilní, může se obalovat kolem agregátů tenzidu [24]. Naproti tomu vodorozpustné polyelektrolyty, jejichž řetězec obsahuje hydrofobní části (například aromatické skupiny na vedlejším řetězci), má tendence minimalizovat kontakt těchto hydrofobních částí s vodou. V přítomnosti tenzidů pak dochází k solubilizaci hydrofobních skupin do hydrofobních mikrodomén, což znamená, že se části řetězce polyelektrolytu účastní na formaci agregátů. Proto bývají tyto komplexy nazývány jako směsné micely [28].

2.6.1 Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy

Asa Herslöf s kolektivem studoval interakce ve vodném systému obsahujícím hyaluronan, tetradecyltrimethylamonium bromid (TTAB) a chlorid sodný [29]. Vlastnosti tohoto systému zjišťoval měřením viskozity a povrchového napětí roztoků. Zjistil, že přídavek TTAB do roztoku hyaluronanu s NaCl s velmi nízkou iontovou silou vede k separaci fází, naopak při vysokých koncentracích soli (200 mM) vzniká homogenní roztok. Těsně nad touto kritickou koncentrací soli má roztok velmi nízkou viskozitu. Efekt přídavku soli vysvětlil elektroneutralizací záporně nabitých skupin na řetězci hyaluronanu, která byla doprovázena jeho svinutím a částečnou agregací. Při vyšších koncentracích TTAB vznikalo v roztoku větší množství volných micel, jejichž tvorba byla preferována před vázanými micelami, což mělo za následek expanzi řetězců hyaluronanu a jejich degradaci.

Na interakce mezi záporně nabitým hyaluronanem a kladně nabitými tenzidy typu alkytrimethylamonium bromid s různě dlouhými alkylovými řetězci (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků) se ve svých člancích zaměřili autoři *K. Thalberg a spol* [30–35].

Pomocí NMR, metody fázové separace, vodivosti a solubilizace barviv zjistili, že se na hyaluronan váží tenzidy, které mají v alkylovém řetězci více jak deset atomů uhlíku, přičemž jejich vázání začíná již při velmi nízkých koncentracích hluboko pod hodnotou CMC daného tenzidu [30]. Interakce mezi hyaluronanem a těmito tenzidy pak vedou ke vzniku agregátů podobným micelám, které jsou vázány na kostře hyaluronanu. Tyto agregáty mají menší velikost oproti volným micelám tenzidu v roztoku bez přítomnosti polyelektrolytu. Vzniklou strukturu pak vystihuje model perlového náhrdelníku. U tenzidů s kratším uhlovodíkovým řetězcem je z energetického hlediska upřednostňována tvorba volných micel.

Také se ukázalo, že při dosažení určitého stupně navázání tenzidu na řetězec hyaluronanu přestávají být vznikající komplexy rozpustné ve vodě, což vede k fázové separaci a vzniku precipitátu [31]. Ten lze zpětně rozpustit přídavkem velkého nadbytku tenzidu nebo přidáním nízkomolekulárního elektrolytu.

Dále se tento tým zabýval fázovým chováním systému TTAB-Hya-voda pomocí pseudo fázového diagramu, ve kterém jsou jednotlivé složky systému umístěny do rohů trojúhelníku [32]. Hlavním znakem tohoto diagramu je dvofázová oblast kapkovitého tvaru vycházející z rohu příslušejícímu vodě obklopená jednofázovým regionem. Její nesymetrický tvar ukazuje, že je roztok koncentrovaného hyaluronanu schopen rozpustit značné množství tenzidu, zatímco koncentrovaný roztok tenzidu se po přídavku hyaluronanu téměř ihned fázově separuje. Tyto fázově separované komplexy Hya-tenzid pak postupně přecházejí v průhlednou koncentrovanou fázi usazenou na dně vzorku, ve které se množství vody pohybuje okolo 70 %, což poukazuje na vysokou hydrofilitu výsledného komplexu.

Co se týče vlivu délky alkylového řetězce tenzidu a molekulové váhy hyaluronanu na fázové chování, rostoucí délka alkylového řetězce má za následek rozsáhlejší dvofázový region, přičemž snižující se molekulová váha hyaluronanu vede pouze k nepatrným změnám v jeho poloze. Z tohoto faktu vyplývá, že interakce mezi hyaluronanem a tenzidem je méně preferována se snižující se délkou alkylového řetězce tenzidu a molekulová hmotnost hyaluronanu nemá na fázový diagram žádný výrazný vliv [33].

Zkoumán byl také efekt přidavku nízkomolekulární elektrolytu (NaBr) na fázovou separaci systému CTAB-Hya [34]. Bylo zjištěno, že po přidavcích malého množství elektrolytu dochází ke zmenšování dvoufázové oblasti ve fázovém diagramu a po dosažení kritické koncentrace NaBr (250 mM) fázová separace nadále neprobíhá. Další přidavky soli (500 mM) ale opět vedou k fázové separaci, která má však odlišný charakter. Oproti nízkým koncentracím soli totiž vede k separaci na roztok bohatý na hyaluronan a roztok bohatý na tenzid. Přidání soli tedy omezuje interakce mezi hyaluronanem a tenzidem, z čehož vyplývá, že značná část z nich je elektrostatické povahy.

Interakci mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy typu C_n TAB zkoumali i pomocí časově-rozlišené fluorescence [35]. Jako fluorescenční sondu použili pyren, jako zhášec dimethylbenzofenon. Zjistili, že kritická agregační koncentrace (CAC) odpovídá zhruba poloviční hodnotě kritické micelární koncentrace (CMC) tenzidu a je závislá na koncentraci hyaluronanu v roztoku. Dále díky porovnání emisních spekter pyrenu v roztocích tenzidu s hyaluronanem a bez hyaluronanu vyhodnotili, že jsou si vznikající micely v obou případech strukturně podobné.

V rámci chemické fakulty na VUT v Brně byly studovány interakce mezi hyaluronanem s různě nabitými tenzidy ve fyziologickém roztoku pomocí metody fluorescenční sondy a tenziometrie [36]. Naměřené výsledky ukázaly, že k tvorbě agregátů dochází v určitém rozmezí koncentrace tenzidu, je tedy vhodnější hovořit o koncentrační oblasti micelizace, nikoliv o přesné kritické micelární (agregační) koncentraci. Největší rozdíly mezi fyziologickým roztokem tenzidu a fyziologickým roztokem tenzidu s hyaluronanem byly zjištěny u kationtového tenzidu CTAB a neiontového tenzidu Tween 20. U CTAB se ve fyziologickém roztoku oproti vodnému posunula schopnost solubilizace k vyšším koncentracím tenzidu, což bylo pravděpodobně způsobeno hydrofobními interakcemi mezi dostatečně dlouhými alkylovými řetězci CTAB a málo polárními částmi řetězce hyaluronanu, které jsou podporovány díky stínění elektrostatických sil přítomností chloridu sodného.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Měření anizotropie ustálené fluorescence

C. C. Ruiz se pomocí anizotropie ustálené fluorescence zabýval efektem vzniklým přidavkem ethylenglykolu (EG) k micelárnímu roztoku TTAB [37]. K výzkumu použil tři fluorescenční sondy – dvě hydrofobní (perylene a 1,4-difenylbuta-1,3-dien) a jednu hydrofilní (fluorescein). Z naměřených hodnot anizotropie pak odhadl mikroviskozitu v jednotlivých micelárních regionech, přičemž mikroviskozita hydrofobních oblastí se s přidavkem EG neměnila, z čehož vyvodil, že micelární interiér nepodléhá po přidavku žádné významné strukturní změně. Naproti tomu zvyšující se hodnoty anizotropie fluoresceinu poukázaly na pronikání EG do oblasti micelárního povrchu, kde se pravděpodobně podílí na tvorbě solvatační vrstvy okolo micely.

J. R. Chantres využil anizotropního chování 1,6-difenylhexa-1,3,5-trienu (DPH) pro studium destabilizace fosfatidylcholinové dvouvrstvé membrány žlučovými solemi [38]. DPH taktéž využil *Chang Y. a spol.* pro charakterizaci Dendron-PEG konjugátů [39].

Technika anizotropie fluorescence posloužila i ke stanovení mikroviskozitních vlastností biopolymerních hydrogelů potenciálně využitelných jako injekční materiály pro opravu tkáňových scaffoldů [40].

M. Cladia Marchi s kolektivem studovala pomocí anizotropie fluorescence mikroviskozitu v kavitách gelu vytvořeného hydrolyzou *n*-butoxidu titaničitého v 3,2M kyselině dusičné [41]. Využila přitom hned několik fluorescenčních sond – rhodamin 101, kresylovou violeť (CV), oxazin 1 a hexahydrát chloridu tris(2,2'-bipyridyl)ruthenatého. Zjistila, že pro studium mikroviskozitních vlastností gelu s nízkým pH (2,5–3,5) je vhodný pouze oxazin 1 a CV. Následně s nimi provedla měření intenzity fluorescence a anizotropie při kontrolovaných teplotách v rozmezí 25–95 °C jako funkci stárnutí gelu. Zjistila, že se druhá viskozita (bulk viscosity) gelu s rostoucí teplotou zvyšuje, ale zároveň se snižuje omezení rotace sond, což poukazuje na to, že se gel skládá z pevné sítě, mezi kterou se nachází dutiny s rozpouštědlem o velikosti větší než 500 Å.

M. Sreenu a spol se s využitím několika různých analytických technik zabýval syntézou, povrchovými a micelárními vlastnostmi tří povrchově aktivních látek založených na bázi *N*-oleoylu, přičemž měření ustálené anizotropie fluorescence a doby života DPH použil pro stanovení mikroviskozity hydrofobního jádra vznikajících micel [42].

Měření anizotropie fluorescence a další spektroskopické metody využil i *Haibo Zhou* ve svém výzkumu zaměřeném na prostudování přechodu micela-vezikul bis(2-ethylhexyl)-sulfosukcinátu sodného [43].

Komaromy-Hiller s kolektivem zkoumal vývoj hodnot anizotropie fluorescence perylenu v závislosti na teplotě a koncentraci neiontového tenzidu tritonu X-114 před a po zakalení vzorků [44]. Naměřené hodnoty anizotropie využil k odhadu mikroviskozity micelárního jádra. Maximum anizotropie bylo pozorováno při dosažení CMC, bezprostředně po jejím překročení se hodnoty anizotropie snížily, což bylo připisováno zvětšení objemu micelárního

jádra. Hodnoty anizotropie se pod bodem zákalu snižovaly i vlivem vzrůstající teploty, což souvisí s výraznějším rotačním pohybem sond. V bodě zákalu žádné výraznější změny nenastaly. V oddělené micelární fázi vzniklé po zakalení vzorku byla naměřená o něco vyšší anizotropie, nicméně její hodnota s narůstající teplotou opět klesala.

Marieta Nichifor s kolektivem studovala vlastnosti hydrofobních domén vzniklých z postranních řetězců polysacharidů, které byly tvořeny *N*-alkyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(2-hydroxypropyl)amonium chloridem ve vodném prostředí [45]. Tyto vzniklé agregáty charakterizovala pomocí ustálené fluorescence (CAC), anizotropního měření (mikroviskozita) a kapilární viskozimetrie (makroviskozita). Jako fluorescenční sondy použila pyren, DPH a *N*-fenylnaftylamin. Zjistila, že s rostoucí koncentrací a zvyšující se iontovou silou roztoku probíhají změny v konformaci polymeru na méně rozsáhlou strukturu, přičemž výsledkem je asociace hydrofobní strany řetězce. Tento stav je pak zachycen fluorofory. S rostoucí koncentrací polymeru roste i počet vznikajících malých agregátů podél řetězce, dokud nejsou asociovány všechny jeho hydrofobní části. Vlastnosti vzniklých mikrodomén tedy zejména závisí na délce polymerního řetězce a míře jeho substituce.

3.2 Měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence

Nakul C. Maity a spol. se pomocí TCSPC metody zabýval dynamikou depolarizace fluorescence organických fluorescenčních barviv. Konkrétně se jednalo o nilskou červeň, kresylovou violeť, kryptocyanin, rhodamin B a rhodamin DPPE v kationtových (CTAB), aniontových (dodecylsulfát sodný – SDS) a neutrálních (triton X-100) micelách. Rozpadovou křivku anizotropie fluorescence molekul fluoroforů uvnitř micely charakterizoval pomocí dvou-exponenciální funkce, přičemž využil modelu rotační a translační difúze molekuly sondy v micelle ve spojení s rotačním pohybem micely jako celku. Z naměřených dat vypočítal rotační a translační difúzní koeficienty jednotlivých fluoroforů, dále v souvislosti s *wobbling-in-cone* modelem stanovil úhel pro šíření kmitání v micelle a difúzní koeficient kmitání. Mikroviskozitu prostředí komentoval pomocí translačních a rotačních difúzních koeficientů s ohledem na jejich závislost na teplotě [46].

Fluorescenční techniky použil i **D. K. Rana s kolektivem** pro studium fotofyzikálních vlastností nově vyvinuté biologicky aktivní látky s terapeutickým účinkem, konkrétně se jednalo o 7-oxy(5-selenokyanato-pentyl)-2H-1-benzopyran-2-on [47]. Jeho vlastnosti byly studovány v micelárním prostředí aniontového tenzidu SDS, kationtového tenzidu CTAB a neiontového tritonu X-100 měřením absorpčních a emisních spekter, časově-rozlišené fluorescence a ustálené i časově-rozlišené anizotropie fluorescence.

Časově rozlišená anizotropie fluorescence se taktéž ukázala vhodná pro studium systémů založených na poly(*N*-isopropylakrylamidu), a to konkrétně pro zkoumání změn jejich struktury a změn chování v závislosti na rozdílných teplotách daného roztoku [48].

Tato metoda byla taktéž využita **A. P. Doradem s kolektivem**, který se zabýval studiem rotačních pohybů fluorescenčních sond v polyethylakrylátových sítích, a to v rozmezí teplot 10–40 °C a různých stupních zesílení [49]. Použité anthracenové sondy se při nízkém zesílení systému chovaly jako elipsoidy a jejich rotačně korelační časy byly určeny na 2 a 20 ns.

Pomocí DPH a časově rozlišené anizotropie fluorescence byla **Rogerem Bisby** studována membránová dvojrstva obsahující α -tokoferol [50]. DPH bylo také použito jako fluorescenční sonda v kombinaci s metodou TCSPC pro studium interakcí mezi biologicky aktivními polykationy a fosfolipidovými membránami [51].

Časově rozlišená anizotropie fluorescence byla využita i **T. A. Smithem**, který pomocí ní zkoumal adsorpci rhodaminu B na koloidní oxid křemičitý (ludox) [52].

Také **Klaus Suhling s kolektivem** využil tuto metodu a za pomoci fluoresceinu jako sondy studoval mikroviskozitu prostředí v živých buňkách [53].

S využitím DPH a laurdanu jako fluorescenčních sond, steady-state a TCSPC měření anizotropie fluorescence, studoval **J. Sýkora s kolektivem** vliv neiontových tenzidů na stimulaci G-proteinů v plazmatických membránách [54].

Chandra Khara s kolektivem studovala pomocí časově rozlišené anizotropie fluorescence rotační dynamiky dvou opačně nabitých látek, konkrétně 1-anilinonaftalen-8-sulfonátu a ethidium bromidu, a to jak v iontovém rozpouštědle, které představoval 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát, tak v běžném viskózním rozpouštědle, a to glycerolu [55]. Z naměřených výsledků vyvodila, že elektrostatické síly mají ve stejně viskózních rozpouštědlech jen nepatrný vliv na nabitě molekuly rozpuštěných látek.

V rámci této diplomové práce byl jako hydrofobní fluorescenční sonda použit perylen, jehož rotační dynamika je předmětem mnoha vědeckých článků.

Příkladem může být studium časově rozlišené anizotropie fluorescence perylenu ve směsi glycerol/voda, které prováděl **Ronald Christensen s kolektivem** [56]. Vzorke excitoval laserovým pulzem a pro experiment zvolil metodu jednofotonového čítání. Pokles anizotropie fluorescence charakterizoval pomocí dvojitého exponenciálního modelu. Určil rotační korelační časy, které souvisí s difúzí v rovině a mimo rovinu molekuly daného fluoroforu a stanovil pre-exponenciální faktor, odrážející relativní orientaci absorpčního a emisního transmisního momentu, který byl nezávislý na viskozitě, teplotě i dalších externích vlastnostech systému. Ukázalo se, že zkoumaný systém perylen/glycerol/voda je vhodným standardem pro porovnávání vyhodnocení experimentálních technik a analytických metod využívajících nanosekundové měření anizotropie fluorescence.

Vyhasínající křivku anizotropie fluorescence perylenu ve viskózních rozpouštědlech (glycerol, propylenglykol) v rozmezí 20–35 °C zkoumal i **David N. Piston s kolektivem** [57]. **Mary D. Barkley s kolektivem** studovala pomocí časově rozlišené fluorescence a časově rozlišené anizotropie fluorescence perylen a 9-aminoakridin v glycerolu, a to jak při různých excitačních vlnových délkách, tak v teplotním rozmezí 10–40 °C [58]. Rotační dynamikou perylenu a 3,9-dibromperylenu v glycerolu se zabýval i tým vědeckých pracovníků v čele s **Jackem Szubiakowskim** [59].

Mathew McCarrol s kolektivem využil perylen a časově rozlišenou anizotropii fluorescence pro studium vodného roztoku tritonu X-114, do kterého byl v různých množstvích přidáván aniontový tenzid SDS [60]. Při nízkých koncentracích SDS se projevila komponenta s velmi krátkým korelačním časem a křivky rozpadu anizotropie ukázaly

existenci vysoké limitní hodnoty anizotropie fluorescence, což značilo, že bylo perylenu bráněno v rotačním pohybu v micelárním prostředí. Při vyšších koncentracích SDS se limitní anizotropie významně snížila, což naznačilo migraci sondy dovnitř micely.

Dále byla časově-rozlišená anizotropie perylenu použita pro studium lipidové dvojvrstvy tvořené palmitoyl- δ -9-oleylfosfatidylcholinem [61]. Bohužel bylo zjištěno, že pouze toto měření neposkytne dostatek informací na to, aby bylo možné plně charakterizovat orientační rozdělení molekul v dvojvrstvách.

Jako druhá fluorescenční sonda v této diplomové práci, určená pro stanovení mikroviskozity hydrofilní části kondenzovaných systémů, byl použit rhodamin 6G, který našel i uplatnění při následujících studiích koloidních systémů.

Dina Tleugabulova s kolektivem využila časově-rozlišenou anizotropii rhodaminu 6G pro sledování rozsahu iontové vazby mezi touto kladně nabitou fluorescenční sondou a koloidními částicemi oxidu křemičitého bez modifikace i s modifikovaným povrchem neutrálními či kationtovými silanovými skupinami [62, 63].

Graham Hungerford srovnával fluorescenční chování rhodaminu 6G v tenkých a tlustých vrstvách tetraethylorthosilikátu vyrobených ze stejné reakční směsi [64]. Výsledky časově-rozlišené anizotropie fluorescence poukázaly na přítomnost různě velkých pórů, ve kterých byly molekuly barviva vězněny.

Rhodamin 6G posloužil i pro studium sol-gel matice tetramethylorthosilikátu. Konkrétně se jednalo o studium mikroviskozitních změn při stárnutí a hydrolýze gelu [65]. Výsledky ukázaly, že se sol-gel proces skládá z několika zřetelných fází, mezi kterými dochází k výrazným změnám lokální mikroviskozity.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Chemikálie

<i>Fluorescenční sondy</i>	Perylene – CAS: 198-55-0, purris for fluorescence Fluka, číslo šarže: 2059009 Rhodamine 6G – CAS: 989-38-8, purris $\geq 99\%$ Sigma Aldrich, číslo šarže: 252433-1G
<i>Hyaluronan</i>	Sodium hyaluronate 300–500 kDa, Tech-grade Contipro Biotech s. r. o., číslo šarže: 213-3809 Sodium hyaluronate 750–1000 kDa, Tech-grade Contipro Biotech s. r. o., číslo šarže: 213-4160
<i>Tenzid</i>	Hexadecyltrimethylammonium bromide – CAS: 57-09-0 Sigma Aldrich, číslo šarže: 059K0041
<i>Rozpouštědla</i>	Aceton p. a. – CAS: 67-64-1 Penta, číslo šarže: 1212021209 Ethanol – CAS: 64-17-5, extra čistý ML Chemica, číslo šarže: 202-031-70303 Glycerol – CAS: 56-81-5, čistota $\geq 99,5\%$ Sigma Aldrich, číslo šarže: BCBK9967V Mili-Q voda – Miliphore academic, Purelab: ELGA
<i>Ostatní</i>	Chlorid sodný p. a. – CAS: 7647-14-5 Lachner, s. r. o., číslo šarže: PP/2009/06278 Ludox – Koloidní křemík, použití pouze pro R&D Sigma Aldrich, číslo šarže MKBJ4732V
4.1.2 Přístroje a zařízení	
<i>Fluorolog (luminiscenční spektrometr)</i>	Horiba Scientific Zdroj záření – Xenonová lampa 450 W, rozsah 200–850 nm Monochromátory – Czerny-Turner Detektory – 2×PMT, InGaAs (LN ₂), PbS Rychlost skenu – 150 nm/s
<i>Fluorocube (TCSPC spektrofluorometr)</i>	Horiba Scientific Zdroj záření – NanoLED (různé vlnové délky, 260–740 nm, pracovní frekvence 1 MHz) Emisní monochromátor – typ Seya-Namioka (200–800 nm) Detektor – TBX-04 (185–650 nm, rozlišení 20 ps/kanál)

<i>Analytické váhy</i>	Denver Instrument, Mdl BC 100
<i>Předvážky</i>	Denver Instrument, S-603
<i>Mikropipety</i>	Finnpipette, Eppendorf Research
<i>Třepačka</i>	Heidolph Vibramax 100
<i>Magnetické míchadlo</i>	Variomag POLY 15
<i>Vibrační míchadlo</i>	IKA MS2 Minishaker

4.2 Metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Všechny zásobní roztoky byly připraveny navážením potřebného množství dané pevné látky (s přesností na 4 desetinná místa) a analytickým doplněním daného rozpouštědla na požadovaný objem.

Připraveny byly zásobní roztoky fluorescenčních sond v těkavých rozpouštědlech. Jednalo se o perylen v acetonu a rhodamin 6G v ethanolu, obojí o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M. Tyto roztoky byly skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

Připraven byl i nasycený a 0,15M roztok NaCl ve vodě. Tyto roztoky byly uchovány při laboratorní teplotě.

Dále byly připraveny zásobní roztoky obsahující CTAB ve vodě nebo v 0,15M NaCl. Konkrétně se jednalo o 2mM CTAB ve vodě, 200mM CTAB ve vodě a 200mM CTAB v 0,15M NaCl. Vzniklé roztoky byly míchány 24 hodin na magnetickém míchadle a poté skladovány při laboratorní teplotě.

Také byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu. Z hyaluronanu o molekulové váze 300–500 kDa byl připraven vodný roztok o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Z hyaluronanu 750–1000 kDa byl připraven 0,5% roztok v 0,15M NaCl. Vzniklé roztoky byly ponechány 24 hodin na magnetickém míchadle a potom skladovány v ledničce při 4 °C.

4.2.2 Příprava vzorků

4.2.2.1 Kapalné vzorky

Do čistých skleněných vialek byl pipetován takový objem roztoku fluorescenční sondy v těkavém rozpouštědle, aby její výsledná koncentrace ve vzorku činila $1 \cdot 10^{-6}$ M, pokud není uvedeno jinak. Těkavé rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Do takto připravených vialek se sondou byly připravovány vzorky o požadovaných koncentracích jednotlivých komponent v požadovaném prostředí. Všechny vzorky byly promíchány na vibračním míchadle a ponechány minimálně 12 hodin na třepačce za laboratorní teploty.

Pro obě fluorescenční sondy byla připravena kalibrační řada pro měření závislosti anizotropie fluorescence na viskozitě homogenního prostředí, která byla tvořena 8 (resp. 6) vzorky obsahujícími směs glycerol/voda. Hmotnostní zlomek glycerolu se v řadě

s rhodaminem 6G zvyšoval z $w_{\text{gly}} = 0$ až na $w_{\text{gly}} = 0,96$. U perylenu byla kvůli jeho hydrofobicitě vytvořena řada s $w_{\text{gly}} = 0,4-0,96$.

Pro studium interakcí mezi hyaluronanem a CTAB v kapalně fázi byly vytvořeny dvě koncentrační řady – ve vodném prostředí a v prostředí 0,15M NaCl, obsahující 8 vzorků s konstantní koncentrací hyaluronanu $c_{\text{Hya}} = 0,015 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž koncentrace CTAB se v rámci řady zvyšovala v rozmezí $0,01-0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen o koncentraci $3\cdot 10^{-6} \text{ M}$ ve vzorku. Jednotlivé vzorky byly namíchány třikrát.

Dále byly pro lepší porovnávání mikroviskozitních vlastností hydrofobních domén připraveny různé micelární roztoky CTAB s perylenem jako fluorescenční sondou, a to jak ve vodném prostředí, tak i v prostředí 0,15M NaCl. Jednalo o roztoky: 2mM CTAB, 2mM CTAB v 0,15M NaCl, 100mM CTAB, 100mM CTAB v 0,15M NaCl, 200mM CTAB a 200mM CTAB v 0,15M NaCl. Jednotlivé vzorky byly namíchány třikrát.

4.2.2.2 Gelové vzorky

Pro přípravu gelových vzorků byly použity zásobní roztoky obou fluorescenčních sond, 0,5% Hya v 0,15M NaCl a 200mM CTAB v 0,15M NaCl. Gelace probíhala ve zkumavkách, přičemž celkový objem roztoku činil 12 ml. Nejprve bylo do zkumavek pipetováno takové množství roztoku dané sondy, aby její výsledná koncentrace ve vzorku činila $1\cdot 10^{-6} \text{ M}$. Těkavé rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Následně bylo do zkumavky napipetováno 6 ml roztoku CTAB, zkumavka byla zazátkována, její obsah byl promíchán na vibračním míchadle a poté byla ponechána 24 hodin na třepače. Další den bylo do zkumavek přidáno 6 ml roztoku hyaluronanu, vzorky byly opět promíchány na vibračním míchadle a ponechány dalších 24 hodin na třepače za laboratorní teploty.

Průběh gelace je fotograficky zdokumentován v příloze 1. Při gelaci došlo k separaci dvou fází. Spodní (gelová) fáze byla poměrně tuhá a vykazovala vysokou viskozitu oproti horní fázi (supernatantu).

Gelové vzorky byly pro každou fluorescenční sondu namíchány třikrát. Jejich fotofyzikální vlastnosti byly proměřeny po 1, 7 a 14 dnech od smíchání roztoků Hya a CTAB, přičemž byly uchovávány kompletní včetně supernatantu při laboratorní teplotě bez přístupu světla.

4.2.3 Vlastní měření – podmínky, nastavení přístrojů

Všechna měření byla prováděna při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Měření kapalných vzorků probíhalo ve standardní křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm. U gelových vzorků nebylo možné použít klasické měření v kyvetě kvůli vysoké rigiditě gelu a také kvůli nevhodnosti měření, jelikož by k němu bylo zapotřebí obrovské množství kondenzované fáze. Proto byl gel pro měření spekter a anizotropie ustálené fluorescence (přístroj Fluorolog) nanesen v tenké vrstvě na křemenné sklíčko a přiklopen dalším sklíčkem, které zabraňovalo jeho vysychání. Následně byl vzorek mezi těmito dvěma sklíčky vložen diagonálně do standardní kyvety, jak je fotograficky zdokumentováno v příloze 2. Pro měření časově-rozlišených dat na přístroji Fluorocube byl využit nástavec pro pevné vzorky, v němž je speciální kyveta umístěná v úhlu

45° na excitační paprsek, přičemž je navíc zakloněna vůči vertikální ose kvůli minimalizaci odrazu excitačního záření (viz fotografie v příloze 3).

4.2.3.1 Excitační a emisní spektra

K měření byl použit luminiscenční spektrometr Fluorolog od firmy Horiba. U vzorků obsahujících perylen byla excitační spektra měřena v rozmezí vlnových délek 300–475 nm při nastavení emisního monochromátoru na 490 nm. Emisní spektrum bylo měřeno v rozmezí 415–600 nm při nastavení excitačního monochromátoru na 389 nm.

U vzorků obsahujících rhodamin 6G byla excitační spektra měřena v rozmezí vlnových délek 380–570 nm s emisním monochromátorem nastaveným na 580 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu 500–700 nm pro excitaci při 480 nm.

4.2.3.2 Anizotropie ustálené fluorescence

K měření byl použit přístroj Fluorolog od firmy Horiba. Anizotropie fluorescence byla měřena v L-formátu s využitím detektoru T1 (PMT). Pro každý vzorek bylo nastaveno 5 opakování měření, přičemž výsledkem byla zjištěná průměrná hodnota anizotropie. Integrační čas byl u všech vzorků nastaven na 2 s. U vzorků s perylenem byla excitace nastavena na 389 nm a emise na 475 nm. Pro vzorky s rhodaminem 6G byla excitace nastavena na 455 nm a emise na 560 nm.

4.2.3.3 Doba života

K měření časově-rozlišené fluorescence byl použit přístroj Fluorocube (od firmy Horiba) pracující na základě metody TCSPC. Vzorky obsahující perylen byly excitovány pomocí nanoLED diody s vlnovou délkou 389 nm a se šířkou pulzu 1,2 ns. Nastavení přístroje bylo při měřeních následující: emisní monochromátor – 475 nm, excitační polarizátor – 0°, emisní polarizátor – 54,7°, Coaxial delay – 65 ns, TAC range – 100 ns, RT preset – 0 s, Peak preset – 10 000 counts, Repetition rate – 1 MHz a Sync delay – 50 ns.

Vzorky s rhodaminem 6G byly excitovány nanoLED diodou s $\lambda_{\text{exc}} = 455$ nm a se šířkou pulzu 1,2 ns. Nastavení přístroje při měřeních: emisní monochromátor – 560 nm, excitační polarizátor – 0°, emisní polarizátor – 54,7°, Coaxial delay – 65 ns, TAC range – 50 ns, RT preset – 0 s, Peak preset – 10 000 counts, Repetition rate – 1 MHz a Sync delay – 0 ns.

Signál lampy (tzv. prompt) byl stanoven při použití koloidního křemíku (ludox) s emisním monochromátorem nastaveným na vlnovou délku použité diody.

4.2.3.4 Časově-rozlišená anizotropie fluorescence

K měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence byl opět použit přístroj Fluorocube od firmy Horiba, jako tomu bylo u stanovení dob života. Vzorky s perylenem byly excitovány nanoLED diodou s vlnovou délkou 389 nm, jednotlivé vyhasínající křivky fluorescence potřebné pro vyhodnocení časově-rozlišené anizotropie fluorescence byly měřeny při nastavení přístroje: emisní monochromátor – 475 nm, Coaxial delay – 65 ns, TAC range – 100 ns, RT preset – 60 s, Peak preset – 0 counts, Repetition rate – 1 MHz a Sync delay – 50 ns.

Měření bylo ukončeno při rozdílu 5 000 counts (fotonů) mezi poklesy s VV a VH orientací polarizátorů.

Vzorky s rhodaminem 6G byly excitovány nanoLED diodou s vlnovou délkou 455 nm, přičemž jednotlivé vyhasínající křivky fluorescence byly měřeny při nastavení přístroje: emisní monochromátor – 560 nm, Coaxial delay – 65 ns, TAC range – 50 ns, RT preset – 60 s, Peak preset – 0 counts, Repetition rate – 1 MHz a Sync delay – 0 ns. Měření bylo ukončeno při rozdílu 5 000 counts (fotonů) mezi poklesy s VV a VH orientací polarizátorů.

U každého vzorku bylo provedeno měření G-faktoru s nastavením odpovídajícím dané fluorescenční sondě.

4.2.4 Vyhodnocení

4.2.4.1 Statistika

Jelikož byly jednotlivé vzorky namíchány třikrát, hodnoty veličin pro vyhodnocení informací z daných měření byly získány zprůměrováním naměřených výsledků pro dané složení vzorku, přičemž byly stanoveny i výběrové směrodatné odchylky, jejichž hodnoty byly vyneseny do grafů v podobě chybových úseček.

4.2.4.2 Doba života fluoroforu

K analýze dat získaných měření časově-rozlišené fluorescence byl použit program DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software od firmy Horiba, který pracuje na principu metody nelineárních nejmenších čtverců. Cílem této metody je zjištění, zda se soubor dat shoduje s daným matematickým modelem, kterým byla tato data proložena a určení parametru, ve kterém se odráží pravděpodobnost správnosti proloženého modelu. Tento „goodness-to-fit“ parametr v sobě porovnává naměřená data $N(t_k)$ a příslušný matematický model $N_c(t_k)$ dle rovnice:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \quad (42)$$

kde proměnná n představuje počet dat (počet kanálů) použitých pro analýzu a σ_k je standardní odchylka každého datového bodu.

Jelikož hodnota χ^2 závisí na množství dat, není ve výsledku vhodné interpretovat přímo její hodnotu, ale je dobré použít redukovanou správnost proložení χ_R^2 , která je od množství dat nezávislá.

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n - p} = \frac{\chi^2}{\nu}, \quad (43)$$

kde n je počet bodů, p představuje počet parametrů volnosti a ν je počet stupňů volnosti. Pokud se v souboru dat projevují pouze náhodné chyby, měla by se hodnota χ_R^2 pohybovat kolem jedné. V případě, že se matematický model nebude shodovat s naměřenými daty, bude hodnota χ_R^2 daleko větší než jedna.

V programu DAS6 mohou být naměřená data prokládána 1–5 exponenciální matematickou funkcí, jejíž obecná podoba je:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right), \quad (44)$$

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

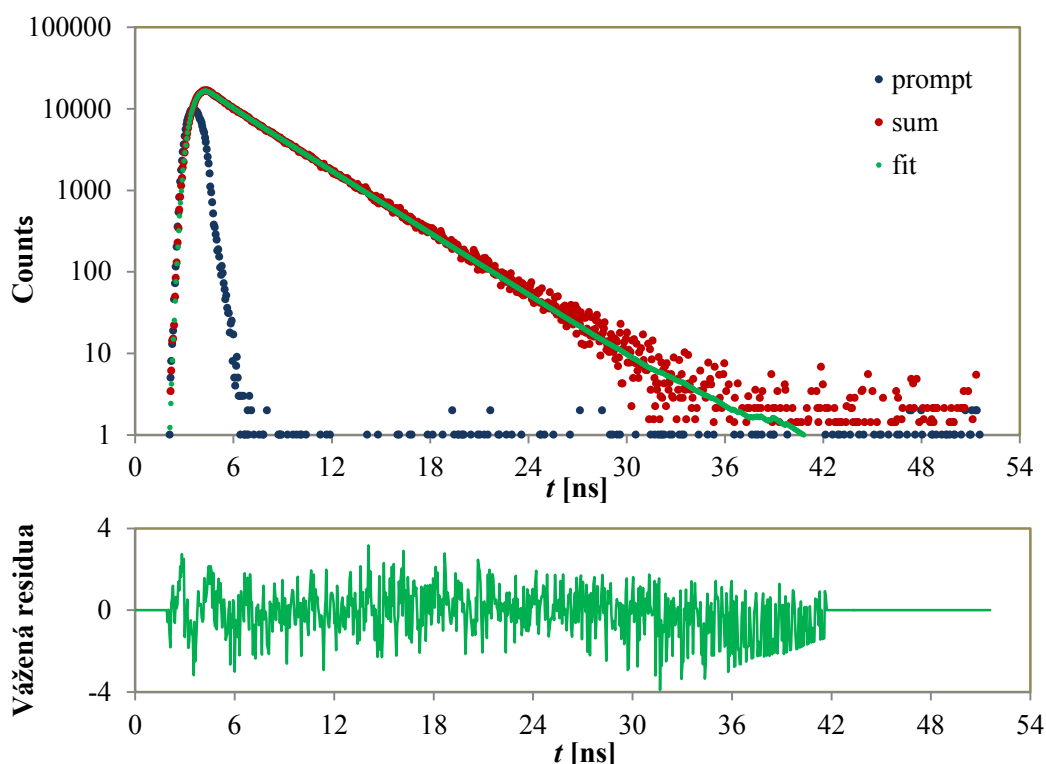
V případech více-exponenciálních poklesů, kdy bylo potřeba porovnávat výsledky s ustálenou fluorescencí, byla zavedena průměrná doba života fluoroforu, jejíž hodnota byla spočítána dle rovnice:

$$\tau = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i, \quad (45)$$

kde $\alpha_i = 0,01 \cdot B_i$.

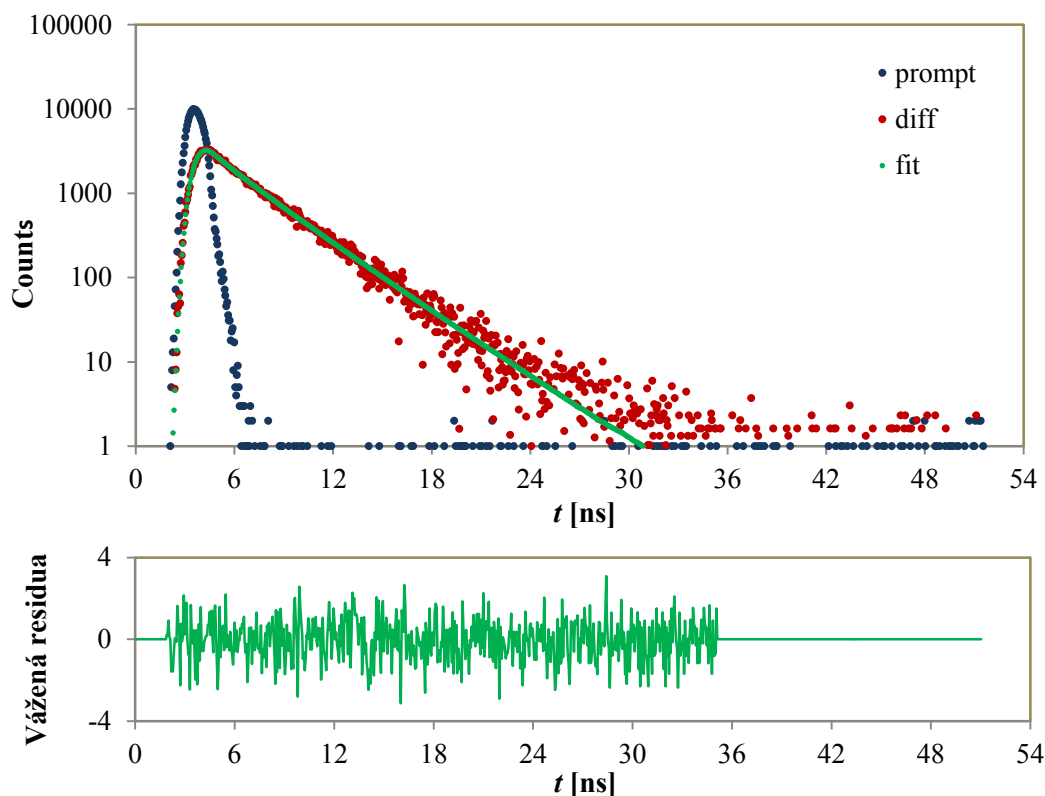
4.2.4.3 Časově-rozlišená anizotropie fluorescence

K analýze dat získaných měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence byl opět použit program DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software od firmy Horiba, přičemž byla použita metoda rekonvoluční analýzy.



Obr. 20 Příklad vyhodnocení „sumy“ naměřených poklesů fluorescence vzorku s rhodaminem 6G ve směsi glycerol/voda s 86,7 %_{hm} glycerolu. Prompt – odezva lampy, sum – suma jednotlivých poklesů fluorescence (při VV a VH orientaci polarizátorů) a fit – proložená funkce. Hodnota $\chi_R^2 = 1,103$.

Nejprve je potřeba analyzovat „sumu“ naměřených poklesů fluorescence (Obr. 20) s využitím matematického modelu, jehož obecným základem je rovnice (44). Pro jednoduché fluorofory s mono-exponenciálním poklesem by vyhodnocení sumy mělo dát hodnotu doby života. V případě, že se nejedná o jednoduchý fluorofor, je potřeba použít více-exponenciální matematický model.



Obr. 21 Příklad vyhodnocení rozdílu („diff“) naměřených poklesů fluorescence vzorku s rhodaminem 6G ve směsi glycerol/voda s 86,7 %_{hm} glycerolu. Prompt – odezva lampy, fit – proložená funkce. Hodnota $\chi^2 = 0,953$.

Následuje analýza dat z rozdílu poklesů fluorescence s použitím impulsní rekonvoluční fitovací funkce:

$$I_r(i) = R(\text{inf}) + B_1 \exp\left(\frac{-i}{\tau_{\text{rot1}}}\right) + B_2 \exp\left(\frac{-i}{\tau_{\text{rot2}}}\right), \quad (46)$$

$$R(0) = R(\text{inf}) + B_1 + B_2. \quad (47)$$

$R(\text{inf})$ představuje infinitní neboli rovnovážnou hodnotu anizotropie fluorescence, $R(0)$ označuje hodnotu počáteční anizotropie fluorescence, B_1 a B_2 jsou před-exponenciální funkce, které souvisí s množstvím emitující látky v analyzovaném vzorku a τ_{rot1} a τ_{rot2} jsou příslušné rotační korelační doby.

Pro použití modelu pouze s jedním rotačním korelačním časem se hodnota B_2 fixuje na nulovou hodnotu.

U perylenu při vyhodnocení dat pomocí dvou-exponenciálního modelu byly získány dvě rotační korelační doby, z nichž byla následně vypočítána průměrná rotační korelační doba dle rovnice, ve které je $\alpha_i = 0,01 \cdot B_i$.

$$\tau_{\text{rot}} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_{\text{rot}i}. \quad (48)$$

4.2.4.4 Vyhodnocení mikroviskozity prostředí

Mikroviskozita určitého prostředí byla vyhodnocována pomocí určení ekvivalentní viskozity, tj. viskozity homogenního prostředí, ze kterého má daná fluorescenční sonda stejnou odezvu jako při měření daného mikroprostředí.

K tomuto účelu byly použity naměřené kalibrační křivky – závislost anizotropie ustálené fluorescence a závislost průměrné rotační korelační doby na viskozitě homogenního prostředí (viz kapitola 5.1–5.2), perylenu a rhodaminu 6G ve směsi glycerolu s vodou, u které byla dle hmotnostního zlomku glycerolu určena viskozita dle dat z článku [66].

U vzorků s perylenem byla ekvivalentní viskozita hydrofobních oblastí počítána pomocí rovnice získané lineárním proložením dat u vzorků s viskozitou 6,05–182,4 mPa·s.

Anizotropie ustálené fluorescence:

$$y = 0,00037x + 0,01137. \quad (49)$$

Časově-rozlišená anizotropie fluorescence:

$$y = 0,02452x + 0,10587, \quad (50)$$

kde y představuje hodnotu anizotropie, příp. průměrného rotačního korelačního času a x ekvivalentní viskozitu.

U vzorků s rhodaminem 6G byla ekvivalentní viskozita hydrofobních oblastí počítána pomocí rovnice získané lineárním proložením dat u vzorků s viskozitou 24,57–182,37 mPa·s.

Anizotropie ustálené fluorescence:

$$y = 0,00095x + 0,08266. \quad (51)$$

Časově-rozlišená anizotropie fluorescence:

$$y = 0,045218x + 0,25232, \quad (52)$$

kde y představuje hodnotu anizotropie, popř. rotačního korelačního času a x ekvivalentní viskozitu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

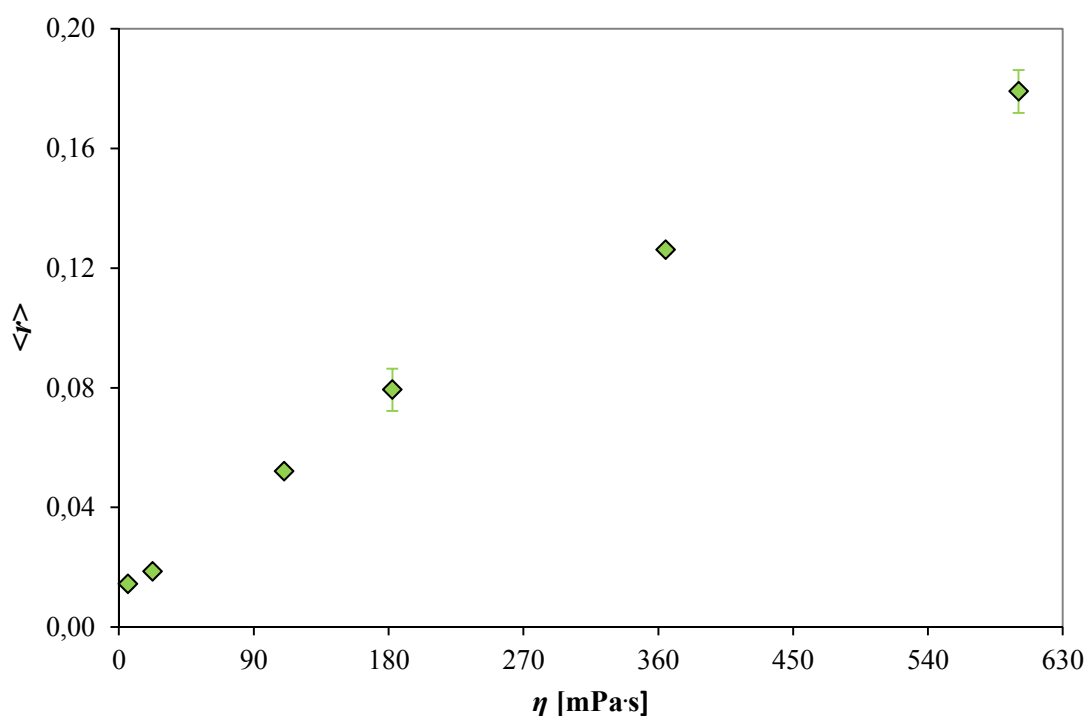
5.1 Perylen ve směsi glycerol/voda

5.1.1 Doba života perylenu ve směsi glycerol/voda

Perylen ve všech vzorcích obsahujících směs glycerolu s vodou vykazoval dvě doby života, z nichž byla spočítána průměrná doba života perylenu, jejíž hodnota se v rámci této řady vzorků snižovala od $\tau = 4,96$ ns pro vzorek s 40,5 %_{hm} glycerolu až na hodnotu $\tau = 4,01$ ns pro vzorek s 95,5 %_{hm} glycerolu.

5.1.2 Závislost anizotropie ustálené fluorescence na viskozitě homogenního prostředí

S rostoucí viskozitou vzorků obsahujících směs glycerolu s vodou se zvyšovaly i naměřené hodnoty anizotropie fluorescence, což byl očekávaný fakt.



Obr. 22 Závislost anizotropie ustálené fluorescence perylenu na viskozitě homogenního prostředí (směs glycerol/voda).

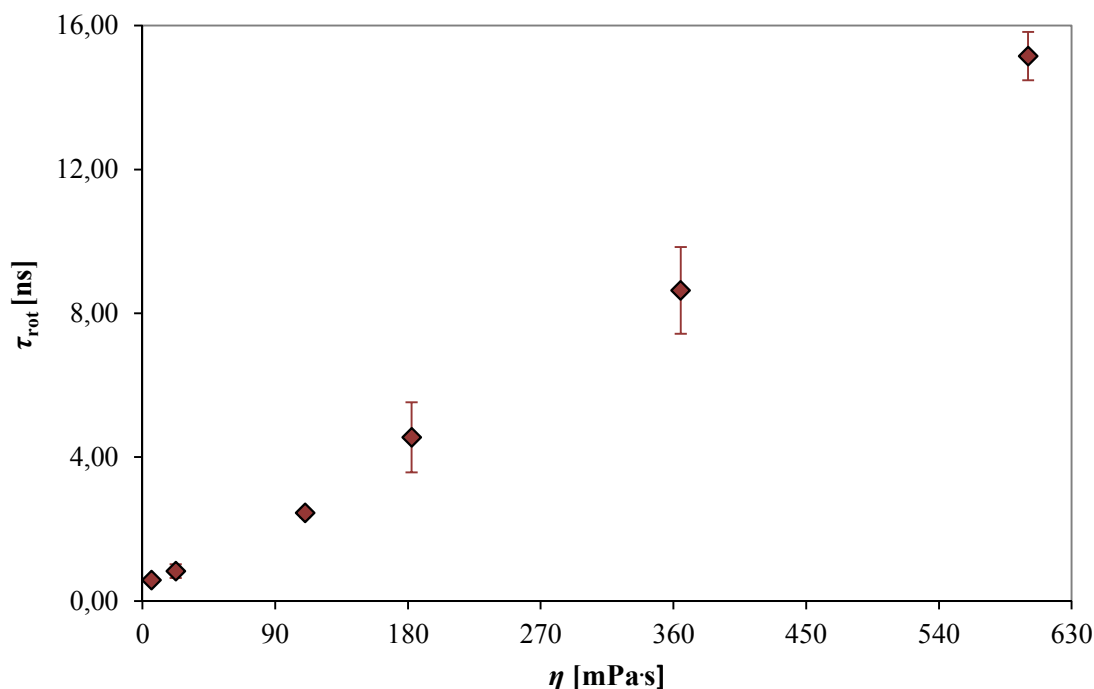
Jak je z Obr. 22 patrné, závislost anizotropie ustálené fluorescence perylenu na viskozitě prostředí vykazuje téměř lineární charakter. Naměřené hodnoty anizotropie perylenu se pohybují v rozmezí 0,0144–0,179, jak je vidět z následující Tab. 1. Získané hodnoty anizotropií pro vzorky o daných viskozitách byly použity jako kalibrační řada pro určení ekvivalentní viskozity ostatních měřených vzorků s perylenem touto metodou.

Tab. 1 Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence perylenu ve směsi glycerol/voda.

w_{gly} [%]	η [mPa·s]	$\langle r \rangle$
40,5	6,1	0,0144 ± 0,0014
60,3	22,5	0,0186 ± 0,0006
80,1	110,3	0,0521 ± 0,0007
86,7	182,5	0,079 ± 0,007
92,7	365,0	0,1261 ± 0,0013
95,5	600,5	0,179 ± 0,007

5.1.3 Závislost průměrné rotační korelační doby na viskozitě homogenního prostředí

Data získaná při měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence perylenu byla vyhodnocena pomocí rekonvoluční analýzy. U vzorku s nejnižší viskozitou byl použit mono-exponenciální model, u ostatních vzorků vyhasínající křivky anizotropie fluorescence vykazovaly dvou-exponenciální charakter. Ze získaných hodnot rotačních korelačních časů byl vypočítán průměrný rotační korelační čas, jehož závislost na viskozitě homogenního prostředí je znázorněna na Obr. 23.

**Obr. 23** Závislost průměrné rotační korelační doby perylenu na viskozitě homogenního prostředí (směs glycerol/voda).

Tato závislost má opět téměř lineární charakter, jako tomu bylo i u ustálené anizotropie. Získané hodnoty průměrné rotační doby pro vzorky o daných viskozitách byly použity jako kalibrační řada pro určení ekvivalentní viskozity ostatních vzorků s perylenem měřených touto metodou.

Jednotlivé rotační korelační doby a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v Tab. 2. Kvůli lepší přehlednosti jsou v tabulce uvedeny pouze hodnoty výběrových směrodatných odchylek u průměrné rotační korelační doby perylenu, které byly do grafu na Obr. 23 vyneseny v podobě chybových úseček.

Tab. 2 *Jednotlivé rotační korelační časy perylenu ve vzorcích obsahujících směs glycerol/voda.*

w_{gly} [%]	η [mPa·s]	τ_{rot1} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot2} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot} [ns]
40,5	6,05	-	-	0,61	100,00	0,579 ± 0,053
60,3	22,52	0,37	54,36	1,67	45,64	0,83 ± 0,19
80,1	110,28	0,55	26,97	2,80	73,03	2,44 ± 0,11
86,7	182,48	0,89	23,62	5,68	76,38	4,6 ± 0,9
92,7	364,95	1,84	24,44	10,83	75,56	8,6 ± 1,2
95,5	600,51	2,44	20,06	18,38	79,94	15,2 ± 0,7

Z Tab. 2 je zřejmé, že s rostoucí viskozitou vzorků docházelo k nárůstu hodnot obou rotačních korelačních dob, ve kterých se odráží pohyb fluorescenční sondy v rovině i mimo rovinu její molekuly. Rotačním korelačním časem označujeme dobu, za kterou se molekula fluoroforu otočí o 1 radián. Čím více je tedy molekule fluorescenční sondy bráněno v pohybu, tím delší rotační korelační čas naměříme.

5.2 Rhodamin 6G ve směsi glycerol/voda

5.2.1 Doba života rhodaminu 6G ve směsi glycerol/voda

Rhodamin 6G ve všech vzorcích obsahujících směs glycerolu s vodou vykazoval dvě doby života, z nichž byla spočítána hodnota průměrné doby života, která se s rostoucí viskozitou vzorku zkracovala obdobně, jako tomu bylo v případě perylenu. Ve vodě byla průměrná doba života rhodaminu 6G stanovena na $\tau = 3,94$ ns, u vzorku obsahujícího 95,3 %_{hm} glycerolu pak měla hodnotu $\tau = 3,25$ ns.

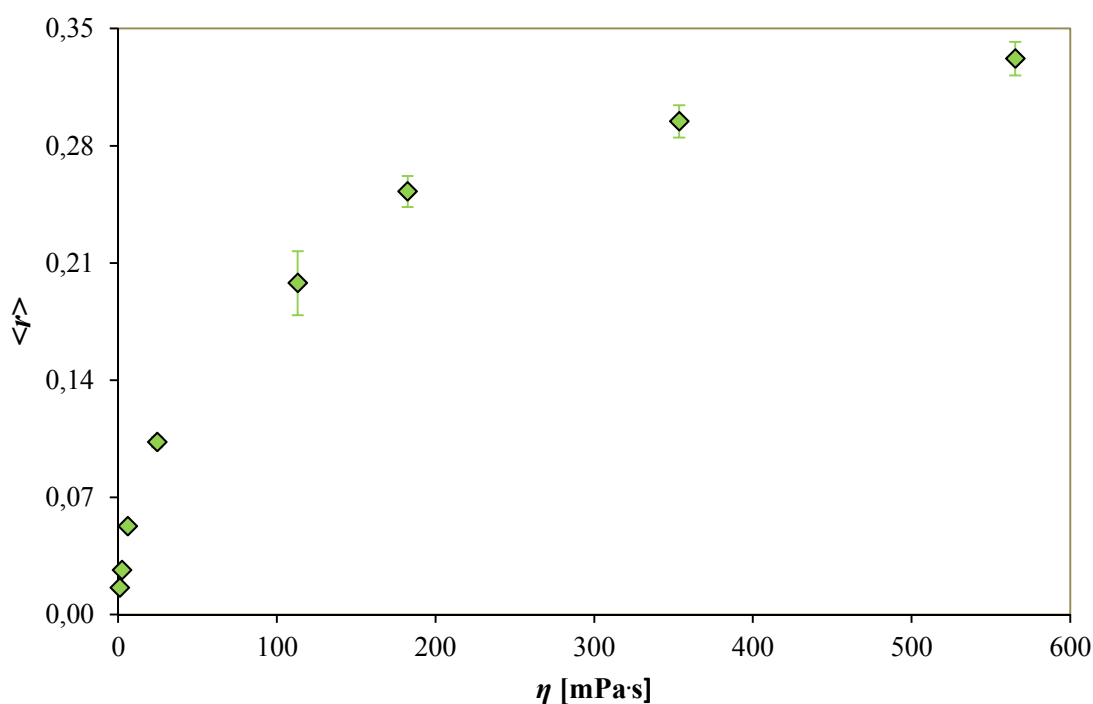
5.2.2 Závislost anizotropie ustálené fluorescence na viskozitě homogenního prostředí

Závislost ustálené anizotropie fluorescence rhodaminu 6G na viskozitě homogenního prostředí je uvedena na Obr. 24. U rhodaminu 6G nemá tato závislost lineární charakter, jako tomu bylo u perylenu, navíc bylo v případě rhodaminu dosaženo daleko vyšších hodnot anizotropie. Pro srovnání – u vzorků s obsahem glycerolu kolem 96 %_{hm} byla naměřená hodnota anizotropie pro perylen 0,179, kdežto pro rhodamin 0,332. Toto je dáno rozdílným tvarem a velikostí molekul těchto fluoroforů, což se odráží v jejich rozdílné rotační dynamice, se kterou naměřené hodnoty anizotropie ustálené fluorescence souvisí.

Získané hodnoty anizotropií pro vzorky o daných viskozitách jsou uvedeny v Tab. 3 a byly použity jako kalibrační řada pro určení ekvivalentní viskozity ostatních měřených vzorků s rhodaminem 6G.

Tab. 3 Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence rhodaminu 6G ve směsi glycerol/voda.

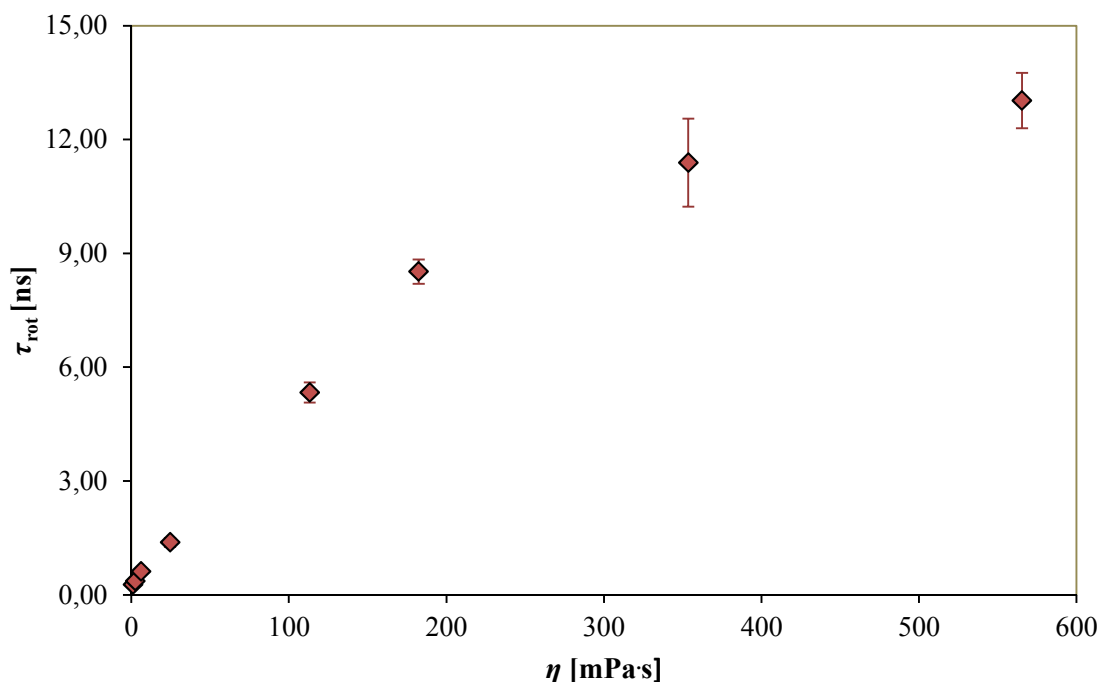
w_{gly} [%]	η [mPa·s]	$\langle r \rangle$
0,0	1,01	0,016 ± 0,002
20,2	2,52	0,0266 ± 0,0018
40,2	6,08	0,0527 ± 0,0008
60,6	24,57	0,103 ± 0,003
80,4	113,18	0,198 ± 0,019
86,7	182,37	0,253 ± 0,009
92,7	353,55	0,294 ± 0,010
95,3	565,36	0,332 ± 0,010



Obr. 24 Závislost anizotropie ustálené fluorescence rhodaminu 6G na viskozitě homogenního prostředí (směs glycerol/voda).

5.2.3 Závislost průměrné rotační korelační doby na viskozitě homogenního prostředí

Časově-rozlišená data z měření anizotropie fluorescence rhodaminu 6G byla vyhodnocena metodou rekonvoluční analýzy. U všech vzorků měla vyhasínající křivka anizotropie mono-exponenciální charakter, tudíž byla získána pouze jedna rotační korelační doba, jejíž hodnoty pro dané vzorky byly v závislosti na viskozitě vyneseny do grafu na Obr. 25.



Obr. 25 Zavislost rotační korelační doby rhodaminu 6G na viskozitě homogenního prostředí (směs glycerol/voda).

Jak je z Obr. 25 patrné, s rostoucí viskozitou vzorku byly získávány vyšší hodnoty rotačního korelačního času, jak bylo předpokládáno. Z těchto hodnot (uvedených v Tab. 4) byla vytvořena kalibrační řada pro určení ekvivalentní viskozity ostatních vzorků s rhodaminem 6G měřených pomocí stejné metody.

Tab. 4 Stanovená rotační korelační doba rhodaminu 6G u vzorku obsahujícího směs glycerolu s vodou o známé viskozitě.

w_{gly} [%]	η [mPa·s]	τ_{rot} [ns]	w_{gly} [%]	η [mPa·s]	τ_{rot} [ns]
0,0	1,005	0,272 ± 0,015	80,4	113,18	5,33 ± 0,27
20,2	2,52	0,36 ± 0,03	86,7	182,37	8,52 ± 0,32
40,2	6,08	0,61 ± 0,02	92,7	353,55	11,4 ± 1,2
60,6	24,57	1,38 ± 0,12	95,3	565,36	13,03 ± 0,73

5.3 Perylen v micelárních roztocích CTAB

V následujících podkapitolách jsou zhodnoceny výsledky získané pomocí jednotlivých fluorescenčních metod s přihlédnutím na mikroviskozitní vlastnosti hydrofobních jader micel CTAB, do kterých se molekuly perylenu přednostně solubilizují, a to jak při různých koncentracích CTAB (2 mM, 100 mM a 200 mM), tak v rámci vodného prostředí i prostředí 0,15M NaCl. Tyto vzorky byly namíchány a proměřeny z důvodu lepší možnosti srovnání viskozity mikroprostředí hydrofobních agregátů vznikajících na řetězci hyaluronanu v kapalně fázi a hydrofobních domén uvnitř gelové fáze.

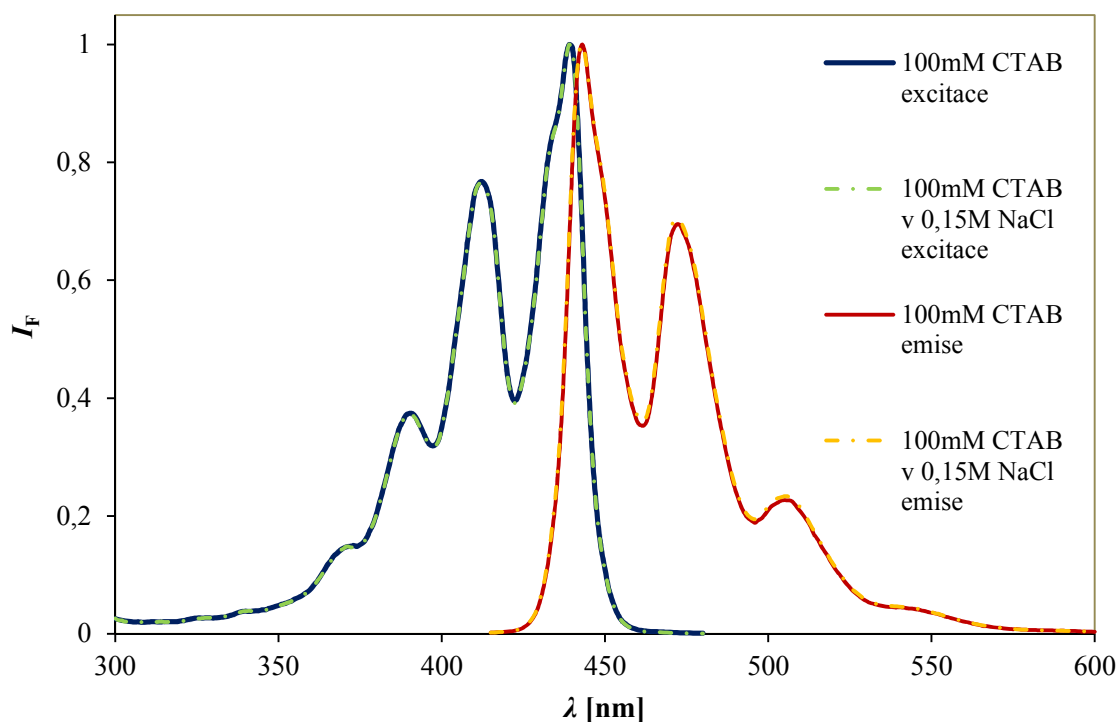
Vzorky s koncentrací 200 mM CTAB ve vodném prostředí nebyly proměřeny, jelikož při laboratorní teplotě došlo k jejich vysrážení.

5.3.1 Doba života perylenu

Ve všech vzorcích vykazoval perylen dvě doby života, ze kterých byla spočítána jeho průměrná doba života, která byla v rámci této sady vzorku stejná, tzn. $\tau = (5,700 \pm 0,011)$ ns, což naznačuje, že byly jeho molekuly zabudovány v obdobném prostředí. Kratší doba s relativním zastoupením kolem 3 % měla hodnotu $\tau_1 = (0,73 \pm 0,12)$ ns a měla by představovat dobu života perylenu ve vodě, ze které vykazuje pouze velmi nízkou intenzitu fluorescence, zato delší a převládající doba života $\tau_2 = (5,85 \pm 0,02)$ ns by pak měla odpovídat molekulám perylenu nacházejícím se v hydrofobním jádře micely.

5.3.2 Excitační a emisní spektrum perylenu v micelárním roztoku

Na následujícím Obr. 26 jsou vyobrazeny normalizovaná excitační a emisní spektra perylenu v micelárních roztoku o koncentraci 100 mM CTAB, a to jak ve vodném prostředí, tak v prostředí 0,15M NaCl. Získaná spektra se v zásadě vůbec neliší, z čehož vyplývá, že přidavek soli z fotofyzikálního hlediska nijak neovlivnil molekuly perylenu.



Obr. 26 Normalizovaná excitační a emisní spektra perylenu v roztocích 100mM CTAB a 100mM CTAB v 0,15M NaCl.

5.3.3 Anizotropie ustálené fluorescence

Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence stanovené v rámci této sady vzorků jsou uvedeny v Tab. 5. Jak je z ní zřejmé, s rostoucí koncentrací CTAB mírně roste i hodnota naměřené anizotropie, přičemž přídavek soli ji ještě o něco zvýšil. Z hlediska rozmezí měřitelné anizotropie perylenu se však jedná jen o velmi malé rozdíly mezi velmi nízkými hodnotami anizotropie fluorescence. Pro srovnání, maximálně možná naměřitelná hodnota anizotropie pro perylen v rigidním prostředí, tj. fundamentální anizotropie, je rovna 0,35 [2]. Ve zkoumaných micelárních roztocích se hodnoty anizotropie pohybovaly pouze mezi 0,023–0,030, z čehož vyplývá, že se molekuly perylenu nacházely ve vysoce fluidním prostředí, které jim nebránilo v rotačním pohybu.

Tab. 5 Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence perylenu v různých micelárních roztocích CTAB.

Prostředí	$\langle r \rangle$
2mM CTAB	0,0232 \pm 0,0002
2mM CTAB v 0,15M NaCl	0,0244 \pm 0,0008
100mM CTAB	0,0262 \pm 0,0010
100mM CTAB v 0,15M NaCl	0,0283 \pm 0,0008
20 mM CTAB v 0,15M NaCl	0,0300 \pm 0,0003

5.3.4 Časově-rozlišená fluorescence

Data z měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence byla vyhodnocena pomocí dvou-exponenciálního modelu. Získané rotační korelační doby jsou uvedeny v následující Tab. 6. Kvůli lepší přehlednosti jsou v tabulce uvedeny pouze hodnoty výběrových směrodatných odchylek u průměrné rotační korelační doby perylenu.

Tab. 6 Rotační korelační doby perylenu v různých micelárních roztocích CTAB.

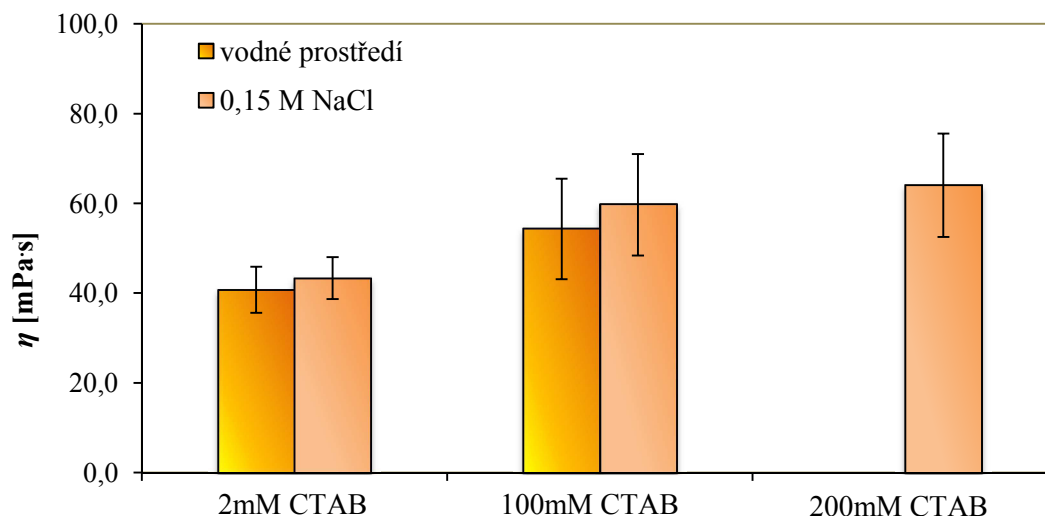
Prostředí	τ_{rot1} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot2} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot} [ns]
2mM CTAB	0,56	37,35	1,70	62,65	1,21 \pm 0,04
2mM CTAB v 0,15M NaCl	0,17	21,84	1,64	66,18	1,26 \pm 0,09
10 mM CTAB	0,29	22,32	1,61	68,74	1,69 \pm 0,13
100mM CTAB v 0,15M NaCl	0,32	24,94	1,63	79,39	1,82 \pm 0,10
200mM CTAB v 0,15M NaCl	0,32	25,16	1,56	78,17	1,94 \pm 0,03

Jak je z Tab. 6 patrné, jedná se o rychlé rotační korelační časy, které odpovídají naměřeným nízkým hodnotám anizotropie ustálené fluorescence pro tytéž vzorky, což opět poukazuje na fakt, že většina molekul perylenu nacházejících se v micelárním jádru byla obklopena fluidním prostředím, které jim výrazně nebránilo v pohybu.

5.3.5 Mikroviskozita micelárního jádra

Ze získaných hodnot anizotropie ustálené fluorescence a průměrné rotační korelační doby perylenu byly vypočítány hodnoty ekvivalentní viskozity stanovené dle dané metody, z nichž byla spočítána průměrná hodnota ekvivalentní viskozity pro daný vzorek (viz Tab. 7). Pro lepší názornost jsou získané hodnoty viskozity mikroprostředí micelárního jádra zobrazeny ve

sloupcovém grafu na Obr. 27. V podobě chybových úseček byly do grafu ke konkrétním micelárním roztokům vyneseny hodnoty výběrové směrodatné odchylky.



Obr. 27 Vypočítaná ekvivalentní viskozita jednotlivých micelárních roztoků CTAB.

Mírně zvyšující se mikroviskozita micelárního prostředí má pravděpodobně původ ve změně struktury micel CTAB vlivem jeho zvyšující se koncentrace a taktéž vlivem přidavku nízkomolekulárního elektrolytu – NaCl. Nad CMC se v roztoku vyskytují silně hydratované micely kulovitého tvaru. S rostoucí koncentrací tenzidu v roztoku narůstají rozměry vznikajících micel a začínají se objevovat i micely jiných než kulovitých tvarů. Při vysokých koncentracích (\approx několik stovek mM) jsou pak micely deformovány v důsledku nedostatku místa na tyčinkovité agregáty. Vlivem přidavku NaCl navíc dochází ke snižování kritické micelární koncentrace a ke zvyšování agregačního čísla micel, což přispívá k výraznější změně velikosti a tvaru vznikajících útvarů, což se projeví na rozdílném uspořádání uhlovodíkových řetězců tvořících hydrofobní jádra těchto agregátů, tudíž se to projeví i na stanovené viskozitě mikroprostředí, ve kterém je perylen solubilizován.

Tab. 7 Vypočítané hodnoty ekvivalentní viskozity micelárního prostředí pomocí anizotropie ustálené fluorescence (η_u) a časově-rozlišené anizotropie fluorescence perylenu (η_{cr}).

Prostředí	η_u [mPa·s]	η_{cr} [mPa·s]	η [mPa·s]
2mM CTAB	36	46	41 ± 5
2mM CTAB v 0,15M NaCl	39	48	43 ± 5
100mM CTAB	43	65	54 ± 11
100mM CTAB v 0,15M NaCl	48	71	60 ± 11
200mM CTAB v 0,15M NaCl	53	76	64 ± 12

5.4 Sledování interakcí mezi hyaluronanem a CTAB v kapalně fázi

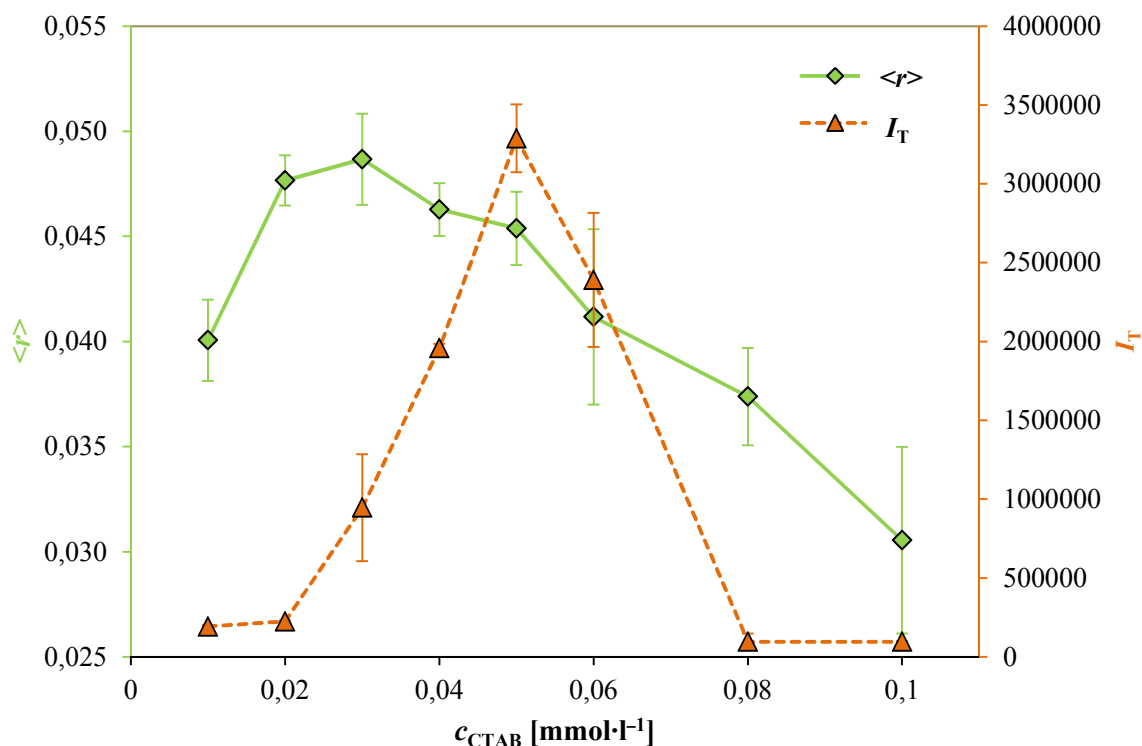
Pro sledování interakcí mezi hyaluronanem a CTAB o nízkých koncentracích (100–10krát nižší koncentrace CTAB než jeho CMC) v kapalně fázi byl vybrán jako fluorescenční sonda perylen, který měl v tomto systému simulovat chování hydrofobního léčiva. Proto budou v následující kapitole diskutovány vlastnosti systému Hya-CTAB s konkrétním zaměřením se na vznik a mikroviskozitní vlastnosti hydrofobních domén, které jsou důležité pro solubilizaci molekul léčiva a tedy i možnosti využití tohoto systému jako cíleného nosiče léčiv.

5.4.1 Vznik hydrofobních domén

V této kapitole bude vznik hydrofobních domén názorně komentován za pomoci vývoje hodnot anizotropie ustálené fluorescence a totální intenzity fluorescence perylenu v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku.

5.4.1.1 Vodné prostředí

Jelikož perylen prakticky nefluoreskuje ve vodě, ale pouze v nevodném prostředí, značí nárůst celkové intenzity fluorescence na Obr. 28 vznik hydrofobních domén, ve kterých byly molekuly perylenu solubilizovány.



Obr. 28 Závislost totální intenzity fluorescence a anizotropie fluorescence na koncentraci CTAB ve vzorcích obsahující 0,015 g·l⁻¹ Hya ve vodném prostředí.

Výrazný nárůst intenzity fluorescence byl zaznamenán od koncentrace 0,03 mmol·l⁻¹ až do koncentrace 0,05 mmol·l⁻¹ CTAB ve vzorku. Následné snížení intenzity fluorescence bylo

způsobeno vznikem kondenzované fáze na stěně vialky, která jasně dokazuje probíhající interakci mezi řetězci Hya a molekulami CTAB. Tento jev byl totiž pravděpodobně způsoben dosažením koncentrace tenzidu nutné pro nasycení kritického počtu vazných míst na řetězci Hya, přičemž následně došlo k fázovému přechodu a vzniku koncentrované fáze na skle vialky, ve které byly přítomné i hydrofobní domény. Při přelévání roztoku do kyvety zůstala gelová vrstva zachycena na stěně vialky a do kyvety byl přelit pouze roztok obsahující malé, resp. žádné množství domén, díky čemuž byla naměřená hodnota intenzity fluorescence perylenu nižší než u vzorků s menším obsahem CTAB, resp. téměř žádná. Po vložení vzorků do fotokomory s UV zářením byly zřetelně viditelné světélkující prstence na stěnách vialek u vzorků s koncentrací $0,06 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB a vyšší, přesně, jak tomu odpovídá i pokles intenzity fluorescence. Fotograficky je tento jev zdokumentován u vzorku s koncentrací $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB na Obr. 29. Vznikající kondenzovaná fáze by jistě stála za samostatnou pozornost, nicméně jí vznikalo velmi malé množství, které nebylo dostačující pro měření.

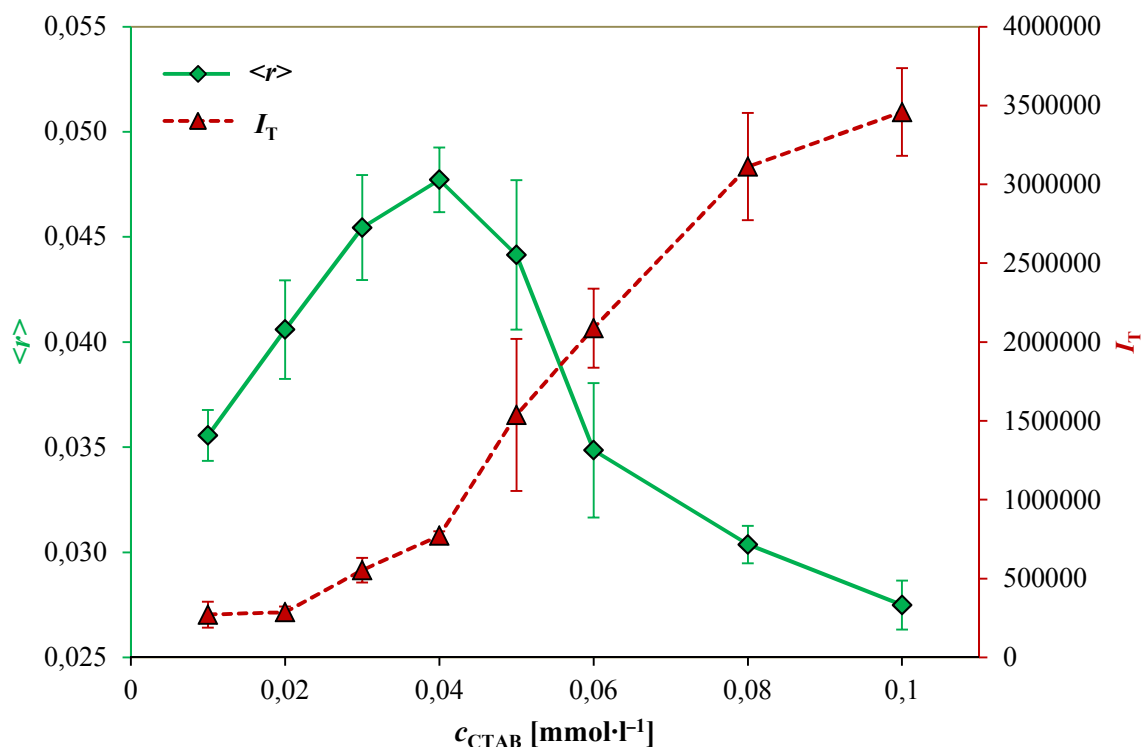


Obr. 29 Vzniklá kondenzovaná fáze na stěně vialky u vzorku s $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB. Vlevo – foceno za denního světla. Vpravo – foceno ve fotokomore s UV zářením.

Počáteční nárůst hodnot anizotropie ustálené fluorescence u vzorků s koncentrací $0,01\text{--}0,03 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB by měl značit rostoucí uspořádání systému, tedy počátek agregace. Následný pokles anizotropie od vzorku obsahujícího $0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB současně s nárůstem intenzity fluorescence poukazuje na již vzniklé hydrofobní domény na řetězci hyaluronanu, ve kterých se molekuly perylenu solubilizovaly. Uprostřed těchto domén jim bylo daleko méně bráněno v rotačním pohybu, ale zároveň jim hydrofobní prostředí umožňovalo fluoreskovat. Co se týče posledních dvou vzorků z koncentrační řady, tj. o koncentraci $0,08$ a $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB, vlivem velmi nízké intenzity fluorescence nemají naměřené hodnoty anizotropie dostatečně vypovídající hodnotu kvůli detekčním limitům použitého přístroje.

5.4.1.2 Prostředí 0,15M NaCl

V prostředí 0,15M NaCl má závislost intenzity fluorescence perylenu zobrazená na Obr. 30 odlišný charakter oproti vzorkům ve vodném prostředí. Intenzita fluorescence v rámci koncentrační řady neustále roste. Zde se totiž nevytvořila kondenzovaná fáze, která by ulpívala na stěnách vialky, jako tomu bylo u vodného prostředí, což pravděpodobně značí, že přidavek chloridu sodného do systému omezil interakce mezi Hya-CTAB.



Obr. 30 Závislost totální intenzity fluorescence a anizotropie fluorescence na koncentraci CTAB ve vzorcích obsahující 0,015 g·l⁻¹ Hya v prostředí 0,15M NaCl.

U prvních čtyř vzorků, tj. s koncentrací 0,01–0,04 mmol·l⁻¹ CTAB dochází k výraznému nárůstu anizotropie a pouze mírnějšímu nárůstu intenzity fluorescence, z čehož vyplývá, že v rámci těchto koncentrací CTAB dochází k agregačnímu procesu vedoucímu k postupnému vzniku hydrofobních oblastí. Bohužel, vlivem přidavku nízkomolekulárního elektrolytu do systému Hya-CTAB pravděpodobně dochází k jeho přebudování, které je pro použití tohoto systému jako cíleného nosiče léčiv nežádoucí. Vzhledem k naměřeným hodnotám intenzity fluorescence, které odpovídají zhruba třetinám hodnot naměřených v rámci vodného prostředí a nevznikající kondenzované fázi u vzorků s vyšší koncentrací CTAB, se totiž jako nejpravděpodobnější varianta jeví pozvolné tvoření volných micel CTAB, které jsou vlivem přítomného NaCl preferovány před hydrofobními doménami navázanými na řetězci hyaluronanu. Zpočátku, při velmi nízkých koncentracích CTAB, je tedy pravděpodobně vytvářeno malé množství nedokonalých a vysoce hydratovaných micel, do jejichž jader se snaží vtěsnat co nejvíce molekul perylenu, vlivem čehož pak dochází k jejich vzájemnému

omezování se v pohybu, což přispívá k naměřené vyšší hodnotě anizotropie fluorescence. V souvislosti s vytvořením pouze nízkého počtu micel nedochází k výraznějšímu nárůstu intenzity fluorescence, jelikož většina molekul perylenu zůstává ve vodném prostředí, ze kterého prakticky nevykazuje fluorescenci.

Následně u vzorku s $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB byl zaznamenán pokles anizotropie a výraznější nárůst hodnoty celkové intenzity fluorescence, což poukazuje na vznik většího počtu micel, případně na jejich zvětšující se velikost. Při dalším zvyšování koncentrace CTAB ve vzorcích ($0,06\text{--}0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) docházelo k výraznějšímu nárůstu intenzity fluorescence společně s výrazným poklesem anizotropie fluorescence, z čehož lze s určitostí říci, že se v systému nacházely již plně vytvořené volné micely CTAB.

5.4.2 Vznik hydrofobních domén – doba života perylenu

5.4.2.1 Vodné prostředí

U vzorků s vodným prostředím vykazoval perylen dvě doby života, z nichž byla spočítána průměrná doba života perylenu, jejíž hodnota se v rámci prvních 5 vzorků, tj. s koncentrací $0,01\text{--}0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB postupně zvyšovala od $\tau = (5,10 \pm 0,06) \text{ ns}$ po $\tau = (5,39 \pm 0,04) \text{ ns}$. Tento fakt byl způsoben snižujícím se relativním zastoupením kratší doby života perylenu $\tau_1 = (3,5 \pm 0,3) \text{ ns}$ a naopak rostoucím zastoupením (od 58 % do 92 %) delší doby života $\tau_2 = (5,74 \pm 0,11) \text{ ns}$, která by měla odpovídat molekulám perylenu zabudovaným v hydrofobním prostředí vznikajících agregátů, což značí, že s narůstající koncentrací CTAB bylo více a více molekul perylenu solubilizováno do hydrofobních domén. Toto zjištění odpovídá narůstající intenzitě fluorescence v rámci daných vzorků, čímž se potvrzuje narůstající počet agregátů Hya-CTAB, popř. jejich zvětšující se velikost.

U vzorků s koncentrací $0,06$ a $0,08 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB pak hodnota průměrné doby života klesla na $\tau = (5,33 \pm 0,02) \text{ ns}$, a to jak kvůli snížení relativního zastoupení delší doby života, tak i snížení hodnoty kratší doby života na $\tau_1 = (2,74 \pm 0,19) \text{ ns}$, vlivem vytvoření se kondenzované fáze na stěně vialky, díky které nebyl do kyvety přelit celý systém Hya-CTAB, ale pouze kapalná část obsahující malé množství hydrofobních domén.

Vzorek s koncentrací $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB vykazoval tak nízkou intenzitu fluorescence, že jej nebylo možné smysluplně vyhodnotit.

5.4.2.2 Prostředí $0,15\text{M NaCl}$

U všech vzorků v prostředí $0,15\text{M NaCl}$ vykazoval perylen také dvě doby života. Kratší z nich měla hodnotu $\tau_1 = (2,6 \pm 0,2) \text{ ns}$ a delší, odpovídající molekulám perylenu v hydrofobních jádrech micel, měla hodnotu $\tau_2 = (5,79 \pm 0,18) \text{ ns}$. Vlivem zvyšujícího se relativního zastoupení delší doby života (od 50 % do 95 %) se pak vypočítaná průměrná doba života perylenu zvýšila v rámci celé této koncentrační řady z hodnoty $\tau = (4,80 \pm 0,09) \text{ ns}$ až na hodnotu $\tau = (5,50 \pm 0,14) \text{ ns}$, což opět odpovídá trendu celkové intenzity fluorescence, která taktéž rostla v průběhu celé koncentrační řady.

5.4.3 Mikroviskozita hydrofobních domén

Pro vodné prostředí jsou hodnoty ekvivalentní viskozity vypočítané z naměřených hodnot anizotropie ustálené fluorescence a průměrného rotačního korelačního času perylenu (vyhodnocen ze dvou naměřených rotačních korelačních časů pro dané vzorky) uvedeny společně s těmito naměřenými hodnotami v následující Tab. 8. Pro prostředí 0,15M NaCl je pak obdobným způsobem vytvořena Tab. 9.

U vzorku 8 ve vodném prostředí, tedy s koncentrací 0,1 mmol·l⁻¹ CTAB nebylo smysluplně možné vyhodnocení dat získaných při časově-rozlišeném měření z důvodu nízké intenzity fluorescence, proto je u něj vyhodnocena ekvivalentní viskozita pouze ze steady-state měření anizotropie, která ale kvůli detekčním limitům přístroje taktéž nemá dostatečně vypovídající hodnotu.

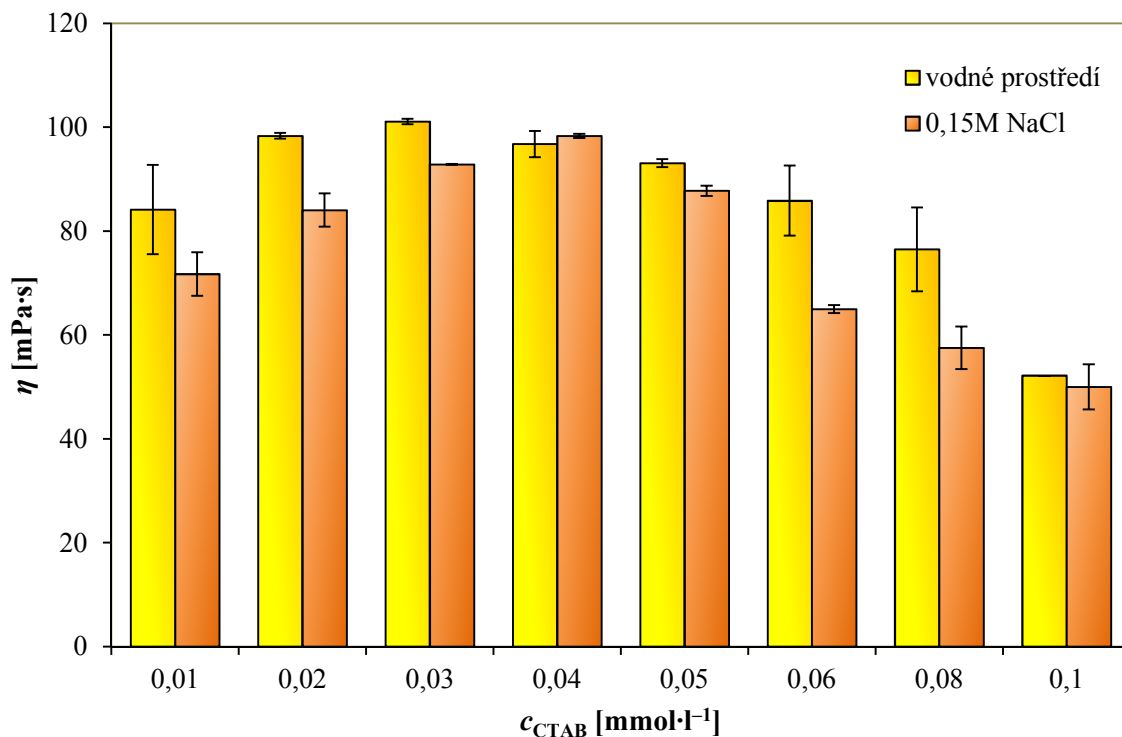
Tab. 8 Stanovené hodnoty anizotropie ustálené fluorescence a z nich vypočítané hodnoty ekvivalentní viskozity, stanovené průměrné rotační korelační doby perylenu a z nich vypočítané hodnoty ekvivalentní viskozity a zprůměrované hodnoty ekvivalentní viskozity pro dané vzorky obsahující 0,015 g·l⁻¹ Hya a 0,01–0,1 mmol·l⁻¹ CTAB ve vodném prostředí.

CTAB [mmol·l ⁻¹]	$\langle r \rangle$	η_u [mPa·s]	τ_{rot} [ns]	η_{cr} [mPa·s]	η [mPa·s]
0,01	0,0401 ± 0,0019	78,1	2,32 ± 0,11	90,2	84 ± 6
0,02	0,0477 ± 0,0012	98,7	2,508 ± 0,013	97,9	98,3 ± 0,4
0,03	0,049 ± 0,002	101,5	2,58 ± 0,14	100,8	101,1 ± 0,4
0,04	0,0463 ± 0,0013	95,0	2,52 ± 0,04	98,6	97 ± 2
0,05	0,0454 ± 0,0017	92,5	2,40 ± 0,04	93,6	93,1 ± 0,6
0,06	0,042 ± 0,004	81,1	2,328 ± 0,017	90,6	86 ± 5
0,08	0,038 ± 0,002	70,8	2,12 ± 0,09	82,2	76 ± 6
0,1	0,031 ± 0,004	52,2	–	–	52,2

Tab. 9 Stanovené hodnoty anizotropie ustálené fluorescence a z nich vypočítané hodnoty ekvivalentní viskozity, stanovené průměrné rotační korelační doby perylenu a z nich vypočítané hodnoty ekvivalentní viskozity a zprůměrované hodnoty ekvivalentní viskozity pro dané vzorky obsahující 0,015 g·l⁻¹ Hya a 0,01–0,1 mmol·l⁻¹ CTAB v 0,15M NaCl.

CTAB [mmol·l ⁻¹]	$\langle r \rangle$	η_u [mPa·s]	τ_{rot} [ns]	η_{cr} [mPa·s]	η [mPa·s]
0,01	0,0356 ± 0,0019	65,8	2,011 ± 0,007	77,7	72 ± 4
0,02	0,041 ± 0,0012	79,5	2,28 ± 0,09	88,6	84 ± 3
0,03	0,045 ± 0,002	92,7	2,39 ± 0,19	93,0	92,8 ± 0,2
0,04	0,0477 ± 0,0013	98,9	2,50 ± 0,09	97,8	98,3 ± 0,4
0,05	0,044 ± 0,0017	89,2	2,22 ± 0,18	86,4	87,8 ± 1,0
0,06	0,035 ± 0,004	63,9	1,9 ± 0,3	66,1	65,0 ± 0,8
0,08	0,030 ± 0,002	51,7	1,86 ± 0,17	63,4	58 ± 4
0,1	0,027 ± 0,004	43,9	1,58 ± 0,12	56,1	50 ± 4

Hodnoty průměrných ekvivalentních viskozit pro koncentrační řadu jak ve vodném prostředí, tak v prostředí 0,15M NaCl jsou kvůli lepší názornosti vyobrazeny společně ve sloupcovém grafu na Obr. 31. V podobě chybových úsečky jsou vyneseny výběrové směrodatné odchylky pro dané vzorky.



Obr. 31 Stanovená ekvivalentní viskozita jednotlivých vzorků obsahujících 0,015 g·l⁻¹ Hya a 0,01–0,1 mmol·l⁻¹ CTAB, jak ve vodném prostředí, tak v 0,15M NaCl.

Jak je z Obr. 31 patrné, v případě vodného prostředí byla zjištěná ekvivalentní viskozita hydrofobních domén o něco málo vyšší než v případě 0,15M NaCl, jediné u vzorku s koncentrací 0,4 mmol·l⁻¹ CTAB je stanovená viskozita u vzorku s NaCl nepatrně vyšší jak u vodného prostředí. Při srovnání zjištěných mikroviskozit v rámci různých micelárních roztoků CTAB (41–64 mPa·s, viz kapitola 5.3.5) jsou v systému Hya-CTAB ve vodném prostředí při koncentracích CTAB v rozmezí 0,01–0,05 mmol·l⁻¹ stanoveny vyšší hodnoty viskozity mikroprostředí, které souvisí se vznikem malých hydrofobních domén, které jsou navázány na řetězec hyaluronanu, v nichž byly molekuly perylenu solubilizovány. Co se týče vzorků v prostředí 0,15M NaCl, u vzorků s koncentrací 0,01–0,05 mmol·l⁻¹ CTAB byly taktéž stanoveny vyšší hodnoty ekvivalentní viskozity mikroprostředí než v případě různých micelárních roztoků, nicméně tento fakt je pravděpodobně spojen s počátkem vzniku volných micel v roztoku, které jsou zprvu nedokonalé a vysoce hydratované, tudíž pro molekuly perylenu vytváří přechodně rigidnější prostředí. U vzorků s koncentracemi 0,06–0,1 mmol·l⁻¹ CTAB nižší hodnoty ekvivalentní viskozity – srovnatelné s micelárními roztoky CTAB, již naznačují přítomnost plně vytvořených malých volných micel CTAB v roztoku.

5.5 Kondenzovaná fáze v systému Hya-CTAB-NaCl

V následujících podkapitolách jsou shrnuty mikroviskozitní vlastnosti gelových fází v závislosti na jejich stárnutí, vznikajících v systému Hya-CTAB-NaCl za vysokých koncentrací tenzidu (přibližně 100krát vyšší než jeho CMC) a při koncentraci 0,15 M NaCl, která odpovídá jednoduchému fyziologickému roztoku. Pro sledování mikroviskozitních vlastností hydrofobních domén byl jako fluorescenční sonda použit perylen, pro studium mikroviskozity hydrofilních částí gelu byl jako fluorescenční sonda zvolen rhodamin 6G.

5.5.1 Hydrofobní domény v průběhu stárnutí gelu

Jelikož je pro nosičový systém jednou z podstatných vlastností schopnost inkorporovat hydrofobní látku, je důležitá přítomnost hydrofobních domén v jeho struktuře. V rámci gelových fází ve studovaném systému Hya-CTAB-NaCl jsou hydrofobní domény tvořeny zachycenými agregáty tenzidu CTAB, které zároveň slouží i k fyzikálnímu síťování.

5.5.1.1 Doba života perylenu

Perylen ve všech gelových vzorcích vykazoval dvě doby života, přičemž kratší doba života byla stanovena na $\tau_1 = (3,38 \pm 0,15)$ ns a delší doba, se zastoupením z 98 %, byla určena na $\tau_2 = (5,66 \pm 0,01)$ ns. Průměrná doba života perylenu pak činila $\tau = (5,61 \pm 0,02)$ ns. Hodnota těchto dob se během čtrnáctidenního stárnutí gelu nijak nezměnila.

5.5.1.2 Anizotropie ustálené fluorescence perylenu

Získané hodnoty anizotropie ustálené fluorescence perylenu jsou uvedeny v Tab. 10. Jak je z ní zjevné, naměřené hodnoty anizotropie jsou jen o kousek vyšší než v případě micelárních roztoků CTAB (viz kapitola 5.3.5), z čehož lze usuzovat, že hydrofobní domény zabudované v gelové síti mají podobný strukturální charakter jako hydrofobní jádra micel. V rámci čtrnáctidenního stárnutí gelu se hodnoty anizotropie nijak výrazně nezměnily, z čehož lze říci, že mikroprostředí kolem molekul perylenu je z viskozitního hlediska stále.

Tab. 10 Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence perylenu v kondenzované fázi systému Hya-CTAB-NaCl v průběhu 14 dní.

stáří gelu [den]	$\langle r \rangle$
1	0,029 \pm 0,002
7	0,0293 \pm 0,0017
14	0,0291 \pm 0,0013

5.5.1.3 Časově-rozlišená anizotropie perylenu

Z dat získaných při měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence perylenu byly vyhodnoceny dvě rotační korelační doby, z nichž byla vypočtena průměrná rotační korelační doba perylenu. Jejich hodnoty jsou uvedeny v Tab. 11. Hodnota rotační korelační doby se v zásadě vlivem čtrnáctidenního stárnutí gelu nezměnila, což potvrzuje získané výsledky pomocí anizotropie ustálené fluorescence.

Tab. 11 Průměrná rotační korelační doba peryleu v kondenzované fázi systému Hya-CTAB-NaCl v průběhu 14 dní.

Stáří gelu [den]	τ_{rot1} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot2} [ns]	rel. ampl. [%]	τ_{rot} [ns]
1	0,019	0,29	2,05	99,72	2,04 \pm 0,04
7	0,020	3,92	2,09	96,08	2,01 \pm 0,06
14	0,018	2,33	2,08	97,67	2,03 \pm 0,04

5.5.2 Hydrofilní část gelu v průběhu jeho stárnutí

5.5.2.1 Doba života rhodaminu 6G

Rhodamin 6G vykazoval ve všech gelových vzorcích dvě doby života, jejichž hodnoty se v průběhu čtrnáctidenního stárnutí gelu zvyšovaly, vlivem čehož se zvyšovala i stanovená průměrná doba rhodaminu, konkrétně z hodnoty $\tau = (3,71 \pm 0,08)$ ns až na hodnotu $\tau = (3,91 \pm 0,07)$ ns, což signalizovalo změny v hydrofilní části gelové fáze.

5.5.2.2 Anizotropie ustálené fluorescence rhodaminu 6G

U gelových vzorků byly pro rhodamin 6G naměřeny relativně vysoké hodnoty anizotropie fluorescence, odpovídající jeho na pohled zřejmé tuhosti. Naměřené hodnoty vlivem stárnutí gelu klesaly, což nasvědčuje tomu, že se hydrofilní části gelu s narůstající dobou stárnutí stávali fluidnějšími.

Tab. 12 Hodnoty anizotropie ustálené fluorescence rhodaminu 6G v kondenzované fázi systému Hya-CTAB-NaCl v průběhu 14 dní.

stáří gelu [den]	$\langle r \rangle$
1	0,216 \pm 0,011
7	0,202 \pm 0,019
14	0,190 \pm 0,011

5.5.2.3 Časově-rozlišená anizotropie rhodaminu 6G

Z dat získaných měření časově-rozlišené anizotropie byla rekonvoluční analýzou vyhodnocena jedna rotační korelační doba, jejíž hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou zaznamenány v Tab. 13. Stejně jako v případě anizotropie ustálené fluorescence, vlivem stárnutí gelu naměřené hodnoty rotačního korelačního času klesaly, což opět značí snižující se mikroviskozitu prostředí v okolí molekul rhodaminu 6G.

Tab. 13 Rotační korelační doba rhodaminu 6G v kondenzované fázi systému Hya-CTAB-NaCl v průběhu 14 dní.

Stáří gelu [den]	τ_{rot} [ns]
1	6,42 \pm 0,11
7	5,63 \pm 0,14
14	5,43 \pm 0,07

5.5.3 Shrnutí mikroviskozity jednotlivých částí gelu v průběhu jeho stárnutí

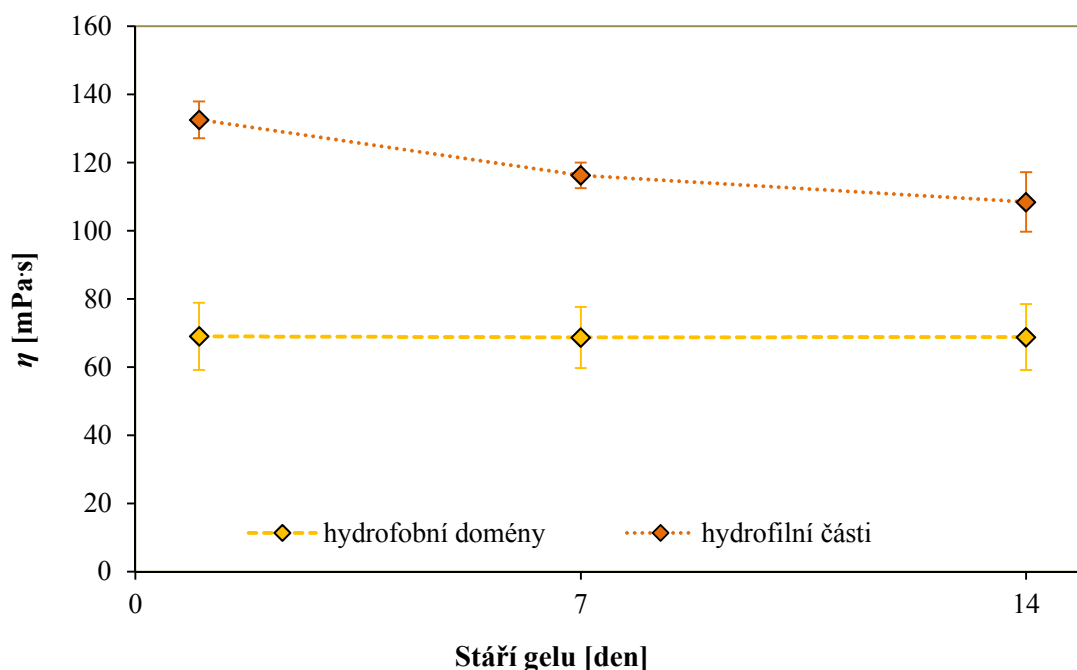
V následující Tab. 14 jsou uvedeny stanovené hodnoty ekvivalentní viskozity hydrofobních domén a hydrofilních částí kondenzované fáze systému Hya-CTAB-NaCl (při vysoké koncentraci tenzidu) v rámci čtrnáctidenního stárnutí gelu. Pro lepší názornost je pak časový vývoj těchto hodnot zaznamenán v grafu na Obr. 32.

Tab. 14 Stanovené hodnoty ekvivalentní viskozity hydrofobní a hydrofilní části kondenzované fáze v systému Hya-CTAB-NaCl v průběhu 14 dní.

stáří gelu [den]	$\eta_{\text{hfobní}}$ [mPa·s]	$\eta_{\text{hfílní}}$ [mPa·s]
1	69 ± 10	133 ± 5
7	69 ± 9	116 ± 4
14	69 ± 10	108 ± 9

Po srovnání zjištěných mikroviskozit u různých micelárních roztoků CTAB (41–64 mPa·s, viz kapitola 5.3.5) a zde stanovené hodnoty mikroviskozity hydrofobního prostředí lze říci, že přítomné hydrofobní oblasti v gelové fázi jsou jen o něco málo viskóznější než hydrofobní jádra micel v 200mM roztoku CTAB.

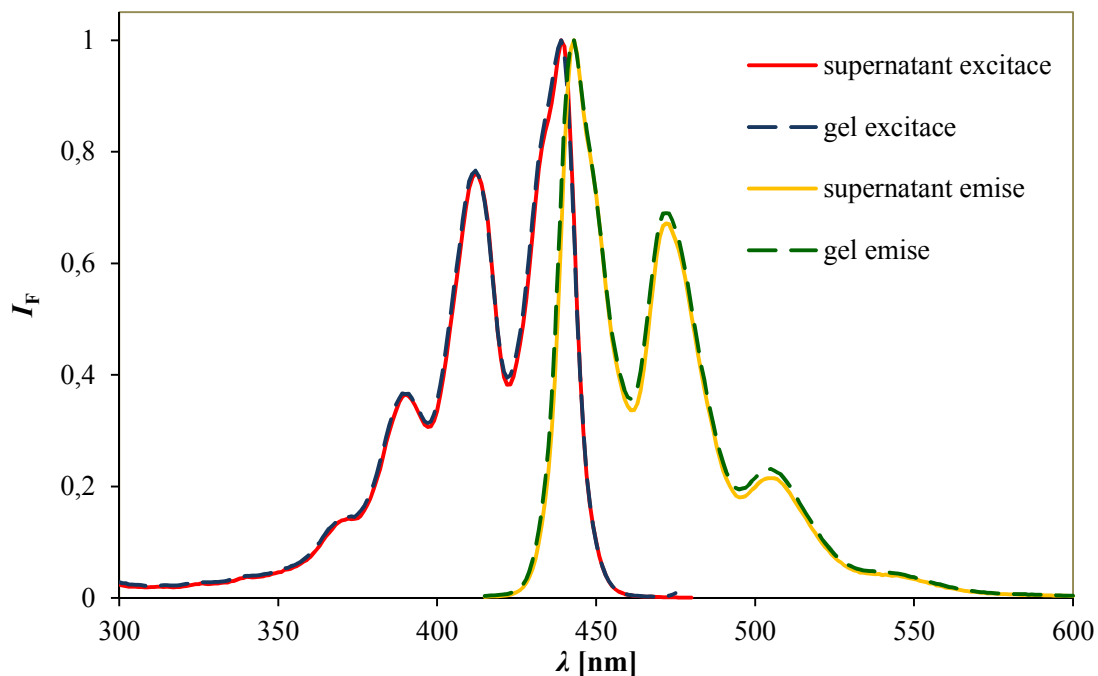
Co se týče stárnutí gelu, hydrofobní oblasti projevují z mikroviskozitního hlediska stálost oproti hydrofilní části, jejíž viskozita z pohledu molekul rhodaminu 6G klesla během 14 dní zhruba o 20 %.



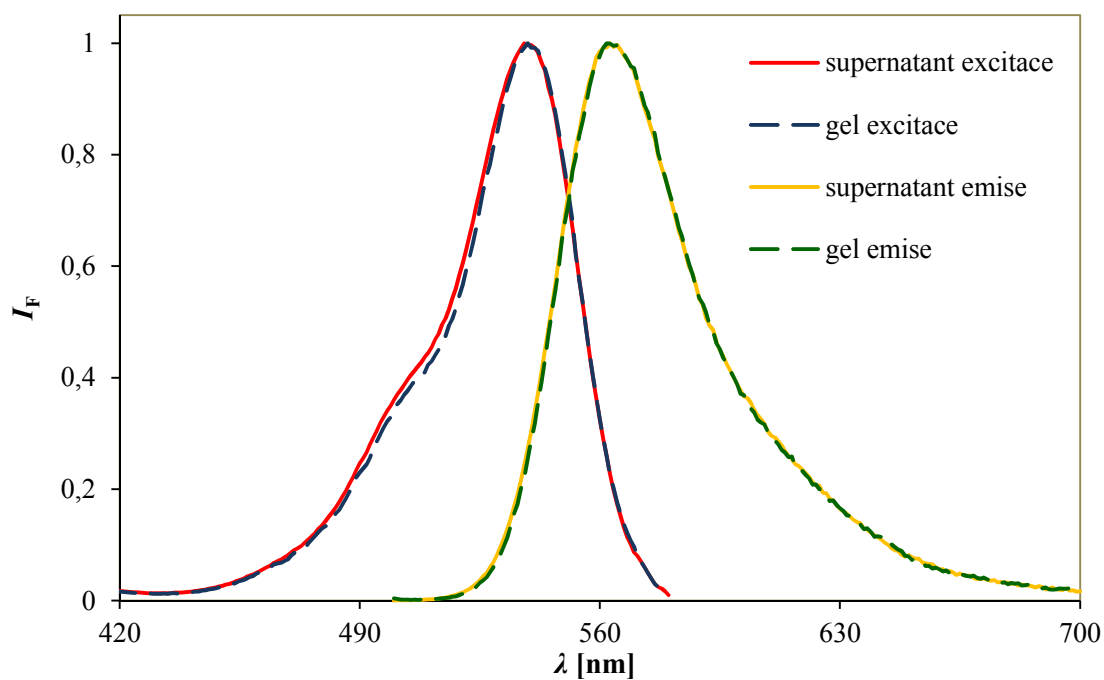
Obr. 32 Ekvivalentní viskozita hydrofobních domén a hydrofilní části kondenzované fáze v systému Hya-CTAB-NaCl v rámci jejího 14denního stárnutí.

5.5.4 Gelová fáze v porovnání se supernatantem

Na následujících Obr. 33 a Obr. 34 jsou porovnána normalizovaná excitační a emisní spektra perylenu a rhodaminu 6G mezi gelovou fází a supernatantem po sedmidenním stárnutí gelu.



Obr. 33 Normalizovaná excitační a emisní spektra perylenu v gelové fázi a supernatantu systému Hya-CTAB-NaCl po 7 dnech stání.



Obr. 34 Normalizovaná excitační a emisní spektra rhodaminu 6G v gelové fázi a supernatantu systému Hya-CTAB-NaCl po 7 dnech stání.

Jak je z nich patrné, obě fluorescenční sondy mají shodnou fluorescenční odezvu ze supernatantu jako z gelového prostředí, z čehož lze usuzovat, že je supernatant tvořen micelárním roztokem CTAB, který je tvořen přebývajícím množstvím molekul tenzidu, které se nepodílely na vzniku kondenzované fáze. Naměřené hodnoty anizotropie perylenu $\langle r \rangle = 0,0248 \pm 0,0009$, průměrného rotačního korelačního času $\tau_{\text{rot}} = (1,63 \pm 0,13)$ ns i dob života $\tau_1 = (2,87 \pm 0,07)$ ns a $\tau_2 = (5,89 \pm 0,10)$ ns taktéž odpovídají micelárnímu roztoku CTAB v prostředí 0,15M NaCl.

Pro zjištění, zda v průběhu stárnutí gelu dochází k difúzi molekul daných fluorescenčních sond mezi kondenzovanou a kapalnou fází, byly porovnány jejich totální intenzity fluorescence (získané z dat při měření ustálené anizotropie fluorescence) v gelové fázi a supernatantu v jednotlivých měřených vzorcích. Získané poměry intenzity fluorescence supernatant/gelová fáze jsou uvedeny v následující Tab. 15.

Tab. 15 Poměr totální intenzity fluorescence perylenu, resp. rhodaminu 6G z prostředí supernatantu a gelu.

stáří gelu [den]	Perylen	Rhodamin 6G
	$I_T(\text{supernatant})/I_T(\text{gel})$	$I_T(\text{supernatant})/I_T(\text{gel})$
1	5,62	0,42
7	5,74	0,79
14	5,57	1,68

Ze získaných čísel vyplývá, že zatímco poměr molekul perylenu v supernatantu a gelové fázi zůstává prakticky neměnný a tedy nedochází k jejich migraci, u rhodaminu 6G v průběhu stárnutí gelu pravděpodobně dochází k přesunu jeho molekul z kondenzované do kapalně fáze. Tento fakt bude spjatý s nestálostí mikroprostředí okolo molekul rhodaminu, které se v průběhu 14 dní stávalo z jeho pohledu méně viskózním.

Co se týče zabudovaného množství molekul daných fluorescenčních sond v gelové fázi, hydrofobní perylen vykazoval daleko větší fluorescenci ze supernatantu, což svědčí o tom, že se převážná část micel z 200mM roztoku CTAB se neúčastnila formace kondenzovaného systému. Naproti tomu molekuly rhodaminu byly po vzniku gelové fáze převážně zabudovány v její trojrozměrné síti, ze které pak v průběhu stárnutí difundovaly do supernatantu.

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla nejprve vypracována literární rešerše na téma technika anizotropie fluorescence a časově-rozlišené anizotropie fluorescence ve výzkumu koloidních systémů. Hlavním cílem této práce pak bylo navržení a provedení experimentů se zaměřením se na studium kapalných a kondenzovaných systémů polymer-tenzid a následné zhodnocení naměřených výsledků s přihlédnutím na jejich mikroviskozitní vlastnosti. K tomuto studiu byly vybrány systémy založené na interakcích mezi hyaluronanem a kationtovým tenzidem cetyltrimethylamonium bromidem ve vodném prostředí a v prostředí 0,15M chloridu sodného, které by mohly být potenciálně využity pro cílenou distribuci léčiv. U jednotlivých vzorků bylo provedeno měření excitačních a emisních spekter, anizotropie ustálené fluorescence, časově-rozlišené fluorescence a časově-rozlišené anizotropie fluorescence.

K porovnávání mikroviskozitních vlastností těchto systémů bylo použito určování ekvivalentní viskozity, tj. viskozity homogenního prostředí, ve kterém má daná fluorescenční sonda shodnou odezvu jako v případě měřeného vzorku. K tomuto účelu byly pro použité fluorescenční sondy – perylen a rhodamin 6G, naměřeny závislosti anizotropie ustálené fluorescence a průměrné rotační korelační doby na viskozitě vzorku obsahujícího směs glycerolu s vodou, které byly posléze použity jako kalibrační křivky.

Z důvodu lepší možnosti srovnání viskozity mikroprostředí hydrofobních agregátů vznikajících na řetězci hyaluronanu v kapalně fázi a hydrofobních domén uvnitř gelové fáze byly s perylenem namíchány a proměřeny různé micelární roztoky CTAB. Bylo zjištěno, že se ekvivalentní viskozita micelárních jader pohybuje v rozmezí 45–61 mPa·s.

Jednou z podstatných vlastností nosičového systému je jeho schopnost inkorporovat hydrofobní látku. Z tohoto důvodu je důležitá přítomnost hydrofobních domén v jeho struktuře. Proto byly interakce v systému Hya-CTAB při koncentracích tenzidu 100–10krát nižších než hodnota jeho CMC sledovány se zaměřením se na vznik a mikroviskozitní vlastnosti hydrofobních domén. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen, který vzhledem ke své hydrofobní povaze měl v tomto systému simulovat chování hydrofobního léčiva. Konkrétně se jednalo o dvě koncentrační řady – ve vodném prostředí a v prostředí 0,15M NaCl, ve kterých byla konstantní koncentrace hyaluronanu $0,015 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace CTAB se v nich zvyšovala v rozmezí $0,01\text{--}0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ve vodném prostředí již po prvních přídavcích CTAB ($0,01\text{--}0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) do roztoku Hya docházelo k rostoucí uspořádanosti systému a počátkům agregace, jejímž výsledkem byly pravděpodobně malé micely navázané na řetězci hyaluronanu, u kterých byly stanoveny zhruba 1,8–2krát vyšší hodnoty ekvivalentní viskozity mikroprostředí v porovnání s micelárními jádry volných micel CTAB. Od koncentrace CTAB $0,06 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pak docházelo k fázové separaci a tvorbě čiré kondenzované fáze ulpívající na stěně vialky, která jasně dokazovala probíhající interakce mezi řetězci hyaluronanu a molekulami CTAB. V prostředí 0,15M NaCl se v rámci této sady vzorků kondenzovaná fáze netvořila, jelikož vlivem přídavku nízkomolekulárního elektrolytu do systému došlo velmi pravděpodobně k jeho nežádoucímu přebudování, jehož důsledkem byl vznik volných micel již od prvních a velmi nízkých koncentrací CTAB, jenž byl preferován před agregáty navázanými na řetězci Hya. Ze začátku koncentrační řady ($0,01\text{--}0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB) se

jednalo o velmi malé, nedokonalé a silně hydratované micely, u nichž byly stanoveny vyšší hodnoty mikroviskozity v porovnání s micelárními roztoky CTAB (nad CMC) vlivem jejich přechodně rigidnějšího prostředí s ohledem na solubilizované molekuly perylenu. Následně u vzorků s koncentrací CTAB pohybující se v rozmezí $0,06\text{--}0,1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ již získané hodnoty stanovených veličin naznačily přítomnost plně vytvořených malých volných micel CTAB v roztoku.

V další části této práce byly studovány mikroviskozitní vlastnosti kondenzovaných fází v systému Hya-CTAB-NaCl, které se v prostředí $0,15\text{M}$ NaCl ochotně vytváří při vysokých koncentracích tenzidu (zde byla použita koncentrace CTAB přibližně 100krát vyšší než hodnota CMC), a to z pohledu jejich změn při čtrnáctidenním stárnutí vzorků. Perylen sloužil ke zjištění změn mikroviskozity hydrofobních domén, ke studiu hydrofilní části gelu byl jako fluorescenční sonda použit rhodamin 6G. Ukázalo se, že v průběhu 14 dní se mikroviskozitní vlastnosti hydrofobních domén nijak nezměnily a lze je tedy označit jako stálé, oproti tomu mikroviskozita hydrofilní části z pohledu rhodaminu 6G klesla během 14 dní přibližně o 20 %. Dále bylo zjištěno, že supernatant (kapalná fáze vzniklá při gelaci po separaci fází), obsahuje poměrně velké množství micelárních útvarů CTAB, které se neúčastnily tvorby kondenzované fáze. Co se týče migrace molekul fluorescenčních sond mezi kapalnou a kondenzovanou fází při čtrnáctidenním stání vzorku, bylo shledáno, že poměr počtu molekul perylenu v kondenzované fázi a kapalně fázi se prakticky nezměnil, kdežto molekuly rhodaminu, které byly po separaci fází převážně zabudovány v gelové síti, pak v průběhu stárnutí gelu pravděpodobně difundovaly do supernatantu.

Potvrdilo se, že techniky založené na měření anizotropie ustálené fluorescence a časově-rozlišené anizotropie fluorescence jsou vhodné pro studium kapalných i kondenzovaných systémů polymer-tenzid a při použití vhodné fluorescenční sondy poskytují velmi cenné informace o mikroviskozitních vlastnostech jejich jednotlivých částí. Především časově-rozlišená anizotropie fluorescence se ukázala jako velmi citlivá metoda pro rozpoznání již velmi malých strukturních změn odrážejících se ve změně viskozity mikroprostředí kolem molekul fluorescenční sondy. Získané informace z anizotropního měření a z nich vyvozené závěry o interakcích v systému Hya-CTAB při nízkých koncentracích tenzidu korespondují a zároveň rozšiřují již dříve stanovené závěry o vlastnostech tohoto systému, které byly stanoveny pomocí jiných, především fluorescenčních technik v rámci závěrečných prací dalších studentů zabývajících se touto problematikou [67–69]. Taktéž se ukázalo, že lze anizotropní měření použít i ke studiu mikroviskozitních vlastností gelových systémů, přičemž tato diplomová práce rozšířila pole získaných informací ohledně kondenzované fáze vznikající v systému Hya-CTAB-NaCl při vysoké koncentraci tenzidu, kterou se z různých hledisek (příprava, reologické vlastnosti, obsah sušiny, termogravimetrické vlastnosti, solubilizační schopnosti, difúzní procesy aj.) již zabývaly i jiné závěrečné práce [69, 70].

7 LITERATURA

- [1] FIŠAR, Z. 1. Principy fluorescenční spektroskopie. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. 2003, červenec 2009 [cit. 2014-01-16]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [2] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [3] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 387 s. ISBN 35-272-9919-X.
- [4] SEKO, T., K. OGURA, Y. KAWAKAMI, H. SUGINO, H. TOYOTAMA systém TANAKA. Excimer emission of anthracene, perylene, coronene and pyrene microcrystals dispersed in water. *Chemical Physics Letters*. 1998, vol. 291, 3-4, s. 438-444. DOI: 10.1016/S0009-2614(98)00629-0.
- [5] NELSON, K.A., D.D. DLOTT a M.D. FAYER. Excited state dynamics in pure molecular crystals: perylene and the excimer problem. *Chemical Physics Letters*. 1979, vol. 64, issue 1, s. 88-93. DOI: 10.1016/0009-2614(79)87282-6.
- [6] ZHANG, Li-zhu, et al. Development of Rhodamine Dyes for Biochemical Application. Dostupné z: <http://finechem.dlut.edu.cn>
- [7] FISCHER, M a J GEORGES. Use of thermal lens spectrometry for the investigation of dimerization equilibria of rhodamine 6G in water and aqueous micellar solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1997, vol. 53, issue 9, s. 1419-1430. DOI: 10.1016/S0584-8539(97)00027-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584853997000275>
- [8] MARTÍNEZ, V., F. LÓPEZ ARBELOA, J. BAÑUELOS PRIETO a I. LÓPEZ ARBELOA. Characterization of Rhodamine 6G Aggregates Intercalated in Solid Thin Films of Laponite Clay. 2 Fluorescence Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, vol. 109, issue 15. DOI: 10.1021/jp050440i. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp050440i>
- [9] ZEHENTBAUER, Florian M., Claudia MORETTO, Ryan STEPHEN, Thangavel THEVAR, John R. GILCHRIST, Dubravka POKRAJAC, Katherine L. RICHARD a KIEFER. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, vol. 121, s. 147-151. DOI: 10.1016/j.saa.2013.10.062.
- [10] HASCALL, V. C., LAURENT, T. C. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997. [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- [11] COWMAN, K. M., MATSUOKA, S.: Experimental approaches to Hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s.791 – 809
- [12] JACOBONI, I., et al. Hyaluronic acid by atomic force microscopy. *Journal of structural biology*, 1999, 126.1: 52-58.

- [13] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online]. 1998, březien [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- [14] SPICER, A., MCDONALD, J. Eukaryotic Hyaluronan Synthases. *Glycoforum* [online]. 1998, září [cit. 2014-03-11]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- [15] WEIGEL, P. H. Bacterial hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online]. 1998, září [cit. 2014-03-11]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp>
- [16] STERN, R.: Update on the mammalian hyaluronidases. *Glycoforum* [online], 2004, [cit. 23.3.2014], Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [17] ASARI, A.: Novel functions of hyaluronan oligosaccharides. *Glycoforum* [online], 2005, [cit. 23.3.2014]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [18] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [19] HOLMBERG, K, B JONSONN a KRONBERG. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003, 545 s. ISBN 04-714-9883-1.
- [20] FENGER, R., E. FERTITTA, H. KIRMSE, A. F. THÜNEMANN a K. RADEMANN. Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012, vol. 14, issue 26, s. 9343-. DOI: 10.1039/C2CP40792B.
- [21] CLARKE. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009-03-01, vol. 2009, issue 3. DOI: 10.1101/pdb.prot5177.
- [22] LINKE. Chapter 34 Detergents. s. 603. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63034-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909630342>
- [23] KWAK, Jan C. *Polymer-surfactant systems*. New York: M. Dekker, 1998. ISBN 08-247-0232-8.
- [24] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [25] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Karin. BERGFELDT. Phase behavior of systems of polyacrylate and cationic surfactants. *Langmuir*. 1991, vol. 7, issue 12, s. 2893-2898. DOI: 10.1021/la00060a005.
- [26] MALOVIKOVA, Anna, Katumitu HAYAKAWA a Jan C. T. KWAK. Surfactant-polyelectrolyte interactions. 4. Surfactant chain length dependence of the binding of alkylpyridinium cations to dextran sulfate. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984, vol. 88, issue 10, s. 1930-1933. DOI: 10.1021/j150654a002.

- [27] KHAN, Mohammad Yunus, Abhijit SAMANTA, Keka OJHA a Ajay MANDAL. Interaction between aqueous solutions of polymer and surfactant and its effect on physicochemical properties. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2008, vol. 3, issue 5, s. 579-585. DOI: 10.1002/apj.212.
- [28] ŠKERJANC, Jože a Davorin DOLAR. Thermodynamic properties of a polyelectrolyte solution containing a mixture of counterions differing in charge. *The Journal of Chemical Physics*. 1989, vol. 91, issue 10, s. 6290-. DOI: 10.1063/1.457395.
- [29] HERSLOEF, Aasa, Lars Olof SUNDELOEF a Katarina EDSMAN. Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water systém. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, vol. 96, issue 5, s. 2345-2348. DOI: 10.1021/j100184a061.
- [30] THALBERG, K., LINDMAN, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, roč. 93, č. 4, s. 1478-1483. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100341a058.
- [31] THALBERG, Kyrre. a Bjoern. LINDMAN. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*. 1991, vol. 7, issue 2, s. 277-283. DOI: 10.1021/la00050a013.
- [32] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Gunnar. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10, s. 4289-4295. DOI: 10.1021/j100373a075.
- [33] THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, vol. 95, issue 8. DOI: 10.1021/j100161a073.
- [34] THALBERG, K., LINDMAN, B., KARLSTROEM, G. Phase behavior of a systém of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, roč. 95, č. 15, s. 6004-6011. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100168a053.
- [35] THALBERG, Kyrre, Jan VAN STAM, Cecilia LINDBLAD, Mats ALMGREN a Bjoern LINDMAN. Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, vol. 95, issue 22. DOI: 10.1021/j100175a101.
- [36] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, vol. 391, 1-3, s. 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.

- [37] RUIZ, C. Fluorescence Anisotropy of Probes Solubilized in Micelles of Tetradecyltrimethyl-ammonium Bromide: Effect of Ethylene Glycol Added. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000-01-15, vol. 221, issue 2. DOI: 10.1006/jcis.1999.6555.
- [38] CHANTRES, J. Deoxycholate alters the order of acyl chains in freeze-thaw extrusion vesicles of L- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine: Study of the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene steady-state fluorescence anisotropy. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996-07-26, vol. 138, issue 2, s. 139-148. DOI: 10.1016/0378-5173(96)04530-9.
- [39] CHANG, Y., PARK, C., KIM, K.T., KIM, C. Synthesis and Micellar Characteristics of Dendron-PEG Conjugates. *Langmuir*. 2005, roč. 21, č. 10, s. 4334-4339. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la047036f.
- [40] FIEJDASZ, Sylwia, Krzysztof SZCZUBIAŁKA, Joanna LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA a Maria NOWAKOWSKA. Biopolymer-based hydrogels as injectable materials for tissue repair scaffolds. *Biomedical Materials*. 2013-06-01, vol. 8, issue 3, s. 035013-. DOI: 10.1088/1748-6041/8/3/035013.
- [41] MARCHI, M. Claudia, Sara A. BILMES a R. Martín NEGRI. Microviscosity in the Cavities of Titania Gels Studied by Steady-State Fluorescence Anisotropy. *Langmuir*. 1997, vol. 13, issue 14, s. 3665-3673. DOI: 10.1021/la9700230.
- [42] SREENU, Madhumanchi, Rati Ranjan NAYAK, Rachapudi Badari Narayana PRASAD a Bojja SREEDHAR. Synthesis, surface and micellar properties of sodium N-oleoyl amino acids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 449, s. 74-81. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.02.037.
- [43] ZHOU, Haibo, Qianqian YANG a Xiaoyong WANG. Spectrometric study on the binding of curcumin with AOT: Effect of micelle-to-vesicle transition. *Food Chemistry*. 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.129.
- [44] KOMAROMY-HILLER, Gabor a Ray VON WANDRUSZKA. Anisotropy Changes of a Fluorescent Probe during the Micellar Growth and Clouding of a Nonionic Detergent. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, vol. 177, issue 1. DOI: 10.1006/jcis.1996.0016.
- [45] NICHIFOR, M., LOPES, S., BASTOS, M., LOPES A. Self-Aggregation of Amphiphilic Cationic Polyelectrolytes Based on Polysaccharides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, roč. 108, č. 42, s. 16463-16472. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp047267v.
- [46] MAITI, Nakul C., et al. Fluorescence dynamics of dye probes in micelles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101.51: 11051-11060.
- [47] RANA, Dipak Kumar, Soumyadipta RAKSHIT, Sayaree DHAR a Subhash Chandra BHATTACHARYA. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2013, vol. 270, s. 67-74. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2013.07.011.

- [48] CHEE, Choong Kooi, Steve RIMMER, Ramune RUTKAITE, Ian SOUTAR a Linda SWANSON. Time-resolved fluorescence anisotropy measurements in the study of poly(N-isopropyl acrylamide)-based systems: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool hel in Stockholm, 10-16 june, 1998. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2006, roč. 180, 1-2, s. 1-8. ISSN 10106030. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2006.01.018.
- [49] DORADO, A.P., I.F. PIÉROLA, Ramune RUTKAITE, Ian SOUTAR a Linda SWANSON. Rotational motions of probes and labels in polyethylacrylate networks studied by time-resolved fluorescence anisotropy: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool hel in Stockholm, 10-16 june, 1998. *Journal of Luminescence*. 1997, 72-74, 1-2, s. 484-486. ISSN 00222313. DOI: 10.1016/S0022-2313(97)00208-1.
- [50] BISBY, Roger H., David J.S. BIRCH, Zheming WANG, Donald M FRIEDRICH a Ray VON WANDRUSZKA. A time-resolved fluorescence anisotropy study of bilayer membranes containing α -tocopherol: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool hel in Stockholm, 10-16 june, 1998. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989, roč. 158, č. 2, s. 386-391. ISSN 0006291x. DOI: 10.1016/S0006-291X(89)80059-2.
- [51] *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1990, roč. 1021, č. 1. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527369090384Z>.
- [52] SMITH, T. A., M. IRWANTO, D. J. HAINES, K. P. GHIGGINO a D. P. MILLAR. Time-resolved fluorescence anisotropy measurements of the adsorption of Rhodamine-B and a labelled polyelectrolyte onto colloidal silica. *Colloid*. 1998-11-27, roč. 276, č. 11, s. 1032-1037. ISSN 0303-402x. DOI: 10.1007/s003960050343.
- [53] SUHLING, Klaus, Jan SIEGEL, Peter M. P. LANIGAN, Sandrine LÉVÊQUE-FORT, Stephen E. D. WEBB, David PHILLIPS, Daniel M. DAVIS a Paul M. W. FRENCH. Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells. *Optics Letters*. 2004, roč. 29, č. 6, s. 584-. ISSN 0146-9592. DOI: 10.1364/OL.29.000584.
- [54] SÝKORA, J., L. BOUŘOVÁ, M. HOF, P. SVOBODA, Stephen E. D. WEBB, David PHILLIPS, Daniel M. DAVIS a Paul M. W. FRENCH.: Correlation with studies of DPH and Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*. 2012, roč. 102, č. 3, s. 498-506. ISSN 00063495. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.11.008.
- [55] KHARA, Dinesh Chandra, Anunay SAMANTA, Peter M. P. LANIGAN, Stephen E. D. WEBB, David PHILLIPS, Daniel M. DAVIS a Paul M. W. FRENCH. Rotational dynamics of positively and negatively charged solutes in ionic liquid and viscous molecular solvent studied by time-resolved fluorescence anisotropy measurements. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010, roč. 12, č. 27, s. 7671-. ISSN 1463-9076. DOI: 10.1039/B925099A.
- [56] CHRISTENSEN, Ronald L., Rodney C. DRAKE a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence anisotropy of perylene. *The Journal of Physical Chemistry*. 1986, roč. 90, č. 22, s. 5960-5967. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100280a100.

- [57] PISTON, David W., Timothy BILASH a Enrico GRATTON. Compartmental analysis approach to fluorescence anisotropy: perylene in viscous solvents. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, vol. 93, issue 10, s. 3963-3967. DOI: 10.1021/j100347a019.
- [58] BARKLEY, Mary D. Fluorescence decay studies of anisotropic rotations of small molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1981, roč. 75, č. 7, s. 3581-3594, ISSN 00219606. DOI: 10.1063/1.442468.
- [59] SZUBIAKOWSKI, Jacek, Aleksander BALTER, Wiesław NOWAK, Andrzej KOWALCZYK, Krzysztof WIŚNIEWSKI a Małgorzata WIERZBOWSKA. Anisotropic reorientation of perylene and 3,9-dibromoperylene in glycerol: fluorescence anisotropy decay and quantum-mechanical study. *Chemical Physics*. 1996, vol. 208, issue 2, s. 283-296. DOI: 10.1016/0301-0104(96)00104-8.
- [60] MCCARROLL, Matthew E, Alan G JOLY, Zheming WANG, Donald M FRIEDRICH a Ray VON WANDRUSZKA. Time-Resolved Fluorescence Anisotropies in Mixed Surfactant Solutions: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 June, 1998. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999, roč. 218, č. 1, s. 260-264. ISSN 00219797. DOI: 10.1006/jcis.1999.6414.
- [61] VAN ZANDVOORT, M. A. M. J., H. C. GERRITSEN, G. VAN GINKEL, Y. K. LEVINE, R. TARRONI a C. ZANNONI. Distribution of Hydrophobic Probe Molecules in Lipid Bilayers. 2. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Study of Perylene in Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997, vol. 101, issue 20, s. 4149-4154. DOI: 10.1021/jp9634159.
- [62] TLEUGABULOVA, Dina, Zheng ZHANG, Yang CHEN, Michael A. BROOK a John D. BRENNAN. Fluorescence Anisotropy in Studies of Solute Interactions with Covalently Modified Colloidal Silica Nanoparticles. *Langmuir*. 2004, vol. 20, issue 3. DOI: 10.1021/la0357561.
- [63] TLEUGABULOVA, Dina, Jie SUI, Paul W. AYERS a John D. BRENNAN. Evidence for Rigid Binding of Rhodamine 6G to Silica Surfaces in Aqueous Solution Based on Fluorescence Anisotropy Decay Analysis. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, vol. 109, issue 16, s. 7850-7858. DOI: 10.1021/jp045569r.
- [64] HUNGERFORD, Graham, Klaus SUHLING a João A FERREIRA. Comparison of the fluorescence behaviour of rhodamine 6G in bulk and thin film tetraethylorthosilicate derived sol-gel matrices. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1999, vol. 129, 1-2, s. 71-80. DOI: 10.1016/S1010-6030(99)00176-8.
- [65] NARANG, Upvan, et al. Effects of aging on the dynamics of rhodamine 6G in tetramethyl orthosilicate-derived sol-gels. *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, 98.1: 17-22.
- [66] SEGUR, J. B. a Helen E. OBERSTAR. Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions. *Industrial*. 1951, vol. 43, issue 9, s. 2117-2120. DOI: 10.1021/ie50501a040. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50501a040>

- [67] STIBORSKÝ, F. *Studium agregace v systému biopolymer-tenzid za nízkých koncentrací tenzidu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 40 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [68] ŠEJNOHOVÁ, M. *Agregační procesy v systémech amfifilní látka-polymer*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 40 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [69] HALASOVÁ, T. *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 160 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [70] KOHUTOVÁ, L. *Studium fyzikálních gelů s hydrofobními doménami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 160 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

ADC	analog-to-digital convertor (analogově-digitální konvertor)
CAC	kritická agregační koncentrace
CFD	constant function discriminator (diskriminátor konstantní funkce)
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
C _n TAB	alkyltrimethylamonium bromid s n počtem uhlíků v alkylovém řetězci
CV	krystalová violet
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPH	1,6-difenylhexa-1,3,5-trien
EG	ethylen glykol
excimer	excitovaný dimer
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
HAS1, HAS2, HAS3	hyaluronansyntázy
HH	horizontálně-horizontálně (orientace polarizátorů)
HV	horizontálně-vertikálně (orientace polarizátorů)
Hya	hyaluronan
IC	vnitřní konverze
ICS	mezisystémový přechod
M	mol·dm ⁻³
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	povrchově aktivní látka
PISCI	intracytoplazmatická injekce předvybraných spermií
PGA	programmable gain amplifier (programovatelný zesilovač)
PEG	polyethylen glykol
SDS	dodecylsulfát sodný
TAC	time-to-amplitude convertor (konvertor času na amplitudu)
TCSPC	time-correlated single photon counting (metoda časově-korelovaného čítání fotonů)
TRITC	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického spektra
VH	vertikálně-horizontálně (orientace polarizátorů)
VIS	viditelná oblast elektromagnetického spektra
VV	vertikálně-vertikálně (orientace polarizátorů)
WD	window discriminator

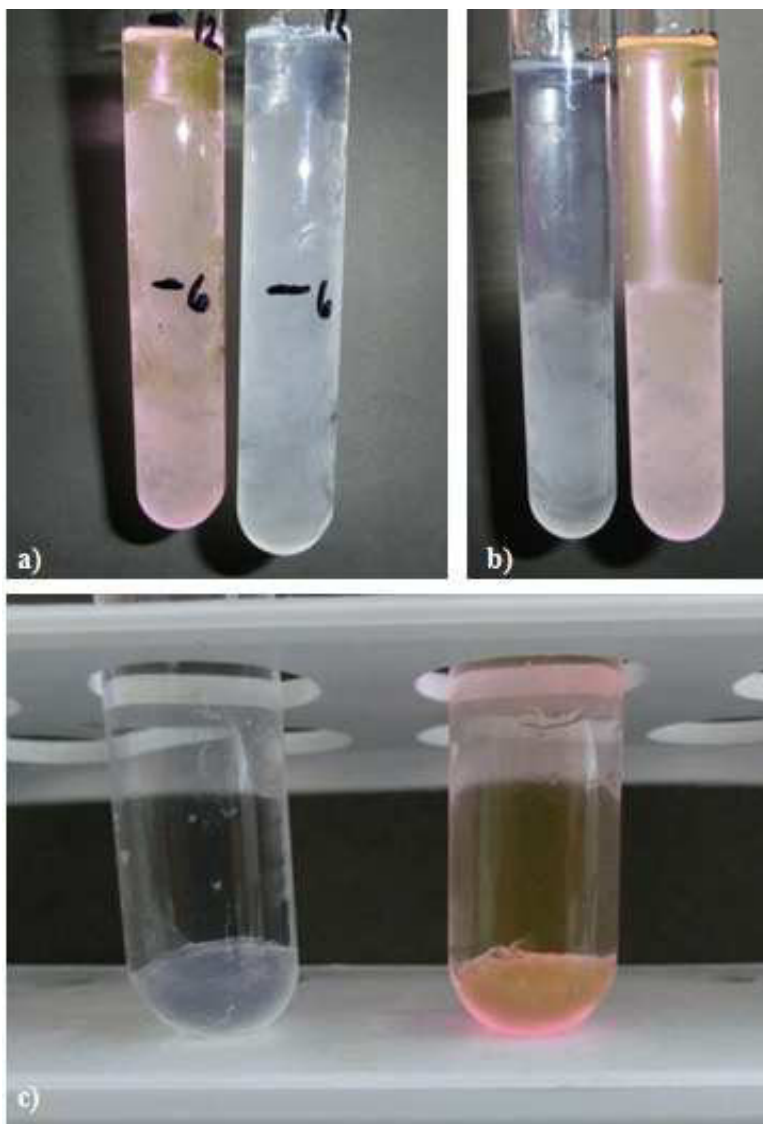
8.2 Seznam symbolů

A	fitovací parametr
B_i	před-exponenciální funkce
c	koncentrace
D	difúzní koeficient
D_t	translační difúzní koeficient
D_r	rotační difúzní koeficient
f_i	frakční intenzita fluorescence
F	síla proudící kapaliny
g	tvárový faktor
$G(\lambda_{em})$	G-faktor pro danou emisní vlnovou délku
i_F	intenzita fluorescence
$i(t)$	totální časově-rozlišená intenzita fluorescence
$i_{ }(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
$i_{\perp}(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
I	intenzita fluorescence
I_T	totální intenzita fluorescence
$I_{ }$	intenzita fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
I_{\perp}	intenzita fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
k	Boltzmannova konstanta
k_{nr}^S	rychlostní konstanta nezářivého přechodu ze stavu S_1 do stavu S_0
k_q	rychlostní konstanta zhasení
k_r^S	rychlostní konstanta zářivého přechodu ze stavu S_1 do stavu S_0
k_1	rychlostní konstanta difúze
n	počet dat
N_A	Avogadrova konstanta
$N(t_k)$	naměřená data (kapitola 4.2.4.1)
$N_c(t_k)$	matematický model (kapitola 4.2.4.1)
p	počet parametrů volnosti
\overline{p}	polarizační stupeň
r	anizotropie fluorescence nebo poloměr koule
\overline{r}	průměrná, resp. ustálená hodnota anizotropie fluorescence
r_0	fundamentální anizotropie
r_{∞}	residuální anizotropie
$r(t)$	okamžitá, resp. časově-rozlišená hodnota anizotropie fluorescence
R_c	vzdálenost mezi molekulou fluoroforu a zhasěče při jejich nejbližším přiblížení
$R(\infty)$	infinitní anizotropie
$R(0)$	počáteční anizotropie
s	vazebný faktor
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly

t	čas
T	teplota
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
v	rychlost proudění kapaliny nebo počet stupňů volnosti
V	hydrodynamický objem
V_f	volný objem
V_0	Van der Waalsův objem
w	hmotnostní zlomek
β	úhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly
η	dynamická viskozita
θ	úhel mezi dipólovým momentem přechodu molekuly a rovinou polarizace excitujícího záření
λ_{em}	emisní vlnová délka
λ_{exc}	excitační vlnová délka
λ_{max}	vlnová délka maximální emise
ζ	třecí koeficient
σ_k	standardní odchylka každého datového bodu
τ	tečné napětí
τ	průměrná doba života
τ_i	doba života i -té složky směsi
τ_r	zářivá doba života
τ_{rot}	rotační korelační čas
τ_s	doba života excitovaného stavu S_1
Φ_F	kvantový výtěžek
χ^2	parametr správnosti proložení dat
χ_R^2	redukovaný parametr správnosti proložení dat
$[\]$	koncentrace
$\langle \rangle$	průměrná hodnota
*	excitovaný stav

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 – průběh gelace



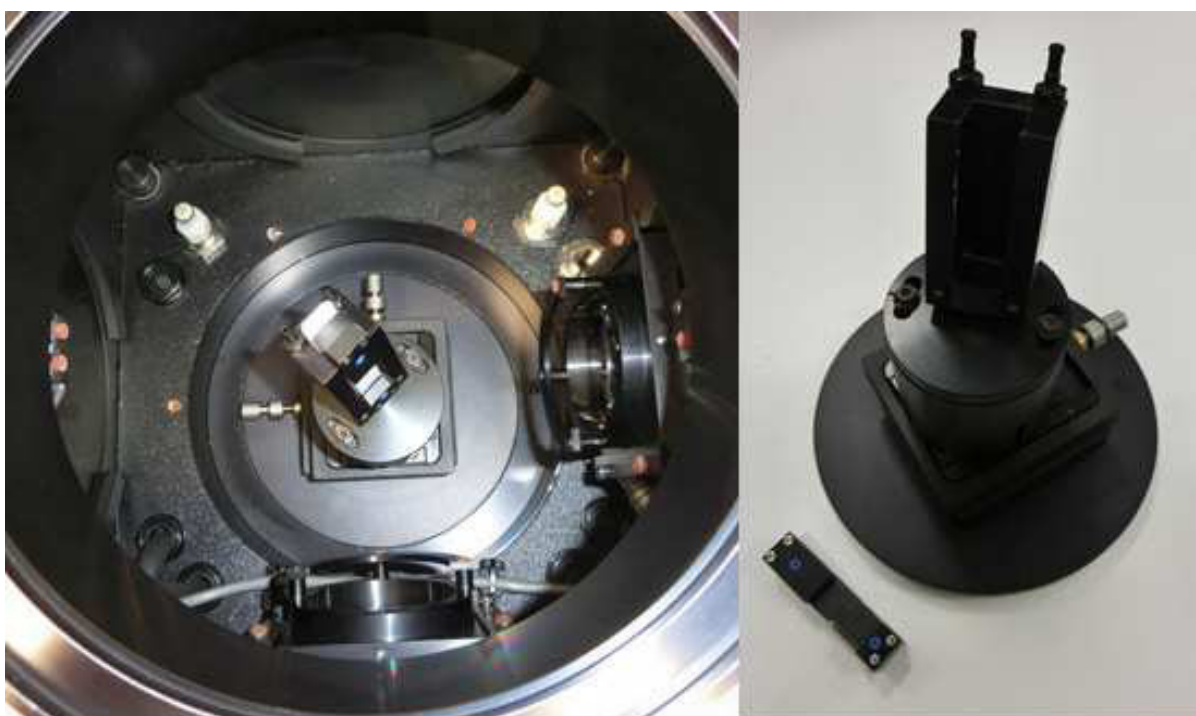
Obr. 35 *Vznik gelu po smíchání 200mM roztoku CTAB v 0,15M NaCl a 0,5% roztoku hyaluronu taktéž v 0,15M NaCl. Čirý gel obsahuje jako fluorescenční sondu perylen, růžový gel obsahuje rhodamin 6G. Obrázek za a) zobrazuje vzorek ihned po přidání roztoku hyaluronanu k roztoku CTAB. Za b) zobrazuje vzorky 5 minut po promíchání na vibračním míchadle. Na obrázku c) jsou vzniklé gelové fáze po 24 hodinách stání.*

9.2 Příloha 2 – měření gelových vzorků na Fluorologu



Obr. 36 *Nachystaný gelový vzorek k měření na Fluorologu. Gel je v tenké vrstvě nanesen mezi dvě křemenná skla, které jsou diagonálně umístěny v klasické křemenné kyvetě.*

9.3 Příloha 3 – nástavec na gelové vzorky, Fluorocube



Obr. 37 *Použitý nástavec pro měření gelových vzorků na přístroji Fluorocube.*