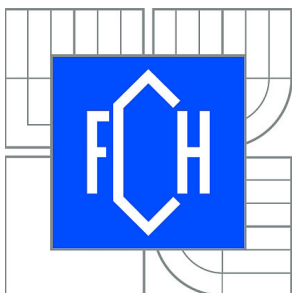


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE VE VÝZKUMU KAPALNÝCH A KONDENZOVANÝCH SYSTÉMŮ NA BÁZI BIOPOLYMER-TENZID.

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE STUDY OF LIQUID AND CONDENSED SYSTEMS BASED
ON BIOPOLYMER-SURFACTANT INTERACTIONS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

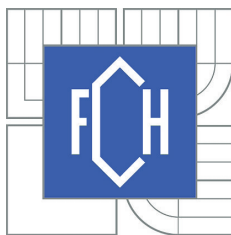
Bc. LADISLAVA ČERNÁ

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-DIP0800/2013 | Akademický rok: 2013/2014 |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | |
| Student(ka): | Bc. Ladislava Černá | |
| Studijní program: | Spotřební chemie (N2806) | |
| Studijní obor: | Spotřební chemie (2806T002) | |
| Vedoucí práce | Ing. Filip Mravec, Ph.D. | |
| Konzultanti: | Ing. Jakub Mondek | |

Název diplomové práce:

Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu kapalných a kondenzovaných systémů na bázi biopolymer-tenzid.

Zadání diplomové práce:

- 1) Shromáždit literární poznatky o využití techniky časově rozlišené fluorescence ve výzkumu koloidních systémů.
- 2) Seznámit se s technikami časově rozlišené fluorescence a to především se technikou časově rozlišených emisních spekter.
- 3) Navrhnout, provést a porovnat časově rozlišená emisní spektra v roztoku a v kondenzovaných systémech polymer-tenzid s vhodnou fluorescenční sondou.
- 4) Zhodnotit výsledky z hlediska strukturních podobností kapalných a kondenzovaných fází potencionálních nosičových systémů na bázi biopolymer-tenzid.

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. Ladislava Černá
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

Tato práce se zabývá studiem vlastností hydrogelu, který vzniká na základě elektrostatické i hydrofóbní interakce mezi hyaluronanovým řetězcem a micelami kationtového tenzidu. Byl použit nativní hyaluronan sodný o molekulové hmotnosti 750–1 000 kDa, kationtovým tenzidem byl CTAB (cetyltrimethylammonium bromid). Tento hydrogel byl posuzován z hlediska použitelnosti jako materiál pro vytvoření nosiče léčiv. Hydrogely byly vytvářeny smícháním 200mM roztoku CTAB s 0,5% roztokem hyaluronanu, kdy rozpouštědlem obou těchto roztoků byl vodný roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, který měl simulovat prostředí fyziologického roztoku. Pro zkoumání hydrogelu byly použity techniky ustálené fluorescence a časově rozlišené fluorescence, konkrétně bylo použito časově rozlišených emisních spekter (TRES) a dekonvoluce emisního spektra celého vzorku pomocí parametrů poklesů intenzity fluorescence při daných vlnových délkách. Zvolené systémy byly zkoumány pomocí fluorescenčních sond prodan, laurdanu a rhodaminu 6G. První dvě sondy se v gelu nacházely ve třech různých mikroprostředích v rámci micel a nebyly lokalizované ve vodném prostředí. Rhodamin 6G poukázal na výrazné zredukování vodného prostředí v hydrogelu oproti čistě micelárnímu systému a na výrazné obsazení povrchu micel řetězcem hyaluronanu. Nebyly zjištěny žádné interakce sond s hyaluronanovým řetězcem. Čerstvě vytvořený hydrogel vykázal téměř stejné výsledky jako hydrogel po týdnu zrání pod svým supernatantem.

ABSTRACT

This thesis studies properties of hydrogel, which arises on the basis of electrostatic and hydrophobic interactions between hyaluronan chain and micelles of cationic surfactant. A native sodium hyaluronan at molecular weight 750–1 000 kDa and a cationic surfactant CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) were used. This hydrogel was assessed as a material for drug delivery systems. The hydrogels were made by mixing 200mM CTAB with 0.5% hyaluronan, both dissolved in 0.15M aqueous solution of NaCl simulating physiological solution. Methods used in this study were steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, more accurately time-resolved emission spectra (TRES) and deconvolution of steady-state emission spectra of a whole sample by means of parameters gained from fluorescence intensity decays at a set of wavelenghts. Selected systems were investigated by three fluorescent probes, prodan, laurdan and rhodamine 6G. The first two mentioned probes were in hydrogel localized only within micelles in three different microenvironments. Rhodamine 6G pointed out that in hydrogel the aqueous environment is significantly restricted in comparison to purely micellar solution. In addition, rhodamine informed about less available micelle surfaces, caused by hyaluronan chains occupation. There were no interactions between the probes and hyaluronan chains. Freshly made hydrogels showed almost the same results as after a week of maturation under its supernatant.

KLÍČOVÁ SLOVA

časově rozlišená emisní spektra, hydrogel, hyaluronan, prodan, laurdan, rhodamin 6G

KEYWORDS

time-resolved emission spectra, hydrogel, hyaluronan, prodan, laurdan, rhodamine 6G

ČERNÁ, L. *Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu kapalných a kondenzovaných systémů na bázi biopolymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 78 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 studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD. za odborný dohled, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jakubu Mondekovi za pomoc při řešení teoretických otázek. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu při studiu.

OBSAH

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | ÚVOD..... | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 9 |
| 2.1 | Luminiscence | 9 |
| 2.1.1 | Jabłoňského diagram..... | 9 |
| 2.1.2 | Franck-Condonův princip..... | 11 |
| 2.1.3 | Charakteristiky fluorescence | 11 |
| 2.2 | Fluorescenční sondy..... | 12 |
| 2.2.1 | Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)..... | 13 |
| 2.2.2 | Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen)..... | 14 |
| 2.2.3 | Rhodamin 6G (rhodamin 590 chlorid) | 14 |
| 2.3 | Princip ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie | 15 |
| 2.3.1 | Ustálená fluorescenční spektroskopie | 15 |
| 2.3.2 | Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie | 16 |
| 2.3.2.1 | Význam doby života fluoroforu | 17 |
| 2.3.2.2 | Konstrukce pulzních fluorimetrů – metoda TCSPC..... | 18 |
| 2.3.2.3 | Analýza dat | 21 |
| 2.3.2.4 | Posouzení kvality proložení..... | 23 |
| 2.3.2.5 | Standardy dob života | 24 |
| 2.3.3 | Časově rozlišená emisní spektra..... | 24 |
| 2.3.3.1 | Procesy excitovaného stavu..... | 24 |
| 2.3.3.2 | Měření časově rozlišených emisních spekter | 25 |
| 2.3.4 | Závislost emisního spektra na excitační vlnové délce..... | 26 |
| 2.4 | Asociativní koloidy | 26 |
| 2.4.1 | Tvorba micel..... | 27 |
| 2.4.2 | Faktory ovlivňující tvorbu micel | 28 |
| 2.4.3 | Solubilizace | 29 |
| 2.5 | Hyaluronan..... | 29 |
| 2.5.1 | Obecná charakteristika | 29 |
| 2.5.2 | Struktura v roztoku | 30 |
| 2.5.2.1 | Primární a sekundární struktura..... | 30 |
| 2.5.2.2 | Terciální struktura..... | 32 |
| 2.5.3 | Využití | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.6 | Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy | 32 |
| 2.6.1 | Efekt přidání jednoduché soli..... | 34 |
| 3 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 35 |
| 3.1 | Časově rozlišená emisní spektra v koloidních systémech..... | 35 |
| 3.2 | Chování použitých fluorescenčních sond v micelárních a jiných systémech imitujících biologické membrány | 37 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 43 |
| 4.1 | Přístroje a vybavení..... | 43 |
| 4.1.1 | Systém Fluorolog (Horiba Scientific) | 43 |
| 4.1.2 | Systém Fluorocube (Horiba Scientific)..... | 43 |
| 4.2 | Použité programy | 44 |
| 4.3 | Chemikálie | 44 |
| 4.4 | Příprava vzorků | 44 |
| 4.5 | Nastavení přístrojů | 46 |
| 4.6 | Výsledky a diskuze | 47 |
| 4.6.1 | Zkoumání systému pomocí fluorescenčních sond prodanu a laurdanu..... | 47 |
| 4.6.1.1 | Prodan v micelárním roztoku | 47 |
| 4.6.1.2 | Prodan ve vodném roztoku | 49 |
| 4.6.1.3 | Laurdan v micelárním roztoku | 51 |
| 4.6.1.4 | Prodan v gelu | 53 |
| 4.6.1.5 | Prodan v ustáleném gelu..... | 55 |
| 4.6.2 | Zkoumání systému pomocí fluorescenční sondy rhodaminu 6G | 57 |
| 4.6.2.1 | Rhodamin 6G ve vodném roztoku..... | 57 |
| 4.6.2.2 | Rhodamin 6G v micelárním roztoku | 59 |
| 4.6.2.3 | Rhodamin 6G v gelu..... | 61 |
| 4.6.2.4 | Rhodamin 6G v ustáleném gelu..... | 63 |
| 5 | ZÁVĚR | 66 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 68 |
| 7 | SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK | 75 |
| 7.1 | Seznam symbolů | 75 |
| 7.2 | Seznam zkratk | 75 |
| 8 | PŘÍLOHY..... | 77 |

1 ÚVOD

Aplikace mnoha léčiv je spojena s problémy souvisejícími s nerozpustností léčiva, s jeho neefektivní distribucí, enzymatickou hydrolýzou a nedostatkem selektivity léčiva, která způsobuje nežádoucí vedlejší účinky. Příkladem problémové aplikace léčiva může být chemoterapie, která se dnes široce používá při léčbě rakoviny. Použitá léčiva jsou často toxická v necílových tkáních a mohou také vykazovat neuspokojivou rozpustnost a stabilitu. Navíc jejich efektivní doprava do místa určení může být znemožňována mnoha fyziologickými bariérami, hlavně v nepravidelně strukturovaných nádorech. Pro minimalizování těchto problémů spojených s aplikací léčiv jsou vyvíjeny systémy vylepšující dopravu léčiv – nosiče léčiv. Tyto nosiče by měly především umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň, soubor buněk (např. nádor), jednotlivou buňku nebo dokonce i jen buněčné kompartmenty, a tak zvýšit efektivitu léčby [1, 2, 3].

Největší pozornost se zaměřuje na vývoj nosičů kancerostatik a to především z důvodu vysoké společenské závažnosti nádorových onemocnění, která je dána jejich častým výskytem, dodnes mnohdy málo účinnou léčbou a s tím spojenou vysokou úmrtností. I přes intenzivní výzkum v této oblasti je naprostá většina těchto systémů ve stádiu laboratorních, předklinických a klinických zkoušek. Konkrétních léčiv schválených pro použití v humánní medicíně je jen několik [3].

Mezi nosiče léčiv se řadí polymerní nanočástice, dendrimery, liposomy a polymerní micely. Jedním z materiálů využívaných pro vytvoření nosičů léčiv jsou hydrogely. Jde o trojrozměrné hydrofilní polymerní sítě vytvořené z vodorozpustných polymerů, což zahrnuje široký rozsah chemických složení a celkových fyzikálních vlastností polymerů. Tyto polymery mohou absorbovat vodu o tisíckrát vyšší hmotnosti, než je jejich váha v suchém stavu, což jim propůjčuje fyzikální charakteristiky podobné měkkým tkáním. Hydratace těchto sítí se přitom děje bez rozpouštění polymeru. Hydrogely jsou díky vysokému obsahu vody vysoce propustné a umožňují pohyb kyslíku, živin a jiných ve vodě rozpustných metabolitů. Jejich porozita také umožňuje naplnění hydrogelu léčivem, které se potom postupně uvolňuje. Porozita přitom může být kontrolována hustotou spojů v hydrogelu. Kromě využití jako nosiče léčiv nacházejí hydrogely uplatnění i jako kontaktní čočky, rohovkové implantáty a scaffoldy pro regeneraci nové kůže, enkapsulaci buněk a pro regeneraci šlach a chrupavek [2, 4, 5].

Tato práce se zaměřuje na studium hydrogelu jako materiálu pro potenciální nosiče léčiv. Zkoumaný hydrogel byl vytvořen z polyaniontu, kterým byl hyaluronan, a kationtového tenzidu CTAB (cetyltrimethylammonium bromid). Tento hydrogel vzniká na základě asociace micel tenzidu na řetězci polymerního hyaluronanu, kdy funkci rozpouštění hydrofóbního léčiva zde zprostředkovávají micely a hyaluronan pak zastupuje biokompatibilní složku. Hyaluronan je schopen díky svému aniontovému charakteru prodlužovat cirkulační čas nosiče v krevním řečišti a díky schopnosti se vázat na specifické receptory umožňuje intenzivnější kontakt s cílovými tkáněmi.

Použitou technikou pro zkoumání vlastností hydrogelu byla fluorescenční spektroskopie. Díky její citlivosti, neinvazivnosti a schopnosti odkrýt specifické interakce i v komplexních systémech jde o jednu z hlavních metod výzkumu biochemických a biofyzikálních systémů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscence

Luminiscence je emise záření, která nastává z excitovaných elektronových stavů. K excitaci elektronu do energeticky vyššího stavu může dojít více mechanismy. Průchodem elektrického proudu vzniká elektroluminiscence, elektrochemickou reakcí galvanoluminiscence, energií pocházející z chemické reakce vzniká chemiluminiscence (v živých organismech se nazývá bioluminiscence), triboluminiscence je vyvolána třením, sonoluminiscence je buzena ultrazvukem, katodoluminiscence je způsobena dopadajícími elektrony, radioluminiscence je vybuzena α , β nebo γ zářením, aj. Jestliže je k excitaci použito záření, potom se emise záření nazývá fotoluminiscence [6]. Použitým zářením je zpravidla ultrafialové záření, viditelné světlo nebo infračervené záření. Luminiscence může být rozdělena do tří kategorií – fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence [8].

Pro uskutečnění fluorescence je zapotřebí, aby se excitovaný elektron nacházel v singletovém stavu, tedy aby měl opačný spin než jeho párový elektron ve stavu základním. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu pak není spinově zakázaný, a proto nastává poměrně rychle, řádově v časech 10^{-10} až 10^{-8} s. Doba života excitovaného stavu se potom pohybuje od desetin až po desítky nanosekund. Při fosforescenci dochází k emisi fotonu z tripletového stavu, kde má elektron v excitovaném orbitalu stejný spin jako párový elektron v základním stavu. Takový přechod je kvantově zakázaný a tedy pomalejší – v řádech 10^{-3} – 10^0 s. Pro většinu látek je statisticky více pravděpodobná fluorescence [9]. Při zpožděné fluorescenci přejde excitovaný elektron ze singletového stavu do tripletového a potom zpět do téhož singletového stavu, odkud dochází k emisi záření. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je proto totožné s emisním spektrem fluorescence, k emisi ale dojde po delší době, která je dána pobytem excitovaného elektronu v metastabilním tripletovém stavu [8]. Mechanismy přechodu elektronu zpět do singletového stavu jsou dva. Při pokojové teplotě lze potřebnou energii získat z tepelného pohybu molekul, kdy vzniká rovnováha mezi počtem tripletových a singletových stavů (E-typ). Druhým mechanismem je anihilace triplet-triplet, kdy interakcí dvou molekul v tripletovém stavu vzejde jedna molekula v základním stavu a druhá v excitovaném singletovém stavu (P-typ).

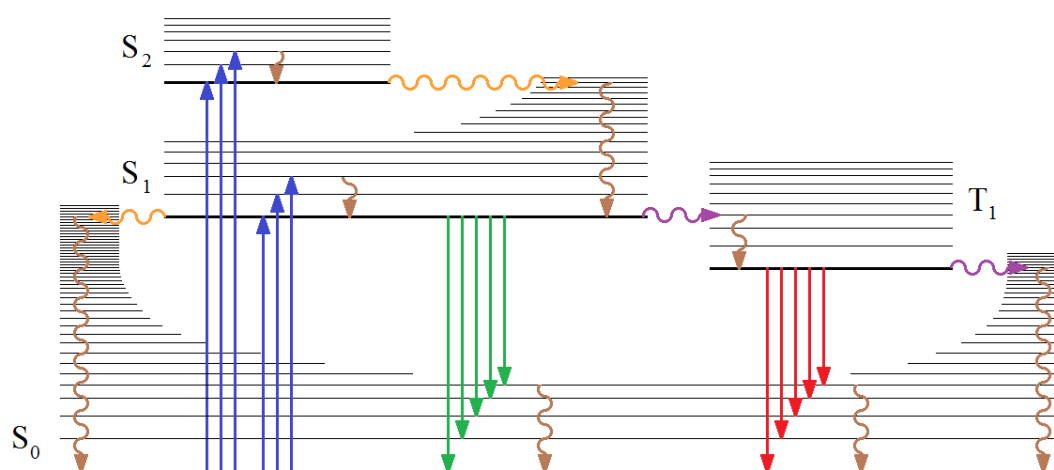
2.1.1 Jabloňského diagram

Mezi excitací a deexcitací elektronu se kromě výše zmíněných procesů objevují i jiné. Lze je znázornit pomocí Jabloňského diagramu (Obrázek 1):

Na diagramu jsou znázorněny elektronové stavy, které jsou buď singletové (S_0 , S_1 , S_2 , ...) nebo tripletové (T_1 , T_2 ...). Každý elektronový stav v sobě zahrnuje více vibračně-rotačních stavů (S_0^1 , ...). Energeticky nejchudší hladina je S_0^0 a nazývá se základní stav. K obsazení vyšších hladin musí dojít k absorpci energie, která excituje elektron v základním stavu. Jestliže dojde k absorpci fotonu, rychlost excitace je řádově zhruba 10^{-15} s. Po excitaci se nabízí více cest, jak dosáhnout opět základního stavu a tím zpět dosáhnout i termodynamické rovnováhy. K deexcitaci může dojít přechody zářivými, kdy dochází k emisi fotonu

(luminiscence) nebo nezářivými přechody (vibrační relaxace, vnitřní konverze, mezisystémový přechod, intramolekulární přenos náboje, konformační změna, aj.). Míra uplatnění jednotlivých přechodů je závislá na době života excitovaného stavu [7, 8].

Proces, který se uplatní vždy bezprostředně po excitaci, je vibrační relaxace. Excitovaný elektron při ní přechází na nejnižší vibračně-rotaci hladinu příslušného elektronového stavu – tzn. na rovnovážnou vibračně-rotaci hladinu. Vibrační relaxace je vyvolána kontaktem excitované molekuly s okolními molekulami, kterým je část energie předána pomocí vibrací a rotací. Rychlost vibrační relaxace se pohybuje v řádu 10^{-12} s i méně. Dochází k ní tedy ještě dříve, než by nastala případná emise záření nebo některý z nezářivých přechodů.



Obrázek 1: Jablonského diagram: Modře – absorpce, zeleně – fluorescence, červeně – fosforescence, hnědě – vibrační relaxace, oranžově – vnitřní konverze, fialově – mezisystémový přechod

Při vnitřní konverzi dochází k přechodu elektronu mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. Vnitřní konverze nastává častěji, jestliže nejnižší vibračně-rotaci hladina elektronového stavu se nachází energeticky na stejné úrovni jako některá z vibračně-rotaci hladin nižšího elektronového stavu. Elektron se tak zpravidla dostane na nenulovou vibračně-rotaci hladinu nižšího elektronového stavu, odkud se vibrační relaxací dostane na nejnižší vibračně-rotaci hladinu [7]. Vnitřní konverze trvá řádově 10^{-6} – 10^{-12} s [8].

Dalším nezářivým procesem je mezisystémový přechod, při kterém dojde k obrácení spinu excitovaného elektronu a systém tak přejde do tripletového stavu. Následuje zpravidla fosforescence, která se na rozdíl od fluorescence objevuje v delších vlnových délkách. To je způsobeno ztrátou energie při nezářivém přechodu do tripletového stavu, který je energeticky níže, než singletový stav [9]. K mezisystémovému přechodu dochází rychlostí řádově 10^{-4} – 10^{-12} s [8].

Po návratu do základního elektronového stavu se elektron obvykle nachází na některé z vyšších vibračně-rotaci hladin, ze kterých se prostřednictvím vibrační relaxace dostává zpět do výchozího stavu S_0^0 .

2.1.2 Franck-Condonův princip

Franck-Condonův princip vysvětluje, proč při přechodech elektronu mezi elektronovými stavy dochází k obsazení většinou vyšší vibračně-rotací hladiny. Důvodem je mnohonásobně rychlejší pohyb elektronů (10^{-15} s) než jader (10^{-10} – 10^{-12} s). Přejed elektronu do jiné elektronové hladiny se díky jeho rychlosti děje bez přizpůsobení pozice jádra molekuly a molekul prostředí, a proto je tento stav termodynamicky nestabilní. Dochází tedy k excitaci elektronu na takovou vibračně-rotací hladinu vyššího elektronového stavu, aby následně došlo k minimálním změnám pozic jádra molekuly a molekul prostředí. Obdobně je tomu při deexcitaci do základního elektronového stavu, kdy elektron zpravidla nepřechází přímo do nejnižší vibračně-rotací hladiny [7]. Přizpůsobování pozic jader se děje prostřednictvím procesu vibrační relaxace [9].

Při zářivých deexcitačních procesech je důsledkem Franck-Condonova principu nižší energie emitovaného záření oproti absorbovanému záření. Vlnová délka excitačního záření je proto prakticky vždy kratší, než je délka emitovaného záření. Tento jev se nazývá **Stokesův posun** a je definován jako rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního záření a vlnovou délkou maxima emisního záření. Umocnění Stokesova posunu nastává při odebrání energie excitované molekule vlivem efektů rozpouštědla, reakcí v excitovaném stavu, vytvoření komplexu nebo vlivem přenosu energie [9].

2.1.3 Charakteristiky fluorescence

Mezi hlavní charakteristiky fluorescence patří absorpční, excitační a emisní spektra, kvantový výtěžek a doba života. Dále lze uvést i polarizaci záření a koherenční vlastnosti [7, 8].

Emisní spektra jsou zobrazením spektrální intenzity fluorescence v závislosti na vlnové délce emitovaného záření (nebo frekvenci, vlnočtu či energii). Jsou výsledkem určité distribuce pravděpodobnosti různých přechodů z nejnižší vibrační hladiny S_1 do různých vibračních hladin S_0 . Emise z nejnižší vibrační hladiny S_1 je způsobena uskutečněním vibrační relaxace a vnitřní konverze dřív, než nastane emise fluorescenčního kvanta. Toto je známo jako **Kashovo pravidlo** a způsobuje nezávislost emisních spekter na excitační vlnové délce. Emisní spektra jsou závislá na chemické struktuře fluoroforu a na prostředí, které ho obklopuje. Mezi parametry prostředí, které mají schopnost ovlivňovat fluorescenci, patří polarita, schopnost tvořit vodíkové můstky, pH, viskozita, přítomnost zhášečů, přítomnost iontů, elektrický potenciál, teplota a tlak [7, 8, 9].

Pro většinu organických molekul platí, že jejich absorpční a emisní spektra jsou navzájem zrcadlově symetrická. Příčinou je podobné rozložení vibračně-rotací hladin ve stavech S_1 a S_0 . Absorpce i emise z odpovídajících si vibračně-rotací hladin má proto stejnou relativní pravděpodobnost. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním [8, 9].

Kvantový výtěžek vyjadřuje, jak velká část excitovaných molekul se do základního stavu vrátila prostřednictvím fluorescence. Je definován jako poměr počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Platí rovnice 1:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (1)$$

kde Q je kvantový výtěžek a Γ a k_{nr} jsou rychlostní konstanty značící rychlost depopulace excitovaného stavu. Konstanta Γ zastupuje zářivý přechod, konstanta k_{nr} zahrnuje všechny nezářivé přechody. Čím vyšší je kvantový výtěžek fluoroforu, tím je fluorofor vhodnější pro pozorování fluorescence. Vysoké kvantové výtěžky se blíží jednotkové hodnotě, jsou však vždy nižší než jedna [9].

Další charakteristikou fluorescence je doba života excitovaného stavu fluoroforu. Doba života je definována jako průměrný čas, po který molekula setrvává v excitovaném stavu, než se vrátí do stavu základního. Protože fluorescence je náhodný jev, většina fluoroforů emituje v jiném čase, než je doba života. Pro výběr vhodného fluoroforu pro dané fluorescenční měření je potřeba znát jeho excitační a emisní spektra, kvantový výtěžek i jeho dobu života [9].

2.2 Fluorescenční sondy

Látky, které vykazují fluorescenci, jsou nazývány fluorofory nebo též fluorescenční barviva. Řadíme mezi ně hlavně aromatické sloučeniny, jako jsou deriváty polyaromatických uhlovodíků nebo heterocyklů [8].

Díky silnému vlivu okolí na fluorescenci jsou fluoreskující molekuly používány pro výzkum fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů. Fluoreskující molekuly mohou být rozděleny do tří skupin: vnitřní fluorofory (přirozené), vnější kovalentně navázané fluorofory (fluorescenční značky) a vnější asociační fluorofory (fluorescenční sondy) [7].

Zkoumané látky většinou nefluoreskují. Ideálním případem jsou vnitřní fluorofory jako například některé aminokyseliny v proteinech (např. tryptofan). Pokud zkoumaná látka nefluoreskuje nebo pokud vnitřní fluorescence není adekvátní pro požadovaný experiment, využívá se nevlastní fluorescence, tedy fluorescenčních sond a značek. Výhodou fluorescenčních značek je jejich dopředu známá pozice v systému. Kvůli jejich složité syntéze se ale ve výzkumu častěji využívá fluorescenčních sond. Pro fluorescenční sondy je charakteristická schopnost se ve studovaném systému rozmístit do mikroprostředí na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Jejich klíčovou vlastností je hydrofilní, hydrofobní nebo amfifilní charakter. Obecně záleží na citlivosti sondy na určitou vlastnost mikroprostředí, kde je lokalizována. Při výběru vhodné sondy musí být brán zřetel i na tvar a velikost sondy a na její fotostabilitu [7, 9].

Fluorescenčních sondy lze dělit na polaritní, viskozitní, membránové, na sondy pro membránový potenciál, pro nukleové kyseliny a pro přenos energie.

Membránové sondy lze rozdělit do dvou skupin:

1. fluorescenční analogy přirozených lipidů (fosfolipidy, sfingolipidy, mastné kyseliny, triglyceridy, steroidy)
2. malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory [8, 9]

2.2.1 Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)

Prodan (Obrázek 2) se řadí mezi lipofilní membránové fluorescenční sondy. Spolu s jeho deriváty jsou široce používanými sondami při výzkumu biomolekul, pro studium buněčných membrán a modelových membrán [9, 10].

Rozpustnost prodanu v široké škále rozpouštědel umožňuje jeho rozložení do více jedno- i vícefázových oblastí. Dekonvolucí celého emisního spektra prodanu do několika překrývajících se Gaussovských funkcí je možno interpretovat umístění prodanu v mikrodoménách odlišné relativní polarizace [11].

Fluorescence prodanu je hodně citlivá na polaritu prostředí [9, 10, 11]. V hydrofilním prostředí dochází k výraznějšímu přesunu energie z excitované molekuly prodanu k přiléhajícím molekulám rozpouštědla. Při excitaci prodanu totiž dojde ke zvýšení jeho dipólového momentu a okolní polární molekuly se na základě elektrostatického působení musí přeuspořádat, k čemuž využijí část energie excitovaného prodanu. Díky úbytku energie prodanu dojde k výraznému červenému posunu maxima emise. V hydrofóbním prostředí je přenos energie méně výrazný [12]. Důsledkem této citlivosti je dramatický solvatochromní posun maxima emise (zhruba 130 nm) od 401 nm v cyklohexanu do 531 nm ve vodě [13].

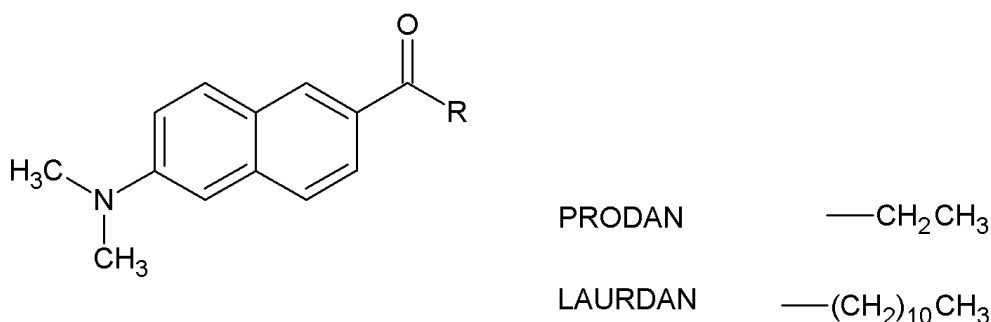
Citlivost prodanu na polaritu souvisí s existencí dvou typů excitovaných stavů. Po absorpci záření prodanem dochází ke vzniku lokálně excitovaného stavu (locally excited – LE), který se může změnit na stav s přeneseným nábojem (charge-transferred – CT). Stav CT je energeticky chudší. Po tomto procesu následuje zpravidla interakce s rozpouštědlem (přenos energie směrem k rozpouštědлу) [13]. Energie excitovaných stavů prodanu jsou závislé na polaritě prostředí, což je právě důvodem silné citlivosti prodanu na polaritu [10]. V nepolárních prostředích nastává emise z LE stavu, v polárních prostředích dochází k emisi ze stavu CT. Například v micelárním systému emituje prodan z obou typů excitovaných stavů. Struktura prodanu v základním stavu je planární, ovšem geometrie v excitovaném stavu ještě nebyla zcela objasněna [13].

Během excitace dochází ke zvýšení dipólového momentu vlivem přenosu náboje z dusíku dimethylaminoskupiny na propanoyl naftalenový zbytek [10]. Změna dipólového momentu při excitaci je asi 4,4–5,0 D [13]. To ale samo o sobě není důvodem vysoké citlivosti prodanu na polaritu, jak se původně předpokládalo. Svou roli zde pravděpodobně hrají i specifické interakce jako vodíkové můstky [7].

V nepolárních rozpouštědlech a polárních aprotických rozpouštědlech prodan vykazuje jednoexponenciální pokles intenzity fluorescence v čase. U polárních protických rozpouštědel vykazuje dvoj-exponenciální pokles jako například v methanolu nebo ve vodě. Ve vodě lze dvoj-exponenciální pokles intenzity charakterizovat dobami života prodanu: 0,70 ns (60 %) a 2,0 ns (40 %). V přesyceném roztoku prodanu ve vodě se na modré straně emisního spektra objevuje ještě třetí doba života o hodnotě 13 ns [13].

Prodan nevykazuje samozhášení, tzn. nezháší (nedeaktivuje) jiné molekuly prodanu, které jsou v excitovaném stavu [10]. Závislost mezi dielektrickou konstantou rozpouštědla v rozmezí 28–78 a emisním maximem je lineární. Emise prodanu je nezávislá na pH

v rozmezí 2,75–8,00, je nezávislá na iontové síle v rozmezí 0,12–1,2 a je nezávislá také na mikroviskozitě v rozmezí 0,9–8,7 cps rozpouštědla [12].



Obrázek 2: Struktura prodanu a laurdanu

2.2.2 Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen)

Laurdan je derivát prodanu (Obrázek 2), který vznikne nahrazením ethylové skupiny prodanu uhlovodíkovým řetězcem o 11-ti uhlících [7]. Stejně jako v případě prodanu se jedná o amfifilní fluorescenční sondu [14], která se řadí k lipofilním membránovým sondám [15]. S prodanem sdílí také stejný fluorofor. Rozdíl mezi těmito dvěma sondami je především v celkově hlubším a pevnějším ukotvení laurdanu ve fosfolipidové dvojvrstvě nebo v micelle [16, 17]. Jeho fluorescenční část je přitom orientována k polárnímu prostředí [18].

Stejně jako u prodanu i u laurdanu dochází při excitaci ke vzniku LE a CT stavu [9], tedy k přenosu náboje a k výraznému vzrůstu dipólového momentu, což je také důvod silné citlivosti laurdanu na polaritu prostředí [18]. Kromě citlivosti na polaritu vykazuje laurdan citlivost i na fázový stav membrán, kde je ukotven [16]. Jeho spektroskopické vlastnosti zde bývají popsány tzv. generalizovanou polarizací (GP), která má hodnotu podle toho, zda je membrána spíše gelem nebo fluidní fází [14, 16]. Proto je laurdan široce využíván ve studiích dynamiky povrchu membrán ve vodě [19].

V silně polárních prostředích vykazuje laurdan emisi posunutou k vyšším vlnovým délkám díky dipolárním relaxačním procesům [14]. Například v dodekanu lze pozorovat maximum emise u 380 nm, v polárním methanolu pak u 490 nm. Ve vodném prostředí ale prakticky nefluoreskuje, vykazuje zde dobu života méně než 100 ps. V organických rozpouštědlech a membránách vykazuje silnou fluorescenci a dobu života zhruba 4–8 ns [15].

2.2.3 Rhodamin 6G (rhodamin 590 chlorid)

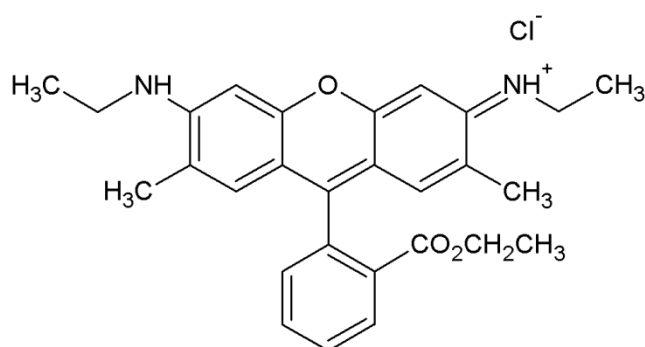
Rhodaminová barviva jsou oblíbenými fluorofory. Používají se jednak jako fluorescenční sondy v biochemii a také jako laserová barviva v kapalných laserech. Rhodamin 6G (Obrázek 3) je jednou z nejpoužívanějších a nejstudovanějších laserových barviv [19, 20].

Rhodaminová barviva jsou deriváty xantanu. Jejich centrální molekulární struktura je rigidní a planární. Vyznačují se dlouhými vlnovými délkami excitace a emise, zhruba 480–600 a 500–700 nm [7, 9]. Dalšími znaky je vysoký fluorescenční kvantový výtěžek, který se blíží jednotkové hodnotě, a jejich vysoká fotochemická stabilita [9, 21].

Fluorescence rhodaminů není citlivá na polaritu rozpouštědla [9]. Rhodamin 6G se kompletně rozpouští v methanolu, ethanolu a jiných organických rozpouštědlech [22]. Ve vodných roztocích má ale od koncentrace vyšší než zhruba 10^{-6} M [23, 24] tendenci agregovat kvůli hydrofóbním interakcím mezi svými alkylovými substituenty. Dochází k formování více typů dimerů a i k formování vícemerů [19, 21, 22, 25].

Při dostatečném zředění ve vodě, kdy nedochází k agregaci molekul rhodaminu, je maximum excitace i absorpce 525 nm, maximum emise 554 nm [24]. Excitační a emisní spektra se ale překrývají, což způsobuje nepřesnosti (kvůli samoabsorpci) při přesných fluorescenčních měřeních, například při zjišťování kvantového výtěžku [21].

Může docházet ke zhášení fluorescence vlivem přítomnosti dimerů molekul rhodaminu anebo přítomnosti aniontů I^- a SCN^- . V malé míře způsobují zhášení také anionty Cl^- a Br^- [26].



Obrázek 3: Struktura rhodaminu 6G

2.3 Princip ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie nalézá využití v široké škále problematik v chemii a biologii. Informace získané z fluorescenčních měření jsou založeny na citlivosti fluoroforů vůči jejich prostředí, o kterých fluorofor prostřednictvím své emise podává potřebné informace. Měření fluorescence může být rozděleno na dva typy: ustálené měření a časově rozlišené měření.

2.3.1 Ustálená fluorescenční spektroskopie

Měření ustálené fluorescence je běžným typem měření. Provádí se za konstantní excitace a pozorování, kdy je fluorescenční vzorek osvětlen kontinuálním paprskem záření a současně je zaznamenáváno emisní spektrum.

Konvenční fluorescenční spektrometr obsahuje jako excitační zdroj nejčastěji vysokotlakou xenonovou výbojku, která poskytuje kontinuální emisi o vysoké intenzitě od asi 250 nm až do infračervené oblasti. Vhodná vlnová délka excitačního záření je vybrána pomocí excitačního monochromátoru a přivedena do vzorku, který pak poskytuje fluorescenci ve všech směrech. Ta je sbírána v pravém úhlu ke směru excitačního paprsku, aby nedocházelo k rušení. Potřebná vlnová délka fluorescence je vybrána emisním monochromátorem. Difrakčním prvkem v monochromátorech je mřížka a oba monochromátory jsou motorizované, aby umožnily automatické skenování vlnových délek. Fluorescenční záření je detekováno fotonásobičem, který převede informaci záření na

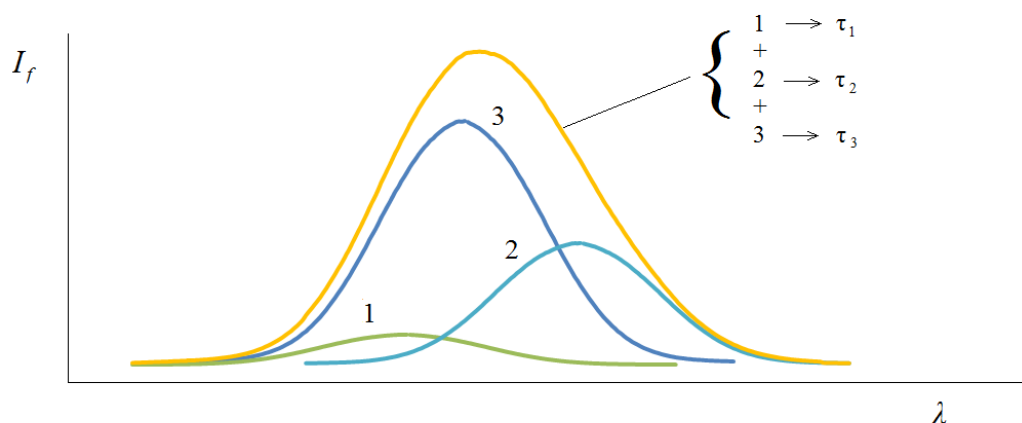
elektrický proud úměrný intenzitě světla. Signál je následně zesílen vhodnými elektronickými zařízeními. Mimo to obsahují tyto přístroje i uzávěrky k regulaci intenzity záření. Výstupem klasického fluorescenčního měření jsou pak emisní a excitační spektra [7, 9].

V ideálním případě by měla získaná emisní a excitační spektra reprezentovat relativní intenzitu záření na interval vlnové délky. K získání takových emisních spekter musí mít jednotlivé komponenty přístroje následující vlastnosti:

- zdroj záření musí poskytovat konstantní výdej fotonů při všech vlnových délkách,
- monochromátor musí propouštět fotony všech vlnových délek se stejnou účinností,
- účinnost monochromátoru musí být nezávislá na polarizaci,
- detektor musí detekovat fotony všech vlnových délek se stejnou účinností.

Bohužel tyto vlastnosti jednotlivých komponent nejsou reálné a pro získání správných výsledků je nutno provést korekce neideální odezvy přístroje. Tyto korekce provádí přístroj automaticky.

Kvůli spektrálnímu překryvu absorpčních i emisních spekter různých fluoroforů ve vzorku není obvykle možné z ustálených dat rozlišit emisi příslušející jednotlivým fluoroforům (Obrázek 4). Část informace je tak ztracena. Tyto informace ale mohou být získány pomocí časově rozlišených měření, která umožňují zjistit dobu života (τ) a relativní intenzity fluorescence dílčích fluoroforů. Existuje i mnoho jiných případů, kde časově rozlišené měření poskytne více informací než ustálené, například odlišení statického a dynamického zhášení [9].



Obrázek 4: Dekompozice emisního spektra na dílčí složky

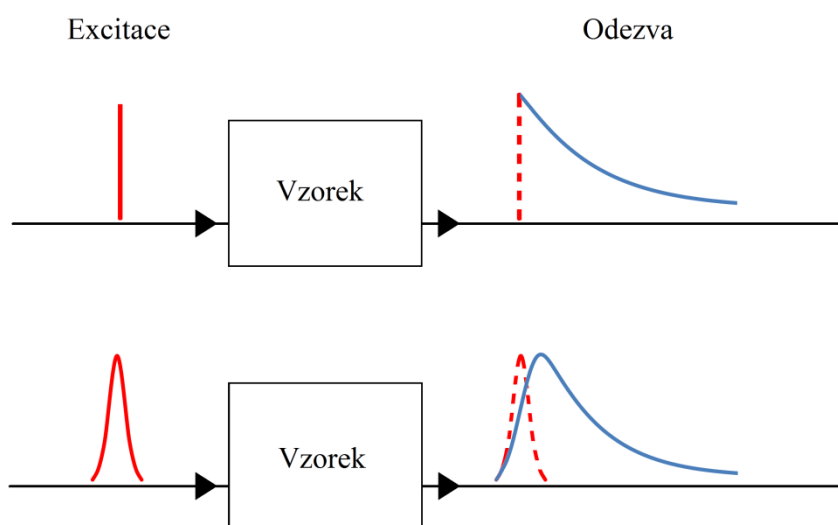
2.3.2 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Časově rozlišená měření jsou ve fluorescenční spektroskopii široce používána. Pomocí časově rozlišených fluorescenčních měření je možno na rozdíl od ustálených měření poznat dynamiku excitovaných stavů, která je velmi důležitá pro pochopení fotofyzikálních, fotochemických a fotobiologických procesů. Existují dvě dominantní časově rozlišené techniky, které se označují jako pulzní metoda a metoda fázově modulovaného budícího záření [7].

Pulzní fluorimetrie používá krátký excitační pulz záření a vytváří pulzní odezvu vzorku složenou s odezvou přístroje. Fázově modulovaná fluorimetrie používá modulované záření při různých frekvencích a vytváří harmonickou odezvu vzorku, která je Fourierovou transformací odezvy pulzu. První technika pracuje v časové doméně, druhá ve frekvenční doméně. Oba typy fluorimetrie jsou teoreticky stejné, ale liší se v instrumentaci. Dále bude rozebírána pouze technika pulzní fluorimetrie [7].

Excitační pulz by měl mít co nejmenší šířku, resp. měl by být co nejkratší. Přednostně by měl být výrazně kratší, než je doba života vzorku. Následně po excitaci vzorku pulzem je měřena na čase závislá intenzita fluorescence. Takto je získána závislost intenzity fluorescence na čase, která má tvar poklesu. V nejjednodušším případě jde o jedno-exponenciální pokles, jehož časová konstanta je doba života excitovaného stavu. Častěji se ale jedná o součet různých exponenciál [7, 9].

V ideálním případě je excitační pulz nekonečně krátký a elektronika nekonečně rychlá, což ale není možné, a proto je získaná závislost fluorescenční intenzity konvolučním produktem s funkcí odezvy přístroje, která se skládá z funkce profilu excitačního pulzu a odezvy elektroniky. To způsobuje, že intenzita fluorescenčního poklesu stoupá, jde přes maximum a stává se identickou k odezvě excitačního pulzu, dokud není intenzita záření pulzu zanedbatelná (Obrázek 5). Pro analýzu dat, tedy získání parametrů charakterizujících pokles intenzity fluorescence, je proto nutná dekonvoluce fluorescenční odezvy [7].



Obrázek 5: Pokles intenzity fluorescence v závislosti na povaze excitačního pulzu

2.3.2.1 Význam doby života fluoroforu

Po excitaci pulzem záření (při teoretickém nekonečně krátkém pulzu – δ -pulzu) je ve vzorku excitována část fluoroforů, která je označena jako počáteční populace (n_0). Tato populace se snižuje rychlostí $\Gamma + k_{nr}$ podle rovnice:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t), \quad (2)$$

kde $n(t)$ je počet excitovaných molekul v čase t po excitaci, Γ je rychlost emise a k_{nr} je rychlost nezářivých procesů. Protože emise je náhodná událost, každý excitovaný fluorofor má stejnou pravděpodobnost emitování v dané časové periodě, což způsobuje, že pokles populace v excitovaném stavu bude exponenciální. Jedná se o kinetiku prvního řádu:

$$n(t) = n_0 \exp(-t/\tau), \quad (3)$$

Ve fluorescenčním experimentu však není pozorován počet excitovaných molekul, ale intenzita fluorescence, která je úměrná počtu $n(t)$. Proto lze rovnici 2 přepsat pomocí intenzity, čímž je získán obvyklý výraz pro jedno-exponenciální pokles:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau), \quad (4)$$

kde I_0 je intenzita v čase $t = 0$ s, $I(t)$ je intenzita v čase t a τ je doba života fluoroforu. Rovnici lze také napsat jako:

$$I(t) = \alpha \exp(-t/\tau), \quad (5)$$

kde τ je doba života a α je pre-exponenciální faktor nebo amplituda při $t = 0$ s. Obě tyto charakteristiky jsou závislé na studovaném systému. Pro multi-exponenciální pokles se předpokládá, že intenzita klesá jako součet individuálních jedno-exponenciálních poklesů o počtu n a stejným počtem dob života:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i). \quad (6)$$

Doba života je převrácená hodnota celkové rychlosti poklesu. Jinak řečeno, inverzní hodnota doby života je součtem rychlostí, které snižují populaci excitovaného stavu [7, 9]:

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}. \quad (7)$$

Jestliže se jedná o jedno-exponenciální pokles, lze dobu života také definovat jako průměrný čas, po který fluorofor zůstává v excitovaném stavu po excitaci pulzem. To však neplatí pro komplexnější poklesy, jako jsou multi-exponenciální nebo non-exponenciální poklesy. Důležité také je, že doba života je statistický průměr a fluorofory emitují náhodně v rámci celého časového rozsahu fluorescenčního poklesu a neemitují všechny v čase rovném době života. Některé emitují dříve, některé později a vzniklá časová distribuce emitovaných fotonů je pokles fluorescenční intenzity [9].

Mnoho vzorků obsahujících jeden fluorofor vykazuje komplexnější poklesy než jedno-exponenciální, což je způsobeno existencí fluoroforu ve více mikroprostředích o odlišných vlastnostech, jako například v mikroprostředí přístupnému vodě nebo naopak chráněnému od vody. Každému z těchto dvou stavů je pak připsána jedna doba života. Jestliže je fluorofor rozpuštěný ve směsi rozpouštědel, výsledkem bude určitá distribuce dob života [9].

Fluorescenční doba života může být určena ze sklonu závislosti $I(t)$ na t , ale častěji se používá prokládání dat předpokládanými modely poklesu [9].

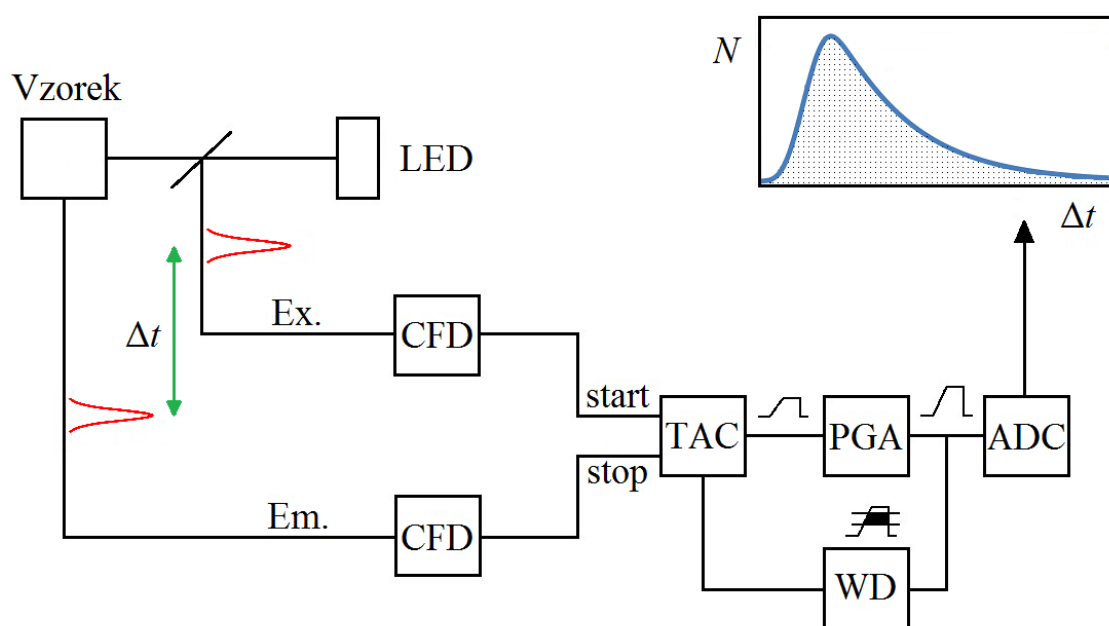
2.3.2.2 Konstrukce pulzních fluorimetrů – metoda TCSPC

Metoda TCSPC (time-correlated single photon counting) neboli „časově korelované čítání fotonů“ se používá v analytické chemii, v buněčném zobrazování, k detekci jedné molekuly

a ve fluorescenční korelační spektroskopii. V těchto aplikacích jsou doby života použity k rozlišení různých fluoroforů v různých prostředích [9].

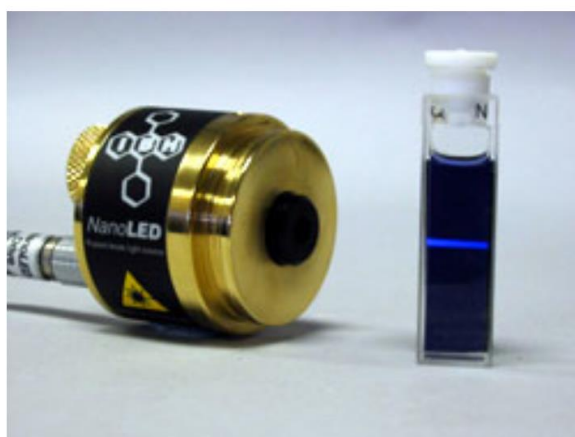
Na metodě TCSPC je založena většina pulzních fluorimetrů. Základní princip leží na faktu, že pravděpodobnost detekování jednoho fotonu v čase t po excitaci pulzem záření je úměrná intenzitě fluorescence v tom čase. Po zaznamenání velkého množství jednotlivých fotonů v jim vlastních časech po excitaci pulzem světla je vytvořena křivka poklesu intenzity fluorescence. Metoda TCSPC nabízí několik výhod jako vysokou citlivost, vynikající dynamický rozsah a linearitu a dobře definovanou statistiku (Poissonova distribuce), která umožňuje vhodné vážení každého bodu při analýze dat [7].

Na obrázku 6 je zobrazen konvenční TCSPC přístroj. Excitační zdroj má zásadní význam. Mohou jím být zábleskové lampy, lasery nebo v poslední době oblíbené laserové diody a záření emitující diody. Zábleskové lampy pracující ve vzduchu nebo N_2 , H_2 nebo D_2 nejsou drahé, ale excitační vlnové délky jsou omezeny na 200–400 nm. Poskytují nanosekundové pulzy, takže mohou být naměřeny doby života od několika stovek pikosekund. Opakovací frekvence není vysoká (10^4 – 10^5 Hz) a protože počet fluorescenčních pulzů na excitační pulz musí být držen pod 5 %, doba sběru dat může být docela dlouhá v závislosti na požadované přesnosti (od desítek minut po několik hodin). Pro dlouhý sběr dat může být použití lampy vážným problémem. Lasery jako excitační zdroje jsou mnohem více efektivní a univerzální, ale jsou drahé. „Mode-locked“ lasery spojené s barvivovými lasery nebo s titan-safírovým laserem mohou generovat pulzy v širokém rozsahu vlnových délek. Šířky pulzů jsou v řádech pikosekund a s vysokou opakovací frekvencí. Tato frekvence je omezena několika MHz, aby stihla proběhnout fluorescence ve vzorcích s delší dobou života. Významným vývojovým krokem bylo zavedení laserových diod (LD) a záření emitujících diod (LED – Obrázek 7). Jsou to jednoduché zdroje v tuhém stavu a mají několik výhod jako malou spotřebu, snadnou obsluhu a téměř žádnou údržbu. Jejich opakovací frekvence může být až 40 MHz, což umožňuje rychlý zisk dat [9].



Obrázek 6: Schéma instrumentace TCSPC přístroje

Experiment začíná současnou generací elektrického a optického pulzu ve zdroji záření. Elektrický pulz je směřován přes diskriminátor (constant function discriminator – CFD), který přesně změří čas příchozího pulzu, a odtud do startovacího vstupu převodníku času na amplitudu (time-to-amplitude convertor – TAC). Mezitím je optickým pulzem excitován vzorek a ten následně začíná emitovat fluorescenci. Optika musí být správně naladěná (při příliš velké intenzitě záření musí být použit neutrální filtr nebo menší štěrbiny), takže na fotonásobič nedopadne víc jak jeden foton na jeden excitační pulz. Elektrický pulz korespondující s emisí fotonu je směřován přes diskriminátor do stop vstupu převodníku (TAC). V převodníku se mezitím generoval schodek napětí, což je napětí, které lineárně roste s časem. Po obdržení stop signálu je schodek napětí převeden na elektrický pulz, jehož amplituda je přímo úměrná zpoždění mezi start a stop pulzem. Podle potřeby je napětí zesíleno v zesilovači (programmable gain amplifier – PGA) a převedeno na numerickou hodnotu pomocí analogově digitálního převodníku (analog-to-digital converter – ADC). Pro minimalizování chybných čtení je signál omezen daným rozsahem napětí. Jestliže není signál v tomto rozmezí, událost je potlačena pomocí diskriminátoru (window discriminator – WD). Po průchodu signálu přes ADC dojde k zaznamenání události, tzn. o jednotku se zvýší množství zaznamenaných fotonů v daném časovém kanálu, který přísluší zpoždění zaznamenaného fotonu [7, 9].

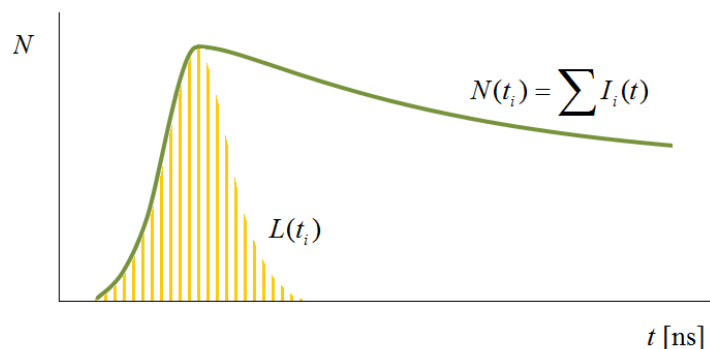


Obrázek 7: Nejčastější excitační zdroj v TCSPC technice – světlo emitující dioda [9]

Po velkém množství excitací a detekcí událostí, je získán histogram počtu událostí, který reprezentuje křivku poklesu fluorescence. Osa x na histogramu tedy znázorňuje časový rozdíl (zobrazováno v kanálech) a osa y počet detekovaných fotonů s daným časovým rozdílem (zpravidla v logaritmickém měřítku). Čím je větší počet událostí, tím je dosaženo větší přesnosti křivky poklesu [7].

Pro získání parametrů poklesu je nutné získanou křivku poklesu dekonvoluovat, což vyžaduje změření časového profilu excitačního pulzu (odezva přístroje) za stejných podmínek, jako byl změřen vzorek. Pro naměření tohoto profilu se místo vzorku používá médium rozptylující záření, například roztok koloidní siliky (Ludox). Naměřená křivka pak reprezentuje nejkratší časový profil, který může být přístrojem naměřen. Je důležité rozumět, proč je měřený pokles intenzity fluorescence konvolucí s profilem excitačního pulzu. Pokles intenzity fluorescence odpovídající zákonu o poklesu intenzity by byl naměřen, jen pokud by

excitační pulz byl nekonečně úzký a pokud by odezva přístroje byla nekonečně rychlá, což není možné. Reálně je profil excitačního pulzu široký 0,5 až 2 ns. Průběh excitace si lze potom představit jako sérii nekonečně krátkých pulzů s odlišnými amplitudami, z nichž každý vyvolá odezvu ve vzorku úměrnou výšce pulzu. Naměřená data jsou potom součtem všech těchto exponenciální poklesů (odezev vzorku), které začínají v odlišné časy a s odlišnými amplitudami (Obrázek 8) [7, 9].



Obrázek 8: Profil excitačního pulzu s následnou poklesovou křivkou

Jestliže je doba života v řádu nanosekund, současná elektronika není dost rychlá na to, aby změřila více fotonů za jeden excitační pulz. Možné je to jen pro doby života blízko mikrosekund a delší. Proto je nutné, aby byl počet fluorescenčních pulzů výrazně nižší, než počet excitačních pulzů (míň jak 0,01–0,05 stop signálu za excitační pulz), takže pravděpodobnost detekování dvou fluorescenčních pulzů na jeden excitační pulz je zanedbatelná. V opačném případě TAC vyhodnotí pouze první ze dvou fluorescenčních pulzů a získaná statistika bude zkreslená, pokles bude kratší, než ve skutečnosti je. Tomuto jevu se pak říká „pileup effect“ [7, 9].

Časové rozlišení přístrojů je ovlivněno jak šířkou pulzu, tak i elektronikou a detektorem. Pro získání přesných fluorescenčních poklesů je rozhodující lineární časová odezva TAC. Odezva je více lineární, když se minimalizuje tzv. mrtvý čas, což je čas, kdy je TAC v provozu a je neschopný reagovat na další signál (v moderní TCSPC elektronice okolo 120 ns). Z tohoto důvodu se shromažďují data v reverzním módu, kdy se fluorescenční pulz chová jako startovací pulz a korespondující excitační pulz, který je zpožděný o vhodný čas, slouží jako stop pulz. TAC pak není nutno neustále resetovat. Tímto způsobem bude jen malá část startovacích pulzů vyústit ve stop pulzy a získaná statistika bude lepší [7, 9].

Někdy je složité úplně odstranit rozptyl světla u zakalených nebo pevných vzorků a to i při použití emisního monochromátoru a vhodných filtrů. V případě projevení rozptylu světla musí být upraveno vyhodnocování dat, kdy musí být zohledněn příspěvek rozptýleného záření [7].

2.3.2.3 Analýza dat

S poklesem intenzity fluorescence jsou asociované tři typické křivky: naměřená data $N(t_i)$, odezva přístroje $L(t_i)$ a proložená funkce $N_c(t_i)$. Tyto funkce jsou diskrétní, protože zaznamenané fotony jsou shromažďovány v kanálech. Naměřená data jsou konvolucí odezvy

přístroje a požadované n -exponenciální funkce. Pro vyřešení problému dekonvoluce naměřené závislosti a její prokládání funkcí teoretického poklesu bylo vynaloženo značné úsilí. Zkoumáno bylo několik metod: metody nejmenších čtverců, momentů, Fourierova transformace, Laplaceova transformace, metoda maximální entropie aj. Nejrozšířenější metodou se stala metoda nelineárních nejmenších čtverců (NLLS – nonlinear least squares). Základním principem této metody je minimalizovat neshodu mezi daty a proloženou funkcí. Tato neshoda je vyjadřována pomocí parametru χ^2 , který je definován jako vážený součet čtverců odchylek mezi daty a proloženou funkcí [9]:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left[\frac{N(t_i) - N_c(t_i)}{\sigma(i)} \right]^2, \quad (8)$$

kde n je celkový počet bodů dat nebo kanálů a $\sigma(i)$ je směrodatná odchylka od i -tého bodu dat. Jedná se o neurčitost předpokládanou ze statistických úvah (jde o šum). Prakticky se používá upravená hodnota tohoto parametru, takže je jeho hodnota nezávislá na počtu dat (n) a na počtu parametrů proložené funkce (p). Používá se redukovaná hodnota parametru χ^2 :

$$\chi_r^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu}, \quad (9)$$

kdy je χ^2 podělen počtem stupňů volnosti, $\nu = n - p$. Například pro dvoj-exponenciální pokles je hodnota p rovna třem – dvě doby života a jeden pre-exponenciální faktor. Po přepisu platí:

$$\chi_r^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{i=1}^n \left[\frac{N(t_i) - N_c(t_i)}{\sigma(i)} \right]^2. \quad (10)$$

Pro TCSPC je počet bodů dat typicky mnohem větší než počet parametrů, takže ν je zhruba rovno n . Statistika se řídí Poissonovou distribucí a předpokládaná odchylka $\sigma(i)$ se blíží $\sigma(i) = \sqrt{N(t_i)}$, takže platí [7, 9]:

$$\chi_r^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{i=1}^n \left[\frac{N(t_i) - N_c(t_i)}{N(t_i)} \right]^2. \quad (11)$$

Jestliže data obsahují jen šum, pak relativní neurčitost dat klesá se zvyšujícím se počtem pozorovaných fotonů a hodnota χ_r^2 se blíží jednotkové hodnotě. Příslušné proložení je potom vhodné.

Metoda NLLS poskytuje nejlepší odhad prokládané funkce, jestliže:

1. Neurčitost celého experimentu leží v závislé ose y .
2. Tyto neurčitosti mají Gaussovské rozdělení, jehož střed se nachází na správné hodnotě.
3. Není zde žádná systematická chyba, ani v ose y ani v ose x .
4. Předpokládaná proložená funkce je správným matematickým popisem systému. Nesprávné modely vyústí v nesprávné parametry.
5. Jednotlivé body dat jsou nezávislá pozorování.

6. Je naměřeno dostatečné množství dat [9].

V praxi předchází výpočtu prokládané funkce odhad parametrů proložení (pre-exponenciální faktor a doby života). Prokládaná křivka je rekonvoluována s odezvou přístroje pro srovnání s experimentální křivkou. Potom je použit minimalizační algoritmus (Marquardtova metoda) pro nalezení parametrů poskytujících to nejlepší proložení. Jde o iterační proces, kdy je při každém kroku kalkulovaný pokles rekonvoluovaný s odezvou přístroje. Komerčně je k dispozici několik softwarů [7].

2.3.2.4 Posouzení kvality proložení

Řešení multi-exponenciálních poklesů je tím složitější, čím více dob života obsahuje. I když jsou hodnoty χ_r^2 používány pro posouzení proložení, prvním krokem při posuzování by mělo být vizuální srovnání průběhu naměřených dat s proloženou funkcí a vizuální kontrola vážených reziduí jednotlivých bodů dat, kde jsou dobře vidět rozdíly mezi daty a proloženou funkcí. Vážená rezidua jsou definována jako [9]:

$$W(t_i) = \frac{N(t_i) - N_c(t_i)}{\sigma(i)}, \quad (12)$$

kde opět platí $\sigma(i) = \sqrt{N(t_i)}$. Jestliže je proložení dobré, vážená rezidua jsou náhodně rozložena okolo nuly. Jestliže je neshoda velká (rezidua vykazují určitý trend), model je špatný a nejspíše bude potřeba použít model pro více parametrů poklesu. Jestliže jsou data a proložená funkce blízko, ale perfektně nesedí, je lákavé použít komplexnější model. V tuto chvíli bývá problém s určením hranice dobrého a špatného proložení. Uvažovat lze dvěma způsoby: v závislosti na zkušenosti a na matematice. Z pohledu matematiky není nutné zamítnout model s pravděpodobností překračující 5%, což koresponduje s $\chi_r^2 = 1,17$. Kompletní spoléhání na matematiku ale může vést ke špatné interpretaci dat a vymyšlení další komponenty, která neexistuje. Malé množství systematických chyb v naměřených datech totiž může dávat zdání, že je potřeba použít komplexnější model. Systematické chyby v datech mohou jednoduše zapříčinit i $\chi_r^2 > 1,5$ a toto malé zvýšení pak neznamená, že model je špatný. Při systematických chybách navíc není hodnota χ_r^2 významně snížena, jestliže se použije komplexnější model. Obecně se považují poklesy v χ_r^2 za významné, jestli poměr klesne dvakrát a více. Menší změny v χ_r^2 by měly být interpretovány s opatrností, typicky na základě předešlého porozumění systému. Navíc je χ_r^2 obecně obvykle blíže jednotkové hodnotě při použití modelu s více nastavitelnými parametry [7, 9].

Jestliže jde o měření dvou dob života, které se od sebe liší méně jak dvakrát, je složité získat přesné hodnoty. Z tohoto důvodu se používá globální analýza. Její koncept je založen na předpokladu, že doby života nezávisí na vlnové délce, a tak je provedeno měření při více vlnových délkách v rámci emisního spektra. Doby života jsou globálními parametry, amplitudy ale nikoliv. Tímto způsobem měření je vyšší pravděpodobnost odhalení správných dob života [9].

2.3.2.5 Standardy dob života

Doby života excitovaného stavu některých sloučenin mohou být použity jako standardy (např. rhodamin B, POPOP, aj.). Hodnoty dob života standardů jsou průměrnou hodnotou z hodnot získaných v osmi laboratořích. V průměrné hodnotě ale existuje jistá nepřesnost, např. pro POPOP v bezkyslíkovém cyklohexanu byly zjištěny hodnoty od 1,07 do 1,18 ns. Tato nepřesnost je způsobena například nevyhnutelnými malými odlišnostmi každého přístroje, odlišným původem vzorků a rozpouštědel, složitostí přípravy identických vzorků beze stopy nečistot, zhášeče atd. [7].

2.3.3 Časově rozlišená emisní spektra

Na emisní spektra fluoroforů mají vliv procesy excitovaného stavu, kam patří relaxace rozpouštědla a reakce excitovaného stavu. Při relaxaci rozpouštědla dochází k reorientaci polárních molekul rozpouštědla okolo excitovaného fluoroforu, u kterého se vlivem excitace zvýšil (změnil) dipólový moment. Tímto procesem je postupně odebrána energie fluoroforu. Mezi reakce excitovaných stavů pak patří separace náboje a/nebo konformační změny v excitovaném stavu. Všechny tyto procesy lze studovat pozorováním emisních spekter, která jsou naměřena v určitém krátkém časovém okamžiku po excitaci pulzem záření. Tato spektra se nazývají časově rozlišená emisní spektra (time-resolved emission spectra – TRES) [9].

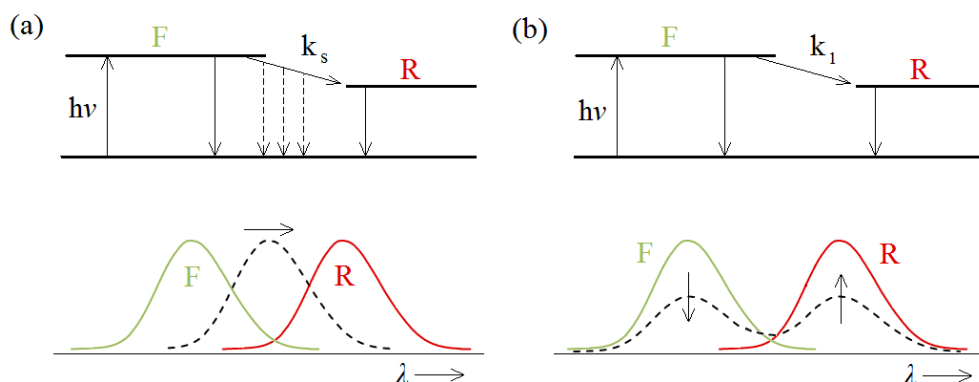
Při měření ustálené fluorescence se předpokládá, že emitující fluorofory jsou v rovnováze se svým prostředím. Jinak řečeno než nastala fluorescence, molekuly rozpouštědla okolo excitovaného fluoroforu se již stihly přeuspořádat (zrelaxovat) nebo již stihla nastat příslušná reakce. Předpoklad emise z rovnovážných stavů má opodstatnění, protože v případě relaxace rozpouštědla probíhá reorientace molekul okolo excitovaného fluoroforu v časech od 0,1 do 10 ps, přičemž doby života fluoroforů jsou zhruba od 1 ns a delší. Existuje ale mnoho situací, kdy fluorofory mohou emitovat před nebo během dynamických procesů. Například ve viskózních prostředích, kde může být rychlost reorientace porovnatelná nebo pomalejší než fluorescence. Ustálené emisní spektrum potom reprezentuje průměr částečně relaxované emise. Při těchto podmínkách vykazují emisní spektra na čase závislé změny. V emisních spektrech ustálené fluorescence tyto časové efekty nejsou vidět, ale v časově rozlišených datech vidět jsou [9].

2.3.3.1 Procesy excitovaného stavu

Časově závislé spektrální změny můžeme rozdělit do dvou kategorií: kontinuální spektrální posun a model dvou stavů (Obrázek 9). V kontinuálním modelu dochází k posunu emisního spektra, ale nemění se tvar spektra. Tento model je obecně vhodný pro klasické efekty rozpouštědla. V modelu dvou stavů jsou oddělené emisní spektrální formy dvou forem fluoroforu. Tento model je obvykle vhodný pro reakce excitovaného stavu nebo formování stavu vnitřního přenosu náboje (ICT) [9].

Při efektech rozpouštědla emitují fluorofory nezrelaxované, částečně zrelaxované i zrelaxované. Nezrelaxované stavy se nazývají Franck-Condonovy (F). Jak se molekuly rozpouštědla reorientují vzájemně s excitovaným fluoroforem, fluorofor přechází s určitou rychlostní konstantou k_S do zrelaxovaného stavu (R). Objevuje se distribuce doby života

a emise se s časem posunuje k delším vlnovým délkám. Při reakcích excitovaného stavu dochází k emisi ze dvou stavů – nezreagovaného a zreagovaného, emitujícího v delších vlnových délkách. Každý z těchto dvou stavů má vlastní dobu života [9].



Obrázek 9: Dva modely průběhu TRES doplněné Jablonského diagramy pro případ relaxace rozpouštědla (a) a reakci excitovaného stavu (b)

2.3.3.2 Měření časově rozlišených emisních spekter

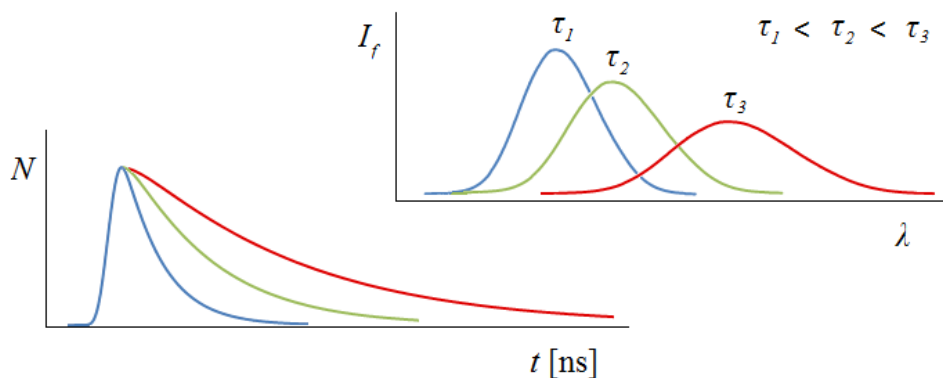
Přímé měření TRES bylo sice první používanou metodou, ale dnes je tato metoda vzácná. Přímé měření je jednoduché na pochopení, ale je vážně limitováno. Tato metoda neposkytuje dekonvoluci s funkcí odezvy přístroje a získané TRES obsahují zkreslení. Dnes se TRES obvykle získávají nepřímě. Měření začíná získáním poklesů intenzity fluorescence při různých vlnových délkách přes celé emisní spektrum. Tyto poklesy intenzity jsou závislé na pozorovací emisní vlnové délce a to kvůli času potřebnému k přechodu ze stavu F do R nebo mezi mezistavy (pro model relaxace rozpouštědla). Na obrázku 10 je znázorněna situace tří různě zrelaxovaných fluoroforů. Zelená křivka ukazuje pokles intenzity celkové emise (při vyřazeném monochromátoru) nebo pokles, který by byl pozorován při absenci procesů excitovaného stavu. Pokles intenzity změřený na krátkovlnné straně spektra je rychlejší než celková emise, protože fluorofory emitující dříve emitují v kratších vlnových délkách, jelikož nestihly ztratit tolik energie při reorientaci. Naopak při měření poklesu intenzity v dlouhovlnné oblasti emisního spektra budou změřeny zrelaxované fluorofory s delší dobou života a tedy i delším poklesem [9].

Získané parametry z naměřených poklesů intenzity fluorescence se pak použijí pro výpočet TRES v libovolných časech (t) následně po excitaci pulzem záření podle vztahu:

$$I(\lambda, t) = I_{ss}(\lambda) \frac{\sum_j \alpha_j(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_j(\lambda)}}}{\sum_j \alpha_j(\lambda) \tau_j(\lambda)}, \quad (13)$$

kde I je intenzita TRES při zvoleném čase t a při dané vlnové délce λ , I_{ss} je příslušná intenzita ustálené fluorescence při dané vlnové délce a α_j a τ_j jsou parametry příslušných fluoroforů o počtu j vztahující se k poklesu intenzity při dané vlnové délce [27, 28, 29]. Kdybychom mohli pozorovat emisi v krátkém okamžiku po excitaci pulzem, tak v případě kontinuálního modelu bude po okamžitém pozorování (př. 1 ns) pozorováno nezrelaxované spektrum,

posunuté do modré části spektra. Při pozdějším pozorování bude více molekul zrelaxovaných a emitujících v delších vlnových délkách, čímž získáme spektrum, které se postupně posouvá k delším časům a delším vlnovým délkám. U modelu dvou stavů je při krátkých pozorovacích časech emise posunuta ke kratším vlnovým délkám. Při delších pozorovacích časech se bude intenzita na krátkovlnné straně spektra snižovat a na opačné straně emisního spektra se objeví nové maximum o postupně rostoucí intenzitě [9].



Obrázek 10: Souvislost délky poklesu intenzity fluorescence s emisní vlnovou délkou

2.3.4 Závislost emisního spektra na excitační vlnové délce

Obecně se předpokládá, že emisní spektra jsou nezávislá na excitační vlnové délce. Toto tvrzení platí pro fluorofory v tekutých rozpouštědlech. Pro fluorofory ve viskózních a středně viskózních prostředích to už ale nemusí být pravda. Pro polární fluorofory v podmínkách, kdy relaxace rozpouštědla není dokončena, se emisní spektrum posouvá k delším vlnovým délkám, když je použita excitace na červené straně excitačního spektra. Excitací z centra excitačního spektra je získána obvyklá emise stavu Franck-Condonova. Delší excitační vlnová délka ale excituje jen ty fluorofory, jejichž absorpce je při nižší energii. To je umožněno tím, že ve viskóznějších regionech je konfigurace molekul rozpouštědla okolo některých molekul fluoroforu podobná, jako kdyby šlo o zrelaxovaný stav. Tyto fluorofory jsou typicky více provázány vodíkovými vazbami s molekulami rozpouštědla, a tak vykazují emisi posunutou k vyšším vlnovým délkám [9].

Efekt tohoto posunutí emise k delším vlnovým délkám nazývaný „red-edge excitation shift“ (REES) je možné studovat například u fluoroforů lokalizovaných v regionu hlav lipidových dvojvrstev, protože vykazují zvýšenou viskozitu [9].

2.4 Asociativní koloidy

Asociativní koloidní soustavy vznikají vratnou asociací z pravých roztoků nízkomolekulárních látek, které se nazývají povrchově aktivní látky (PAL). Asociací vznikají koloidně disperzní částice, které se nazývají micely. Povrchově aktivní látky (nazývané také tenzidy nebo surfaktanty) se skládají ze dvou základních částí. Jedna část molekuly PAL je lyofilní, tedy s velkou afinitou k rozpouštědлу, a druhá část je naopak lyofóbní a v rozpouštědle je nerozpustná. Molekuly PAL se proto také nazývají amfipatické nebo amfifilní. Jedna část molekuly tíhne zpravidla k polárnímu prostředí, druhá část

k prostředí nepolárnímu. Polární část se nazývá hlava, nepolární částí je uhlovodíkový řetězec. PAL získaly svůj název od své schopnosti se ochotně a samovolně koncentrovat na fázovém rozhraní. Tímto chováním se molekuly PAL dostanou do stavu o termodynamicky nižší energii oproti případu, kdy by se nacházely volně v roztoku. Svým zakoncentrováním na fázovém rozhraní způsobí také snížení povrchového napětí mezi fázemi [30].

Povrchově aktivní látky lze podle určitých kritérií začlenit do několika skupin. Podle chemické povahy se dělí na anorganické, organické a organosilikátové. Podle schopnosti polární části molekuly PAL disociovat v roztoku nebo ne se PAL dělí na iontové a neiontové. Iontové PAL se dále dělí na aniontové, kationtové a amfoterní. PAL jsou nejčastěji organické povahy a jsou rozebrány v následujícím odstavci [30].

Neiontové PAL po svém rozpuštění v polárním rozpouštědle nezískávají náboj. Zpravidla se skládají z delšího uhlovodíkového řetězce a hydroxylové nebo esterové skupiny. Při rozpuštění aniontových PAL ve vodě vznikne na polární skupině záporný náboj. Vzniká tedy povrchově aktivní aniont, který obsahuje karboxylát, sulfát, nebo fosfát. Disociovaným kationtem je alkalický kov nebo amonný kationt. Mezi aniontové PAL patří například přirozená (alkalické soli vyšších mastných kyselin) a umělá mýdla (například soli alkylsulfonových kyselin). Kationtové PAL získají po rozpuštění kladný náboj a vzniká povrchově aktivní kationt. Mezi kationtové PAL patří hlavně kvartérní aminy, kde atom dusíku nese mimo dlouhý uhlovodíkový řetězec (10 až 18 atomů uhlíku) také tři methylové nebo ethylové skupiny. Aniont je většinou halogenidový. Nejznámějším zástupcem této skupiny je cetyltrimethylammonium bromid (CTAB). Molekuly amfoterních PAL získávají náboj v závislosti na okolním pH, protože obsahují kyselou i bazickou skupinu. Do této skupiny se řadí bílkoviny [30, 31].

Největší uplatnění nalézají aniontové a neiontové PAL a to v procesech praní a čištění. Dále se používají jako emulgátory a smáčedla. Směsi aniontových a kationtových PAL se nepoužívají, protože spolu ve vodě tvoří nerozpustné komplexy. Kationtové PAL nalézají uplatnění v kosmetice, jako součást baktericidních a antistatických přípravků, v prostředcích pro inhibici koroze, v textilních změkčovadlech a ve vlasových kondicionérech. Nejméně se využívají amfoterní PAL, nalézají uplatnění hlavně v kosmetice [30, 32].

2.4.1 Tvorba micel

PAL tvoří pravé roztoky jen do určité koncentrace, která se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Před dosažením této koncentrace se molekuly PAL nachází jednak jednotlivě ve volném roztoku, ale hlavně na fázových rozhraních. V případě polárního rozpouštědla například na rozhraní rozpouštědlo-vzduch. Při CMC jsou fázová rozhraní již plně obsazena a v roztoku se začínají tvořit nová fázová rozhraní (fáze), tvořená molekulami PAL. Vzniklé zpravidla kulové útvary se nazývají micely. Za příčinu micelizace se pokládají kohezní síly mezi molekulami vody, které jsou silnější než síly mezi nepolárními řetězci. Je potřeba zmínit, že micelární roztok je dynamický systém, kde dochází k neustálé výměně molekul PAL mezi roztokem a micelou [33].

Jestliže je rozpouštědlo polární, v kontaktu s rozpouštědlem jsou polární části molekul PAL a vytváří elektrickou dvojvrstvu. Nepolární řetězce tvoří vlastní fázi, hydrofóbní jádro,

čímž je maximálně omezen styk uhlovodíkových řetězců s polárním rozpouštědlem. V případě nepolárního rozpouštědla je orientace molekul PAL opačná a vzniklé micely se nazývají reverzní. Při větší koncentraci PAL v roztoku dochází ke vzniku micel složitějších tvarů. Vznikají cylindrické či lamelární micely.

Pro vznik micel je nutné kromě dosažení dostatečné koncentrace také dosažení jisté teploty, která se nazývá Krafftova teplota. Při ní rozpustnost PAL dosahuje hodnoty CMC. Při nižších teplotách roztoky PAL micely netvoří, nad touto teplotou rozpustnost PAL v roztoku silně stoupá právě díky tvorbě micel. Krafftova teplota například pro CTAB ve vodě je asi 25 °C [30, 34, 35].

Micely lze charakterizovat tzv. agregačním číslem, které udává počet molekul PAL tvořící micelu. Agregační číslo závisí na několika faktorech. Roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Velikost této plochy závisí jednak na vlastní velikosti polární skupiny, ale také na odpudivých silách, kterými na sebe působí okolní polární skupiny, jestliže jsou nabitě [31].

Kritická micelární koncentrace se pro jednotlivé PAL stanovuje na základě změny směrnice koncentračních závislostí mnohých fyzikálně-chemických vlastností roztoků PAL, jako je povrchové napětí, molární vodivost, hustota, viskozita, osmotický tlak, turbidita nebo rozptyl světla. Podstatou je přechod analytické disperze na koloidní disperzi [30, 31].

2.4.2 Faktory ovlivňující tvorbu micel

Hodnota kritické micelární koncentrace je ovlivněna jak vlastnostmi polární a nepolární části molekuly PAL, tak i rozpouštědlem a látkami v něm rozpuštěnými. Pro případ polárního rozpouštědla hodnota CMC klesá s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce a stoupá s rozvětveností řetězce a přítomností nenasycených vazeb nebo polárních skupin uprostřed řetězce. Vliv hydrofilní části na CMC je dán hlavně jejím nábojem. Při stejné délce uhlovodíkového řetězce je CMC neiontových PAL nižší než u iontových. U neiontových PAL záleží na rozměrech a povaze polární skupiny, u iontových PAL nemá hydrofilní část značný vliv na CMC. Výraznější vliv zde má protiiont vzniklý disociací. Se zvyšujícím se nábojem protiiontu klesá hodnota CMC [31].

Vliv na CMC má i přítomnost jednoduchých anorganických elektrolytů v roztoku. V případě iontových PAL dochází se zvyšující se koncentrací elektrolytu ke snižování hodnoty CMC, což je způsobeno stíněním repulze mezi nabitými hlavami molekul PAL. S rostoucí iontovou silou je zároveň ovlivněn i rozměr micel, kdy dochází ke zvýšení agregačního čísla, což je opět důsledek snížení elektrostatické repulze. Například pro případ CTAB jsou některá agregační čísla uvedena v tabulce 1. Chování neiontových PAL téměř není ovlivněno přítomností elektrolytu [31, 35].

Tabulka 1: Hodnoty agregačního čísla (N) pro CTAB při 30 °C [36]

| | ve vodě | v přítomnosti NaCl (10mM) |
|-------------------------------|---------|---------------------------|
| N_{CMC} | 106 | 114 |
| $N_{25 \text{ mM}}$ (nad CMC) | 127 | 138 |

V závislosti na přidání vhodné látky do roztoku PAL může dojít k agregaci PAL i při nižší koncentraci, než je kritická micelární koncentrace. Tato nižší koncentrace se nazývá kritická agregační koncentrace (CAC) a dochází při ní k vytvoření tzv. minimicel asociovaných na přidané látce, kterou mohou být vhodné polymery, se kterými minimicely interagují pomocí hydrofóbních i elektrostatických interakcí [37]. Micelizaci lze někdy naopak úplně potlačit a to přidáním silně polární látky (např. močovina).

2.4.3 Solubilizace

Významnou vlastností micelárních roztoků PAL je schopnost tzv. solubilizace neboli schopnost rozpouštět látky, které jsou v daném rozpouštědle nerozpustné. Takové látky se zabudovávají do micel a zůstávají tedy v roztoku. Mechanismus solubilizace může být různý v závislosti na povaze solubilizované látky. V případě polárního rozpouštědla a nepolární látky, přejde nepolární látka do jádra micely. Při solubilizaci polárně-nepolární látky se tato látka zabuduje mezi molekuly PAL tak, že polární skupiny směřují k rozpouštědлу a nepolární do jádra micely. Solubilizované polární látky se potom nachází na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu. Při solubilizaci roste hmotnost micel a to jednak kvůli přítomnosti solubilizované látky a jednak kvůli většímu počtu molekul PAL, který je nutný jestliže solubilizovaná látka zvětší objem jádra micely [30, 31].

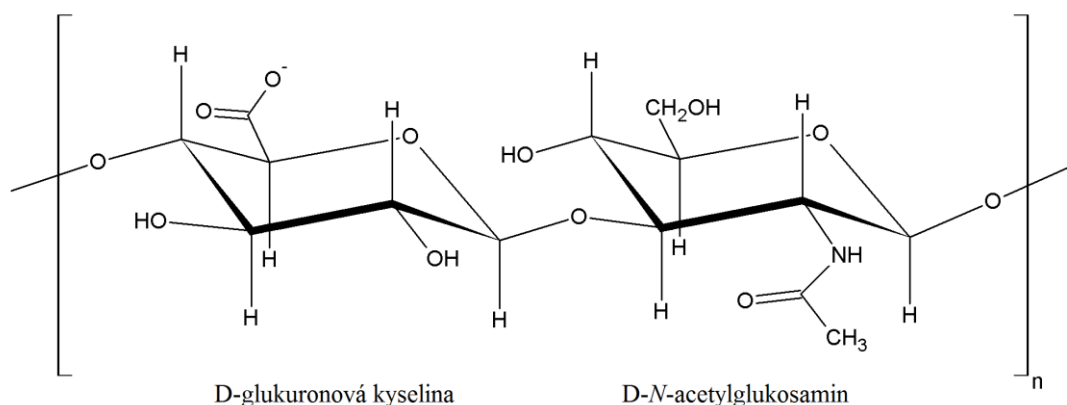
Na procesu solubilizace je založeno veškeré praní a čištění. Využívá se také k ovlivnění kinetiky některých reakcí, jejichž reaktanty jsou zakoncentrovány v micelách. Dále je proces solubilizace využíván ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. V posledním období se objevují nové oblasti využití solubilizace do micel jako například syntéza nanostrukturních látek nebo využití micel jako nosiče léčiva [30, 31, 35].

2.5 Hyaluronan

2.5.1 Obecná charakteristika

Hyaluronan je relativně jednoduchý polysacharid přirozeně se objevující v těle všech obratlovců a také některých kmenů bakterie *Streptococcus* [38]. Jde o lineární, nevětvenou makromolekulu s opakující se disacharidovou jednotkou, která se skládá z D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu. Ty jsou k sobě připojeny přes *beta*-1,4 a *beta*-1,3 glykosidickou vazbou: [D-glukuronová kyselina – *beta*-1,3 – D-N-acetylglukosamin – *beta*-1,4]_n (Obrázek 11). Počet opakujících se disacharidových jednotek může dosáhnout až 10 000 i více, což odpovídá molekulové hmotnosti asi 4 miliony Daltonů (jedna disacharidová jednotka odpovídá asi 400 Daltonům). Délka molekuly obsahující 10 000 disacharidových jednotek pak při natažení dosahuje délky asi 10 μm, což je délka odpovídající zhruba průměru jedné červené krvinky (průměrná délka disacharidu je asi 1 nm) [39].

Hyaluronan se primárně nachází v extracelulární matrix a pericelulární matrix (povrch buněk), existuje ale i v intracelulárním prostoru. Prakticky je přítomná téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních [40]. Ve vysokých koncentracích se vyskytuje v několika měkkých pojivových tkáních zahrnujících kůži, pupeční šňůru, synoviální tekutinu a oční sklivec. Významná množství hyaluronanu jsou také v plicích, ledvinách, mozku a ve svalech [39].



Obrázek 11: Struktura hyaluronanu

Biologické funkce hyaluronanu zahrnují udržování elastoviskozity tekutých spojovacích tkání jako je extracelulární matrix, kloubová synoviální tekutina a oční sklivec, kontrolu hydratace tkání a transport vody, vytváření supramolekulárních proteoglykanů v extracelulární matrix, funkci signalizační molekuly pomocí interakce s receptory na povrchu buněk, mitosu, migraci buněk, vývoj nádoru a metastázování a regulaci zánětlivých procesů. Díky schopnosti vázat vodu funguje také jako lubrikant pro pohyblivé části těla, jako jsou klouby a svaly [39].

Hyaluronan se řadí mezi glykosaminoglykany, kam patří například také dermatansulfát, heparansulfát, heparin, chondroitinsulfát nebo keratansulfát. Spolu s hyaluronanem představují základní složku pojivových tkání. Jedná se o dlouhé nevětvené heteropolysacharidy tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami, kdy jedním členem je uronová kyselina a druhým členem je glykosamin. Hyaluronan patří mezi nejjednodušší glykosaminoglykany, jediný není kovalentně spojený s proteiny, jediný není sulfonovaný a jediný není syntetizovaný v Golgiho aparátu. Jeho syntéza probíhá pomocí skupiny integrálních membránových proteinů nazývaných hyaluronan syntázy [40]. Degradace potom probíhá pomocí tří enzymů (u savců) a skládá se z oddělených kroků, kdy vznikají řetězce o postupně se snižující molekulové hmotnosti a se značně odlišnou biologickou funkcí. Degradace probíhá hlavně v lymfatickém systému, odkud fragmenty o nejnižší molekulové hmotnosti putují do krevního řečiště, odkud je jich asi 90 % odstraněno játry a 10 % ledvinami a slezinou [39, 41].

Hyaluronan se získává mikrobiální fermentací z průmyslově pěstovaných geneticky modifikovaných bakterií *Bacillus subtilis* a *Streptococcus Equi*. Dříve se získával extrakcí z živočišných zdrojů, například z kohoutích hřebínků, ale od těchto zdrojů se upustilo, protože hyaluronan je zde součástí proteoglykanových komplexů a jeho čištění je náročné. Navíc je zde riziko infekce a imunitní reakce [42].

2.5.2 Struktura v roztoku

2.5.2.1 Primární a sekundární struktura

Hyaluronan se řadí mezi polyanionty, protože glukuronová kyselina nese karboxylovou skupinu, která je při fyziologickém pH převážně disociovaná (pK karboxylové skupiny je 3–4

[38]) a uděluje hyaluronanu záporný náboj. Elektroneutralitu pak zaručuje sodný, draselný, vápenatý nebo hořečnatý kationt. Přítomnost nábojů je klíčová pro rozpustnost hyaluronanu ve vodě. Při plné esterifikaci methyly se stává molekula ve vodě nerozpustnou [43].

Ve fyziologickém roztoku je kostra molekuly hyaluronanu vyztužená kombinací chemické struktury disacharidu, interních vodíkových vazeb a hydrofóbních interakcí a interakcemi s rozpouštědlem [39].

Oba cukry tvořící disacharidovou jednotku jsou prostorově podobné glukóze, která v *beta* konfiguraci dovoluje objemným skupinám (hydroxyl, karboxylát, acetylamin a anomerní uhlík na sousedním cukru) být stéricky výhodně umístěny v ekvatoriální poloze, přičemž všechny malé vodíkové atomy okupují méně stéricky výhodné axiální polohy. Pro strukturu hyaluronanu jsou dále významné dva typy vazeb. Prvním typem je vazba prostřednictvím kyslíkového atomu v cyklech cukerných jednotek, která je relativně rigidní. Druhým typem vazby je glykosidická vazba tvořící spojení mezi sousedními cukernými cykly. Je tvořena opět atomem kyslíku, ale teoreticky umožňuje vzájemnou rotaci cukerných cyklů o 360°. Ve skutečnosti je ale každá disacharidová jednotka pootočena právě o 180°. Proto je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní a tvoří strukturu kroučící se ploché pásky, přesněji dvojskládané šroubovice (two-fold helix). Na stranách „pásky“ se pravidelně střídají tzv. „hydrofobic patches“, což jsou hydrofóbní oblasti tvořené axiálními vodíkovými atomy. Tato sekundární struktura má důležitou vlastnost, že obě strany jsou identické. Mimo jiné to umožňuje agregaci s dalším řetězcem hyaluronanu a to prostřednictvím právě „hydrofobic patches“ (hydrofóbními interakcemi) a prostřednictvím vodíkových vazeb mezi acetamino a karboxylovými skupinami (elektrostatická repulze mezi negativními náboji není dostatečně silná). Tyto interakce jsou krátkého dosahu a požadují blízkou komplementaritu mezi oběma molekulami, což je nejlépe dosaženo, když jsou k sobě hyaluronanové řetězce antiparalelní. Důsledkem tohoto je možnost rovnoměrného růstu agregátů po obou stranách. Tato struktura hyaluronanu v roztoku je také stabilizována vnějšími vodíkovými vazbami prostřednictvím hydroxylových skupin na cukerných cyklech. Důsledkem vzniku těchto vazeb zachycuje řetězec hyaluronanu asi 1 000 krát svou hmotnost ve vodě [39, 43].

V roztoku je dvojskládaná šroubovice hyaluronanu expandovaná a už při nízkých koncentracích (od 1 g/l [38]) se jednotlivé řetězce mezi sebou zamotávají. To pravděpodobně přispívá k neobvyklému reologickému chování. Při vyšších koncentracích mají roztoky extrémně vysokou, ale na smyku závislou viskozitu, kdy jednaprocentní roztok připomíná želé, ale jestliže je vložen pod tlak, pohybuje se lehce. Tato vlastnost hyaluronanových roztoků je dělá ideálními lubrikanty [39].

Oblasti „hydrofobic patches“ v řetězci hyaluronanu mají zvláštní význam. Jsou poměrně objemné a obsahují asi 8 uhlíkových atomů. Díky nim lze hyaluronan považovat za amfifilní molekulu, která má sice vlastnosti silně hydrofilního materiálu, ale současně obsahuje hydrofóbní oblasti charakteristické pro lipidy. „Hydrofobic patches“ mohou mít daleko dosahující implikace pro (hydrofóbní) molekuly ve vodním prostředí [43].

2.5.2.2 Terciální struktura

Už při velmi nízkých koncentracích (1 mg/l) tvoří hyaluronan síťovitou strukturu podobnou včelí plástvi, která při vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu nevykazuje žádné konce. Síťovina je v podstatě nekonečná. Každá hyaluronanová molekula je tak spojena se všemi ostatními skrze síť. Na druhé straně, hyaluronan o nižší molekulové hmotnosti tvoří při nízkých koncentracích také síťovitou strukturu, ale vznikají pouze ostrůvky síťovin, které jsou od sebe separované. Interakce, které drží síť pohromadě, jsou poměrně slabé, takže agregáty se tvoří a rozpadají v závislosti na podmínkách a teplotě. Póry ve struktuře tak mohou mít různou velikost a teoreticky jí mohou projít molekuly všech velikostí. Čím větší ale molekula bude, tím pomaleji bude procházet. Malé molekuly jako voda, elektrolyty a živiny mohou procházet volně. Jak koncentrace hyaluronanu roste, síť obsahuje silnější větve, dokud koncentrace hyaluronanu nedosáhne hodnoty jako například v synoviální tekutině (přes 1 g/l), kdy se začnou tvořit fóliím a trubicím podobné morfologie. Jedním z důsledků formování terciální struktury i při nízkých koncentracích je transparentnost očního sklivce (~2 g/l) [38, 43].

2.5.3 Využití

Díky multidisciplinárním objevům o struktuře, vlastnostech, biologické aktivitě a chemických modifikacích tohoto unikátního polymeru, našel hyaluronan úspěch v neobvykle širokém rozsahu biomedicínských aplikací [39]. Hyaluronanové přípravky se používají k ochraně jemných tkání a k poskytnutí prostoru pro chirurgické manipulace (oftalmologická chirurgie); používají se k vyplnění a rozšíření tkáňových prostor, jako například v kůži, u svalů svěrače a tkání hltanu, uplatňují se při separaci povrchů pojivových tkání narušených při chirurgických procesech nebo při poranění, aby se zamezilo adhezi a nadměrné tvorbě jizev; používají se k náhradě nebo doplnění tkáňových tekutin, jako například náhradou synoviální tekutiny při artritidě a také pro utišení bolesti; dále se používají k ochraně zdravých i poraněných povrchů tkání před vysoušením nebo před škodlivinami v životním prostředí a pro podporu hojení takových povrchů. Využití nalézá hyaluronan také v kosmetice [40].

Obecně nachází hyaluronan uplatnění v oftalmologii, ortopedii, revmatologii, otorinolaryngologii, v chirurgii a v léčení poranění, v dermatologii a plastické chirurgii, ve farmakologii a v systémech pro distribuci léčiv [40].

V problematice nosičů léčiv se kromě biokompatibility a biodegradability využívá modifikovatelnosti hyaluronanového řetězce nebo možnosti zesíťování prostřednictvím karboxylových skupin hyaluronanu k vytvoření potřebných materiálů. Tyto materiály jsou vyráběny ve formě filmů, mikrosfér, liposomů, vláken a hydrogelů. Hyaluronan může být také navázán přímo na léčivo. Mimo to je hyaluronan používán k vylepšení biokompatibility chitosanových mikrosfér, které se používají jako kapsule pro distribuci léčiv [39].

2.6 Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy

Hyaluronan podobně jako jiné záporně nabitě vodorozpustné polymery interaguje s kationtovými tenzidy. Tyto interakce jsou elektrostatické povahy, ale protože hyaluronan

obsahuje také hydrofóbní oblasti, působí zde také hydrofóbní interakce. Obě tyto přitažlivé interakce způsobují, že dochází k vzájemné agregaci mezi těmito dvěma komponentami. Obecně platí, že polymer bez náboje a bez hydrofóbní modifikace nevykazuje s nabitými tenzidy žádnou významnou interakci. Nabitý polymer pak vykazuje silnou interakci s opačně nabitými tenzidy díky elektrostatickým interakcím. Zajímavé ale je, že polymer pouze s hydrofóbní modifikací asociuje s nabitými tenzidy (jejich micelami). Dokonce platí, že i když mají tenzid a polymer stejný typ náboje a polymer obsahuje hydrofóbní modifikaci, mohou hydrofóbní interakce překonat nepříznivé elektrostatické síly a může dojít asociaci. Mezi polymerem s nábojem i hydrofóbní modifikací a opačně nabitým tenzidem pak může dojít až k formování velmi silných gelů. Dále budou rozebírány interakce mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy [44, 45, 46].

Hyaluronanové řetězce primárně interagují s micelami než s jednotlivými molekulami tenzidu. Nejnižší koncentrace tenzidu nutná k navázání na řetězec hyaluronanu je kritická agregační koncentrace (CAC), kdy na řetězci hyaluronanu vznikají minimicely. Princip vzniku je následující. Z čistě elektrostatického hlediska se volný tenzidový iont (např. CTA^+) chová stejně jako hyaluronanový protiiont (např. Na^+) a negativně nabitý polyelektrolyt by neměl preferovat jakýkoli z těchto dvou protiiontů. Nicméně hydrofobicita (a velikost) tenzidového iontu vede k jeho preferenci, jestliže je jeho kontakt s vodou v sousedství polyelektrolytu redukován. Následkem vyšší lokální koncentrace tenzidového iontu blízko polyelektrolytu oproti celému objemu může být lokálně překonána CMC a tak mohou být vytvořeny micelární agregáty i při celkové koncentraci tenzidu nižší než CMC [46, 47].

Po přesažení CMC tenzidu v celém roztoku jsou na řetězci hyaluronanu asociované micelám podobné klastry. Agregační čísla klastrů jsou spíše neovlivněna interakcí s hyaluronanem, což může být zdůvodněno poněkud nízkou lineární hustotou náboje hyaluronanu a jeho relativně vysokou neohebností. Tato struktura platí také pro koncentrovanou fázi u vzorků, kde proběhla fázová separace – vznik gelu [44, 46].

Fázové chování systému hyaluronan-kationtový tenzid-voda lze popsat ternárním (trojúhelníkovým) fázovým diagramem. Převažující izotropní jednofázová oblast diagramu je narušena jednou dvojfázovou oblastí vystupující z rohu vody. Má kapkovitý tvar a je zřetelně nakloněna k rohu tenzidu. U vzorků lokalizovaných v dvojfázové oblasti nastává fázová separace, kdy dojde k vytvoření silně viskózního gelu, který obsahuje velkou koncentraci jak hyaluronanu, tak tenzidu, a supernatantu, který je zředěný alespoň v jedné ze dvou složek. Příčinou fázové separace je redukce náboje mezi tenzidem a elektrolytem, čímž je snížena jejich hydrofilicita a i repulze v rámci polymeru. Pro různé molekulové hmotnosti hyaluronanu a různé typy kationtových tenzidů nabývá kapkovitá dvojfázová oblast diagramu mírně odlišný tvar. Ke zvětšení dvojfázové oblasti dochází při použití vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu a/nebo tenzidu s delším uhlovodíkovým řetězcem [44, 46, 48].

Vzniklé gely jsou vždy transparentní (stejně tak i supernatant) a jsou izotropní s relativně vysokým obsahem vody, což odráží vysokou hydrofilicitu vzniklého komplexu. Přesto jsou poměrně tuhé a nelepí. Jestliže jde o gely vytvořené při menším množství vody, je možné je nařezat a několik minut si zachovají svůj tvar. Tvorba gelů platí ale jen pro hyaluronan o dostatečně vysoké molekulové hmotnosti. Při použití nízké molekulové hmotnosti

hyaluronanu bude vzniklá koncentrovaná fáze negelová (tekutější). Gel vykazuje přítomnost krystalické struktury a jednoznačně obsahuje hydrofóbní domény tvořené tenzidy už jen proto, že koncentrace tenzidu v gelu přesahuje CMC. Micely v gelu by měly mít podobný tvar i velikost jako volné micely [44, 46, 49].

Samovolná difúze tenzidů je v gelech velmi nízká, v micelárních roztocích je ale situace obdobná, takže vázání na polyelektrolyt by micely nemělo výrazně omezovat. Na druhou stranu samovolná difúze hyaluronanových řetězců je pomalejší kvůli vzniku komplexů hyaluronan-tenzid. Struktura těchto komplexů vznikla pravděpodobně vícestrannou kondenzací micel s hyaluronanovými řetězci, spíše než jednostrannou kondenzací, kdy vzniká tzv. struktura perlového náhrdelníku. Micely tedy tvoří mŕstkové body mezi hyaluronanovými řetězci. Samovolná difúze vody je v gelech také omezená a to díky překážkám a díky přítomnosti vázané hydratační vody [44, 47].

2.6.1 Efekt přidání jednoduché soli

Velikost dvojfázové oblasti v ternárním fázovém diagramu lze zmenšit přidáním jednoduchého elektrolytu (např. NaCl, NaBr). Příčinou je snižující se síla interakce mezi hyaluronanem a micelami, která je způsobena odstíněním elektrostatických interakcí zvýšením iontové síly roztoku. Čím více jednoduché soli bude přidáno, tím bude dvojfázová oblast menší a může být i úplně potlačena. Koncentrace jednoduchého elektrolytu, kdy dojde k odstranění dvojfázové oblasti, se nazývá kritická koncentrace elektrolytu. Interakce mezi hyaluronanem a micelami ale není možné zcela potlačit, pravděpodobně kvůli hydrofóbním interakcím [46, 47, 48, 50].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Časově rozlišená emisní spektra v koloidních systémech

V této sekci byla věnována pozornost zejména měření časově rozlišených emisních spekter, která byla hlavní technikou použitou v této práci.

N. Periasamy a A. S. R. Koti se v roce 2003 věnovali problematice měření jak časově rozlišených emisních spekter (TRES), tak časově rozlišených emisních spekter, která jsou normalizovaná v ploše pod křivkou (TRANES – time-resolved area-normalized spectra). TRANES lze získat přepočtem TRES. TRES jsou kvalifikována jako metoda prezentování emisních spekter během doby excitovaného stavu fluoroforu, TRANES jsou kvalifikována jako užitečná metoda pro potvrzení počtu fluorescenčních druhů ve vzorku, čímž eliminuje jistý nedostatek TRES, který spočívá právě v možnosti špatné interpretace počtu fluoroforů. Autor interpretace může na základě určité individuálnosti ve vyhodnocení určit ve studovaném systému více fluorescenčních druhů, než ve skutečnosti obsahuje. Toto platí zvláště ve složitých systémech, kde se může fluorofor vyskytovat ve více mikroprostředích. Společné použití TRES a TRANES pak dělá interpretaci jednoznačnou. V článku je popsán postup získání TRES a TRANES, kdy je nejdříve změřeno emisní spektrum studovaného systému a poté jsou shromážděny poklesy intenzity fluorescence při vlnových délkách v celém rozsahu emisního spektra v malých intervalech. Získané poklesy jsou proloženy multi-exponenciální funkcí za účelem dekonvoluce naměřené fluorescence s odezvou přístroje. K posouzení dobrého proložení jsou použita vážená rezidua a χ_r^2 . Získaným parametrům poklesu (pre-exponenciální faktory a doby života) nepřikládají autoři žádný fyzikální význam a pouze hodnotí průměrnou dobu života z celého vzorku pro jednotlivé vlnové délky pomocí vztahu:

$$\tau_{av}(\lambda) = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}{\sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda)}, \quad (14)$$

kde λ je vlnová délka, n je počet exponenciál v poklesu intenzity fluorescence (počet dob života), α je pre-exponenciální faktor (hodnoty musí být kladné) a τ je doba života fluoroforu. Jestliže je ve vzorku přítomen jeden druh fluoroforu, hodnota průměrné doby života se nemění. Pro dva a více emitujících fluoroforů (druhů fluoroforu) se hodnota průměrné doby života hladce mění. TRES byla vypočítána pomocí vztahu 13 zmíněného v teoretické části. TRANES byla následně vytvořena vyrovnáním plochy každého časově rozlišeného emisního spektra na konstantní hodnotu získanou při $t = 0$ s.

Dále se autoři věnovali rozboru interpretace TRES a TRANES. U TRES až na pár výjimek s rostoucím časem klesá intenzita, což někdy může způsobit, že nejsou patrné některé jemné rozdíly ve tvaru spektra. Proto se v těchto případech používají TRANES, která tyto rozdíly zvýrazňují. Autoři dále uvádí několik typů TRES a TRANES, které se mohou vyskytovat.

V prvním typu (*typ a*) je sledováno identické spektrum při všech časech, což ukazuje na jeden druh fluoroforu. U TRES jen klesá intenzita, u TRANES je spektrum naprosto identické. Jde o nejjednodušší případ.

V druhém typu (*typ b*) se TRES v čase mění a v TRANES se objevuje tzv. isoemisivní bod, což je vlnová délka, při které se intenzita fluorescence v čase nemění. Toto ukazuje na přítomnost právě dvou druhů fluoroforu. Jako příklad byla uvedena nilská červeň ve vodném micelárním roztoku, kde TRES vykazovala posun emisního píku k delším vlnovým délkám, což by ukazovalo na kontinuální model. TRANES ale ukázala jeden isoemisivní bod. Ve vzorku tedy existovaly dva druhy nilské červeně. Ty byly situované v palisádové vrstvě micel s odlišným kontaktem s molekulami vody. Interpretace pouze na základě TRES by byla v tomto případě špatná. Jako další příklad byl uveden 2-naftol ve vodě, kde TRES na rozdíl od předchozího případu ukazuje jednoznačně na přítomnost dvou fluorescenčních druhů, což je patrné, protože spektrální píky obou druhů jsou dobře separované. TRANES opět ukazuje jeden isoemisivní bod. Jde o deprotonaci 2-naftolu v excitovaném stavu.

Třetím typem (*typ c*) je případ, kdy se v TRANES objeví více isoemisivních bodů, což ukazuje na vyšší počet fluoroforů. Platí, že počet druhů fluoroforu je o jednotku větší, než je počet isoemisivních bodů. Dva isoemisivní body se například objeví u směsi tří barviv rozpuštěných v methanolu, z nichž každé má jednu dobu života. Jde o nilskou červeň, oxonol a DODCI, kdy se jeden isoemisivní bod objevil v časovém intervalu 0,1–1 ns a druhý v intervalu 1–10 ns.

Ve čtvrtém typu TRES a TRANES (*typ d*) dochází k nepřetržitému posunu emisního píku v časovém intervalu $0 \text{ s} - t_k$, následovaný isoemisivním bodem při $t > t_k$, což v prvním časovém intervalu indikuje kontinuum druhů fluoroforu a v druhém intervalu ukazuje na dva druhy fluoroforu.

Pátý typ (*typ e*) vykazuje nepřetržitý posun emisních píků s časem a ukazuje na kontinuum druhů fluoroforu. Příkladem je nilská červeň v 2-oktanolu, kde je kontinuum fluorescenčních druhů vytvořeno díky pomalé relaxaci molekul rozpouštědla okolo excitované molekuly nilské červeně [51].

Obdobné závěry z problematiky TRES a TRANES publikovali *N. Periasamy* a *A. S. R. Koti* už v roce 2001 [52].

A. S. R. Koti a spol. v roce 2001 popsali interpretaci TRES a TRANES obdobně jako v předchozím případě. Postup získání těchto spekter byl také obdobný. Opět nebyl přikládán fyzikální význam modelu proložení (podstatná byla jen kritéria ukazující na dobré proložení) a byl používán čtyř-exponenciální model, i když v TRANES se objevil jen jeden isoemisivní bod ukazující pouze na dva druhy fluoroforu. Použitý model poskytoval lepší shodu dat. Dva imaginární fluorofory měly buď velmi malé pre-exponenciální faktory, nebo jejich doby života byly velmi podobné dvěma skutečným dobám života. Průměrná doba života je však stejná pro každou vlnovou délku pro jakýkoli model proložení [53].

A. S. R. Koti a spol. v roce 2003 popsali jedinečný přínos časově rozlišených měření pro pochopení struktury a dynamiky komplexních systémů jako jsou biologické systémy a modelové membrány. Například při relaxaci rozpouštědla okolo excitovaného fluoroforu

v lipidových dvojvrstvách lze zjistit fyzikální vlastnosti tohoto prostředí jako viskozitu a polaritu. Používali TRES a TRANES pro určení populační heterogenity osmi fluorescenčních sond v lipidových dvojvrstvách EggPC (L- α -fosfatidylcholin). Získání a vyhodnocení dat bylo obdobné jako v předchozích dvou případech, při vyhodnocování poklesů intenzity fluorescence opět nepřikládali parametrům proložení fyzikální význam a pro určení počtu fluorescenčních druhů použili TRANES. Jimi získaná spektra byla dělena do obdobných typů, jak v případě *N. Periasamy* a *A. S. R. Kotiho* z roku 2003 [54].

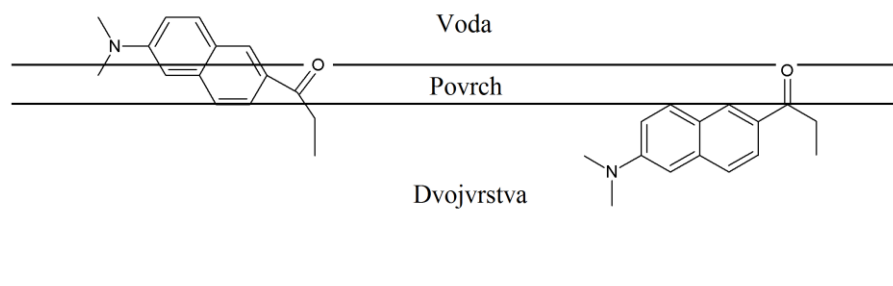
TRES a TRANES spektra jsou často používanou metodou pro charakterizaci různých systémů. *C. Tiseanu a spol.* v roce 2007 použili poklesy intenzity fluorescence, TRES a TRANES pro studium hydratovaných a kalcinovaných terbiem-dopovaných mikro-mezoporézních zeolitů-1. V těchto heterogenních systémech určili distribuci terbia, které fungovalo jako fluorescenční sonda [55]. Techniku TRES použil také *K. Kaushlendra* v roce 2013 při studiu uretanovo-methakrylátových kopolymerů značených pyrenem [56]. *C. Beatriz Barja a spol.* v roce 2005 měřili relaxace v tenkých filmech polyvinylalkoholu a polyvinylacetátu pomocí TRES prodanu a 4-aminoftalimidu [57]. *R. Hutterer a spol.* v roce 1997 studovali pomocí TRES relaxace *n*-anthroxyloxy mastných kyselin v parafinovém oleji a fosfatidylcholinových útvarech [58].

3.2 Chování použitých fluorescenčních sond v micelárních a jiných systémech imitujících biologické membrány

Fernando Moyano a spol. zkoumali v roce 2006 chování fluorescenční sondy prodanu pomocí absorpční a emisní spektroskopie, depolarizace a pomocí časově rozlišených měření a stacionární anizotropie. Nejdříve studovali chování prodanu v různých rozpouštědlech. Pomocí Kamlet-Taftovy solvatochromní porovnávací metody určovali interakce mezi molekulami prodanu a rozpouštědla. Výsledky ukázaly, že sonda v excitovaném stavu vykazuje bathochromní posun s polaritou/polarizovatelností, schopností tvořit vodíkové vazby jako donor a schopností tvořit vodíkové vazby jako akceptor/být donorem elektronového páru pro vytvoření koordinační vazby. Kromě posledního zmíněného parametru vykazuje sonda k těmto parametrům téměř dvakrát tak velkou citlivost než když je v základním stavu. Dále charakterizovali agregační chování prodanu. Nejdříve provedli měření v čisté vodě, kde upřesnili dosud známé informace. Prodan zde tvoří agregáty od koncentrace zhruba 10^{-5} M. V emisním spektru, které má maximum okolo 520 nm, se na modré straně spektra při vzniku agregátů objevuje nový pík u 430 nm. Doba života agregátu byla stanovena na 14,6 ns, přičemž dvě doby života monomerního prodanu ve vodě byly určeny na 0,65 a 2,27 ns. Tyto agregáty jsou složeny z více molekul prodanu.

Agregační chování prodanu bylo také zjišťováno ve vodném systému velkých unilamelárních vezikul vytvořených z DOPC (1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin). Emisní spektra těchto systémů ukázala hypsochromní posun, který souvisí s přesunem prodanu do vezikul, kde je prostředí oproti vodě méně polární. Prodan se do vezikul přemisťuje, protože je zde více rozpustný. Když koncentrace DOPC překročila 1 mg/ml, už nedocházelo k žádnému hypsochromnímu posunu a sonda by tedy měla existovat pouze ve vezikulách. Toto bylo potvrzeno také měřením stacionární anizotropie, kdy při zvyšující se

koncentraci DOPC rostla hodnota anizotropie a po přesažení zmíněné koncentrace se její hodnota ustálila. Oproti čisté vodě emisní spektra těchto systémů neprokázala agregaci prodanu. Pomocí měření REES (red-edge excitation shift) určili dvě lokace prodanu v rámci vezikul (Obrázek 12). Jedna část existuje v polárním a viskózním povrchovém regionu a vykazuje maximum emise okolo 490 nm, druhá část se nachází hlouběji ve vezikule, v méně polárním a méně viskózním prostředí, s maximem emise při 426 nm [59].



Obrázek 12: Dva typy umístění prodanu v rámci membrány

Ignác Čapek v roce 2002 studoval chování sond v micelárních systémech. Ohledně prodanu a laurdanu napsal, že mohou být použity k charakterizaci povrchu micel [60].

E. A. Lissi a spol. v roce 2000 studovali rozmístění prodanu a laurdanu mezi vnější rozpouštědlo a mikroagregáty v systémech AOT(1,4-bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný – aniontový tenzid)/heptan/voda v mikroemulzích typu V/O. Zjistili, že ani délka hydrofóbního řetězce, ani velikost vodného prostředí uvnitř agregátů významně neovlivňuje afinitu sond k agregátům. Jejich výsledky ukázaly, že sondy asociované na agregátech jsou lokalizované na jejich povrchu. Autoři popsali, že jestliže se laurdan nachází v gelové fázi (mikrofázi) má maximum emise okolo 440 nm, jestliže ve fázi podobné kapalným krystalům, maximum emise je asi 490 nm. Odtud pomocí GP profilů (tzv. generalizované polarizace) vyvodili, že laurdan v těchto systémech vykazuje nehomogenní populaci i přes svou lokaci na povrchu. Laurdan tak mohl být rozmístěn ve dvou různých prostředích nebo jeho molekuly v základním stavu byly různě stabilizovány molekulami vody. Plně hydratované mikroagregáty vykazovaly fluidní stav (fáze kapalných krystalů) [61].

Piotr Jurkiewicz a spol. v roce 2006 studovali pomocí relaxace rozpouštědla hydrataci hlav a mobilitu DOPC/DOTAP(di-oleoyl-trimethylammoniumpropan) dvojvrstev pomocí fluorescence prodanu, laurdanu a patmanu. Pro charakterizaci relaxace použili TRES. Popsali, že relaxace v čisté vodě trvá asi 0,3 ps, kdežto v hydratované fosfolipidové dvojvrstvě ve stavu kapalně krystalickém je relaxace asi 2 ns. Rekonstruovali TRES laurdanu při 0,5–8 ns, která ukázala postupný bathochromní posun od asi 430 do 500 nm, snižování intenzity fluorescence a rozšiřování s časem [62].

Justýna Barucha-Kraszewska a spol. v roce 2010 provedli studii ohledně dynamiky základního a excitovaného stavu prodanu a laurdanu. Výpočty prokázaly, že obě tyto amfifilní barviva upřednostňují lokaci v lipidové dvojvrstvě oproti vodnému prostředí. Popsali také rychlost relaxace rozpouštědla ve vodném prostředí (pikosekundová škála) a v prostředí DOPC dvojvrstvy (nanosekundová škála) [63].

Mathias Viard a spol. v roce 2001 studovali fotofyziku laurdanu při přechodu vezikuly v micelu pomocí časově rozlišené fluorescence. Laurdan má v organických rozpouštědlech složitější deexcitační cestu, která zahrnuje intramolekulární přenos náboje následovaný dielektrickou relaxací, jestliže je rozpouštědlo polární. Tyto dva procesy vedou k existenci tří emisních stavů laurdanu – lokálně excitovaný (LE), stav s přenosem náboje (ICT) a relaxovaný stav (R). Laurdan byl popsán jako vhodný nástroj k popsání míry penetrace a mobility molekul vody v amfifilních agregátech. Pomocí metody maximální entropie bylo rekonstruováno TRES. Pro různé systémy se objevovaly dva emisní pásy při asi 425 a 500 nm [64].

Brad A. Rowe a Sharon L. Neal v roce 2006 studovali fotokinetiku prodanu a laurdanu ve velkých unilamelárních vezikulách (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine – DMPC) pomocí časově rozlišené, fázově modulované fluorescence. Analýza ukázala, že obě sondy emitují typicky nejméně ve třech spektrálních komponentech, které mění svou intenzitu, jak se membrána stává gelem nebo kapalně krystalickou. Jde o stavy lokálně excitované (LE, maximum emise při 415 nm), stavy s přenosem náboje (ICT, maximum emise při 450 nm) a stavy relaxované rozpouštědlem (R, maximum emise při 490 nm). Bathochromně posunuté stavy se vyvíjí z LE stavu a nevykazují dynamický posun spojený s relaxací rozpouštědla. Stavy ICT a R jsou přisouzeny emisi sond z gelové fáze (ICT) a z fáze tekutých krystalů (R), tedy z povrchu membrán. Laurdan je v membránové dvojvrstvě oproti prodanu méně mobilní a měl by být ve dvojvrstvě hlouběji zapuštěn. Jeho hloubka nebo orientace se ale mohou měnit během fázové přeměny membrány. Prodan by měl být více mobilní a okupovat více mikroprostředí. Proto je překvapující, že tyto dvě sondy jsou si nápadně podobné ve svých emisních vlastnostech. Za zásadní posun ve vlnové délce při přechodu z LE na R stav může být odpovědná tvorba vodíkových můstků. Zásadní roli ve fotokinetice těchto sond bude proto nejspíš hrát hydratace dvojvrstvy [65].

K jiné představě o fotokinetice prodanu dospěli **Mercedes Novaira a spol.** ve své práci z roku 2007, kdy zkoumali prodan v aniontových voda/AOT(1,4-bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný)/n-heptan a kationtových voda/BHDC(benzyl-n-hexadecyl dimethylammonium chlorid)/benzen systémech reverzních micel pomocí absorpční, ustálené emisní fluorescence, TRES a TRANES. Při absenci vody v systémech a při postupném zvyšování koncentrace tenzidu se prodan přemísťoval z organického rozpouštědla na povrch reverzních micel. Po přidání vody vykazovala emisní spektra duální fluorescenci s novým pásem, který se objevil v nízkenergetické části spektra okolo 495 nm. Původně se tento pás přisuzoval emisi prodanu z vody (obsažené v reverzních micelách). Tato studie ukázala, že jde o emisi ze stavu ICT prodanu lokalizovaného na hydratovaném povrchu reverzních micel. Prostředí organického rozpouštědla ale prodan zcela neopouštěl. Při různých excitačních vlnových délkách byla pozorována různá maxima emise, což je způsobeno heterogenitou prodanu v základním stavu (dvě mikroprostředí – organická fáze a povrch reverzních micel).

Pro kationtový systém s přítomností vody se při přidávání tenzidu posouvala intenzita emise z asi 420 nm (prodan v benzenu) k novému pásu asi u 495 nm (popsaný ICT stav). Oproti aniontovému systému, v systému kationtovém se podle autorů prodan nacházel hlavně na té straně povrchu reverzních micel, která byla přikloněna k vodě. Pomocí TRES

a TRANES byly měřeny systémy bez i s přítomností vody. Bez přítomnosti vody jsou doby života závislé na emisní vlnové délce a data tedy odpovídají kontinuálnímu modelu. Na druhé straně TRES systému s přítomností vody v jádru reverzních micel se jeví jako model dvou stavů, ve kterém jsou doby života konstantní přes celé emisní spektrum. Při vyhodnocování TRES autoři nepřikládali poklesům intenzity fluorescence žádný význam, a proto museli pro jednoznačné zjištění počtu emisních druhů prodanu v systému použít TRANES. V systému s přítomností vody byl zjištěn jen jeden isoemisivní bod, což by odpovídalo dvěma dobám života. Autoři ovšem naměřili tři doby života a domnívají se, že z důvodu blízkosti dvou z nich nemohl vzniknout druhý isoemisivní bod. Dostatečná odlišnost dob života je totiž podmínkou pro vznik isoemisivního bodu. Podle výsledků prodan existuje nepopíratelně ve dvou mikroprostředích – v organickém rozpouštědle a na povrchu reverzních micel. Z organického rozpouštědla se emise prodanu objevovala z LE stavu, kdežto z povrchu micel ze stavu LE i ICT. Doby života byly zjišťovány při dvou vlnových délkách. Při 420 nm byly zjištěny dvě doby života: 2,59 ns (LE stav, benzen) a 1,07 ns (LE stav, povrch micel). Při 495 nm byla zjištěna jedna doba života: 3,12 ns (ICT stav, povrch micely). V systému kationtových reverzních micel s vodou ve svém jádře se tedy prodan vyskytoval ve třech odlišných emisních stavech [66].

K obdobným závěrům dospěli **Federico M. Agazzi a spol.** v roce 2013, když studovali emisi prodanu pro monitorování změn vlastností povrchu reverzních micel v systému n-heptan:benzen/benzyl-n-hexadecyldimethylammonium chloride – BHDC/voda. Použili zde absorpční, emisní spektroskopii a časově rozlišenou spektroskopii. Při zvyšování koncentrace tenzidu v nepolární směsi rozpouštědel se emise posouvala bathochromně k 430 nm. Prodan tedy podával informaci o polárnějším prostředí. Emisní maximum se lišilo pro různé excitační vlnové délky kvůli distribuci prodanu v základním stavu. Prodan emitoval jednak z organické fáze, jednak z povrchu vytvořených micel. Prodan tedy emitoval jen z LE stavu. Když do těchto systémů byla přidána voda, objevuje se pokles intenzity a bathochromní posun emise k maximu ve 495 nm, což koresponduje s ICT stavem prodanu. Tento stav se objevuje díky interakci povrchu BHDC s vodou. Voda totiž solvuje kationtový tenzid nevazebnými elektrony, zvyšuje mikropolaritu povrchu a dělá ho vhodnějším pro inkorporaci prodanu. V tomto systému s přítomností vody byly zjištěny doby života prodanu. Při 425 nm se objevily dvě doby života, z organické fáze (LE) a z povrchu micel (LE) v rozmezí 1,3–1,8 ns, při 520 nm byla zjištěna jedna doba života 3,5–3,6 ns (ICT). Existenci více stavů popsali autoři jako reakci excitovaného stavu. Výsledky ukázaly, že změna ve složení organického rozpouštědla v těchto systémech má dramatický efekt na fotofyziku prodanu, respektive vytváří změny na povrchu reverzních micel. Při zvyšování obsahu alifatického rozpouštědla je upřednostňována tvorba stavu ICT a pokles stavu LE [67].

A. Penzkofer a W. Leupacher v roce 1987 studovali fluorescenční chování vysoce koncentrovaných roztoků rhodaminu 6G (R6G). Ve vodě dochází k agregaci sondy od koncentrace asi $5 \cdot 10^{-6}$ M. Při koncentraci 10^{-5} M je zhruba 5 % monomerů asociovaných do dimerů [23].

Dmitri Toptygin a spol. v roce 1997 pozorovali absorpční spektra R6G agregátů ve vodném prostředí. Zjistili maxima absorpce monomeru, dimeru, trimeru a tetrameru: 526,

498, 485, 475 nm. O přítomnosti vyšších agregátů nebyl důkaz, jejich existenci ale nešlo vyloučit [25].

Xian-Fu Zhang a spol. v roce 2014 měřili doby života a kvantové výtěžky deseti rhodaminových derivátů pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Pro monomerní R6G ve vodě bylo zjištěno maximum absorpce při 525 nm a maximum emise při 554 nm. Doba života nevykazovala závislost na vlnové délce a byla rovna 4,22 ns [24].

Florian M. Zehentbauer a spol. v roce 2014 studovali vliv koncentrace a rozpouštědla na R6G. Ve vodných roztocích bylo zkoumáno chování v celém rozmezí rozpustnosti, kde se maximum emise pohybovalo od asi 550 nm pro zředěné roztoky do asi 620 nm pro roztoky vysoce koncentrované. Při středních koncentracích ukazoval tvar spektra na existenci dvou emisních pásů, navzájem se překrývajících. Při vyšších koncentracích, kdy docházelo k bathochromnímu posunu, vznikaly dimery typu H a J a i vyšší agregáty. Při koncentraci nižší než 10^{-5} M (pouze monomer) se maximum emise objevovalo při 552 nm [22].

V. Martínez Martínez a spol. v roce 2004 charakterizovali agregáty R6G vmezežené v tenkých filmech syntetického jílu (laponit) pomocí absorpční spektroskopie. Pozorovali existenci H- a J-dimeru, kdy H-dimer neposkytuje fluorescenci a může se chovat jako zhášec. J-dimer je pozorovatelný jak v emisním, tak v absorpčním spektru. Teoreticky může existovat i více typů dimerů [68].

Tato studie pokračovala prací autorů **V. Martíneze Martíneze a spol.** v roce 2005, kteří studovali stejný systém, ale pomocí ustálené a časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie. Při velkém zředění R6G v jílových filmech, kdy se R6G vyskytoval pouze v monomerní formě, vykazoval R6G maximum emise při 548 nm a dobu života 4,2 ns. Při zvýšení koncentrace R6G se objevily i dimerní formy tohoto barviva. Emise byla slabší a její maximum bylo posunuto k 575 nm. Při nejvyšších koncentracích R6G vznikaly agregáty vyššího řádu, jejichž maximum emise bylo u 600 nm. Doba života dimeru byla v rozmezí 1,6–2,5 ns. Tato doba života byla závislá na emisní vlnové délce, rostla s rostoucí vlnovou délkou. Toto bylo potvrzeno pomocí TRES, kde maximum emise vykazovalo s časem bathochromní posun. Doba života monomerního R6G ve vodě byla stanovena na 3,95 ns [69].

H. Tajalli a spol. v roce 2009 zkoumali vliv tenzidu na molekulární agregaci rhodaminových barviv ve vodných prostředích. Použitými metodami byly absorpční a fluorescenční spektroskopie. Agregující molekuly R6G jsou pospolu drženy dvěma druhy interakcí, jedná se o π - π interakce a hydrofóbní efekt. Molekuly R6G agregují za vzniku dimerů a vyšších agregátů, které jsou schopny zhášet fluorescenci. Vznikají přitom dva typy dimerů: H-dimery, kde jsou molekuly rhodaminu uspořádány paralelně, a J-dimery, kde molekuly rhodaminu tvoří dvě na sebe téměř kolmé roviny. Použity byly jak aniontové, tak kationtové tenzidy. U aniontových tenzidů došlo k solubilizaci barviva do micel, u kationtových ale nikoli. Přítomnost aniontového tenzidu snižovala dimerizaci, u kationtového tenzidu byl tento vliv nižší. Délka alkylového řetězce neměla na proces dimerizace značný vliv [70].

M. Fischer a J. Georges v roce 1997 studovali dimerizační rovnováhu R6G ve vodě a vodných micelárních roztocích pomocí termální spektrometrie. Při experimentech v čisté

vodě došli k závěrům, že monomer (pod 10^{-6} M) vykazuje maximum absorpce při 525 nm. Při zvyšování koncentrace a následné dimerizaci se absorpce v tomto emisním pásu snižovala a vznikl nový absorpční pás u 499 nm. Při použití aniontového (SDS) nebo neiontového tenzidu (Brij 35) se dimery R6G netvořily alespoň do koncentrace $4 \cdot 10^{-4}$ M. Na druhou stranu v kationtovém micelárním roztoku CTAB byl kvantový výtěžek monomeru významně snížen a dimerizace se v malé míře stále objevovala. Pokles kvantového výtěžku nebyl způsoben přítomností těžkého atomu.

Obecně při měřeních v micelárních systémech se intenzita absorpčního pásu dimeru snižovala a absorpční pás monomeru byl posunut k delším vlnovým délkám oproti případu v čisté vodě. Jestliže byla tato sonda rozpuštěna v roztoku kationtových micel, spektrální posun byl ještě větší (539 nm). Tato pozorování znamenají, že kladně nabitý R6G asociuje s jakýmkoli druhem micel díky elektrostatickým a/nebo hydrofóbním interakcím v závislosti na náboji povrchu micely. Protože R6G interaguje i s kationtovými micelami, měly by hydrofóbní interakce překonávat elektrostatickou repulzi. Při přidání CTAB do vodného roztoku R6G byl pozorován bathochromní posun jak absorpce, tak fluorescence a kvantový výtěžek se významně snížil [21].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této práce bylo prozkoumat vlastnosti hydrogelu, který vzniká na základě specifické interakce mezi hyaluronanem a micelami kationtových tenzidů. Za tímto účelem byla zvolena dostatečně vysoká molekulová hmotnost hyaluronanu (750–1 000 kDa), protože při nízkých molekulových hmotnostech vzniká příliš „tekutý“ gel, a jako kationtový tenzid byl zvolen často používaný CTAB. Gel byl připravován v 0,15M vodném roztoku NaCl, protože v přítomnosti soli jednak vzniká kvalitnější gel [71] a jednak toto prostředí simuluje fyziologický roztok.

Jako fluorescenční sonda, která má přinést dostatek informace o tomto systému, byl vybrán prodan díky své schopnosti se rozpouštět jak v polárních, tak nepolárních prostředích. Nakonec byly použity celkem tři fluorescenční sondy: prodan, laurdan a rhodamin 6G.

Zvolené systémy byly zkoumány pomocí ustálené fluorescence a technikou časově rozlišených emisních spekter (TRES), která měla umožnit odhalit procesy probíhající při excitovaném stavu sondy. Navíc pomocí parametrů poklesů intenzity fluorescence měla být zjištěna distribuce sondy ve studovaném systému, kdy bylo emisní spektrum rozděleno na dílčí spektra jednotlivých emisních druhů sond. Intenzita fluorescence dílčích spekter byla vypočítána pomocí ustálené intenzity fluorescence a relativního zastoupení příslušné doby života při dané vlnové délce. Analýza pomocí TRANES nebyla použita, protože počet emisních druhů fluoroforu, který tato technika stanovuje, byl zjišťován už analýzou poklesů intenzity fluorescence při jednotlivých vlnových délkách.

Bylo předpokládáno, že prodan se bude v případě možnosti přemisťovat do micel. Proto byl nejdříve zkoumán micelární roztok, aby mohlo být zde zjištěné chování sondy porovnáno s chováním v gelu. Interakce prodanu se samotným hyaluronanem se nepředpokládala. Všechny měřené systémy byly vodné.

4.1 Přístroje a vybavení

4.1.1 Systém Fluorolog (Horiba Scientific)

Jde o fluorescenční spektrometr. Excitačním zdrojem je v tomto systému xenonová výbojka, která umožňuje excitaci v rozsahu 200–850 nm. Obsahuje celkem 6 detektorů, což umožňuje snímat fluorescenci v rozsahu 220–2 500 nm. Fluorolog obsahuje dva dvojité monochromátory a spektrograf. Fluorescenci je možno detekovat v pravoúhlé konfiguraci nebo v tzv. konfiguraci „front face“ pro pevné nebo silně zakalené vzorky.

Přístroj byl použit k měření ustálené fluorescence, která byla detekována v pravém úhlu.

4.1.2 Systém Fluorocube (Horiba Scientific)

Tento přístroj používá metodu TCSPC. Obsahuje sadu excitačních NanoLED o různých vlnových délkách v rozsahu od 260 nm do 740 nm s pracovní frekvencí 1 MHz. Systém obsahuje emisní monochromátor a TBX pikosekundový detektor, který umožňuje měřit s rozlišením 20 ps/kanál. Rozsah měřitelných dob života je od 10^{-10} – 10^{-6} s. Vedle kapalných vzorků je možno měřit také pevné vzorky.

Tento systém byl použit pro získání poklesů intenzity fluorescence v čase.

4.2 Použité programy

| | | |
|---|---|--|
| FluorEssence (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | – | software pro získání spekter ustálené fluorescence |
| OriginPro 8 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | – | software pro vyhodnocení spekter ustálené fluorescence |
| DataStation v2.4 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | – | software pro získání TCSPC dat |
| DAS6 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) | – | software pro analýzu poklesů intenzity fluorescence |

4.3 Chemikálie

| | | |
|--------------|--|---|
| Prodan | 6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen | Sigma-Aldrich, Co. č. šarže: 101 296 902 |
| Laurdan | 6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen | Sigma-Aldrich, Co. č. šarže: 101 290 098 |
| Rhodamin 6G | | Sigma-Aldrich, Co. č. šarže: 252433-16 |
| CTAB | cetyltrimethylammonium bromid | Sigma-Aldrich, Co. č. šarže: 059K0041 |
| Hyaluronan | sodný, nativní, M = 750–1 000 kDa | Contipro Biotech s.r.o. č. šarže: 213-4160 |
| NaCl | chlorid sodný | Lach-Ner, s.r.o. PP/2009/06278 |
| Milli Q voda | (Milipore academic) | |

4.4 Příprava vzorků

Pomocí tří fluorescenčních sond (prodan, laurdan, rhodamin 6G) byly měřeny různé systémy: čistá voda, vodný micelární roztok CTAB bez i s přítomností NaCl, gel vytvořený smícháním micelárního roztoku CTAB a roztoku hyaluronanu (Hy) v přítomnosti soli.

Pro vytvoření těchto systémů byly namíchány zásobní roztoky popsané v tabulce 2. Navažování probíhalo na analytických vahách, v případě navažování hyaluronanu byly použity váhy, které navažovaly s přesností na tři desetinná místa.

Tabulka 2: Zásobní roztoky chemikálií

| Zásobní roztok | koncentrace | teplota skladování |
|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Prodan v acetonu | $2,3 \cdot 10^{-4}$ M | 4 °C |
| Laurdan v acetonu | $2 \cdot 10^{-4}$ M | 4 °C |

| | | |
|---------------------|-------------|-------------|
| Rhodamin 6G ve vodě | 10^{-3} M | 4 °C |
| NaCl ve vodě | 0,15 M | laboratorní |
| CTAB ve vodě | 40 mM | laboratorní |
| CTAB v 0,15M NaCl | 200 mM | laboratorní |
| Hy v 0,15M NaCl | 0,5 % (hm.) | 4 °C |

Seznam konkrétních měřených vzorků je podán v tabulce 3. Jednotlivé systémy byly zkoumány pomocí různých fluorescenčních sond. Rozpouštědlem je vždy čistá voda (Milli Q).

Tabulka 3: Konkrétní systémy zkoumané pomocí tří fluorescenčních sond

| Zkoumaný systém | Použitá sonda | | |
|-------------------------|----------------------|-------------|--------------|
| | prodan | laurdan | rhodamin 6G |
| 0,15M NaCl | $6 \cdot 10^{-6}$ M | – | 10^{-5} M |
| 20mM CTAB ve vodě | – | 10^{-5} M | – |
| 200mM CTAB v 0,15M NaCl | $2 \cdot 10^{-5}$ M | – | 10^{-5} M |
| Gel | $2 \cdot 10^{-5}$ M* | – | 10^{-5} M* |
| Gel po týdnu stání | $2 \cdot 10^{-5}$ M* | – | 10^{-5} M* |

* Jde o celkovou koncentraci sondy v systému (gel + supernatant). V těchto systémech došlo k fázové separaci a koncentrace sond se vzhledem jejich distribuci do různých mikroprostředí mohla ve vzniklých fázích lišit od celkové koncentrace sondy v systému.

Kapalné vzorky byly připraveny následujícím způsobem. Nejdříve bylo napipetováno potřebné množství roztoku fluorescenční sondy a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku při laboratorní teplotě. Následně byl přidán potřebný objem příslušného zásobního roztoku a popřípadě bylo přidáno určité množství vody k dosažení dané koncentrace. Roztoky byly jeden den míchány a poté změřeny.

Vzorky gelu byly připraveny následovně. Do zkumavky bylo napipetováno potřebné množství roztoku fluorescenční sondy a příslušné rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 3 ml 200mM roztoku CTAB v 0,15M NaCl a vzniklý roztok byl míchán po dobu zhruba jednoho dne. Do rozmíchaného roztoku byly přidány 3 ml 0,5% roztoku Hy v 0,15M NaCl. Ve vzorku došlo k okamžité fázové separaci, kdy při styku obou roztoků vznikl gel, který odděloval objemy těchto roztoků. Vzorek byl následně promíchán na vířivém míchadle (IKA MS2 Minishaker), kdy vznikl vločkově zakalený roztok, který se od hladiny pomalu čeril a sraženina (gel) klesala ke dnu. Vzorek byl poté odstředěn (15 min, 4 000 ot/min). Na dně zkumavky vznikla čirá, homogenně oddělená gelová fáze, která nejevila tendenci se vznášet v roztoku (supernatantu). Tento postup přípravy gelu byl odvozen na základě výsledků diplomové práce Lenky Kohutové z roku 2013 [71].

4.5 Nastavení přístrojů

Pomocí přístroje Fluorolog byly získány excitační a emisní spektra sond ve zmíněných systémech. Použité vlnové délky jsou popsány v tabulce 4. Štěrbiny excitačního a emisního monochromátoru byly drženy v rozmezí 1–3 nm tak, aby byla intenzita fluorescence v rozmezí dobré měřitelnosti přístroje. Kapalně vzorky byly měřeny v klasických křemenných kyvetách, vzorky gelů byly vloženy mezi dvě křemenná skla, která byla následně vložena do křemenné kyvety. Každé spektrum bylo měřeno třikrát a následně zprůměrováno.

Tabulka 4: Excitační a emisní vlnové délky použité při měření jednotlivých systému příslušnými fluorescenčními sondami

| Zkoumaný systém | Použitá sonda (excitace/emise) | | |
|--|--------------------------------|---------------|---------------|
| | prodan | laurdan | rhodamin 6G |
| 0,15M NaCl | 329 / 400–700 | | 455 / 500–700 |
| | 389 / 400–700 | – | 490 / 510–700 |
| | 270–470 / 520 | | 420–580 / 600 |
| 20mM CTAB ve vodě | | 329 / 390-650 | |
| | – | 410 / 420-650 | – |
| | | 290-440 / 495 | |
| 200mM CTAB v 0,15M NaCl, gel, gel po týdnu stání | 329 / 370–650 | | 455 / 500–700 |
| | 389 / 410–650 | – | 490 / 510–700 |
| | 270–470 / 490 | | 420–580 / 600 |

Nastavení přístroje Fluorocube při měření poklesů intenzity fluorescence bylo pro jednotlivé použité vzorky podobné. Měření probíhalo v reverzním módu, byla měřena odezva přístroje pro následnou dekonvoluci, při velké intenzitě záření byly použity neutrální filtry. Rozsah TAC byl nastaven na 50 ns s 1 024 kanály, zpoždění signálu („coaxial delay“) bylo nastaveno na 65 ns, synchronizační zpoždění („sync. delay“) bylo nastaveno na 0 ns, opakovací frekvence diody byla nastavena na 1 MHz. Pro excitaci prodanu a laurdanu byla použita nanoLED s vlnovou délkou 329 nm a excitačním pulzem kratším než 1 ns. Pro excitaci rhodaminu 6G byla použita nanoLED s vlnovou délkou 455 nm a délkou pulzu 1,2 ns. Počet fotonů v maximu poklesu byl nastaven na 10 000, přičemž u vlnových délek na krajích emisního spektra byl tento počet upraven na 5 000 a v několika z těchto případů, kdy se na příslušné vlnové délce objevovala emise jen z jednoho typu fluoroforu (jedna doba života), byl nastaven počet fotonů v maximu na 3 000. Excitační polarizátor byl nastaven na 0°, emisní polarizátor byl nastaven na 54,75°. Poklesy intenzity fluorescence byly snímány s krokem 5 nm a štěrbina emisního monochromátoru byla nastavena na 6 nm. Na okrajích emisního spektra, kde se objevovala jen jedna doba života, byl krok prodloužen na 10 nm. Výjimku tvořil jen vzorek prodanu v roztoku 0,15M NaCl, který poskytoval nízkou intenzitu fluorescence. Zde byl krok prodloužen na 10 nm a štěrbina byla rozšířena na 12 nm. Kapalně vzorky byly měřeny v klasické křemenné kyvetě, vzorky gelů byly vloženy do speciální

kyvety, která svírá s excitačním paprskem úhel 45° a navíc je odkloněna od svislé osy, aby se minimalizoval odraz excitačního záření.

Měření probíhala při laboratorní teplotě (22°C), pouze vzorky 200mM CTAB v 0,15M NaCl byly zahřáty na 28°C , protože při laboratorní teplotě se srážely (nebylo dosaženo Krafftovy teploty).

Při vyhodnocování poklesů intenzity fluorescence byl parametr χ_r^2 držen pod hodnotou 1,5. Poklesům byl přikládán fyzikální význam, kdy by měl být počet použitých exponenciál v proložení roven skutečnému počtu emisních druhů fluoroforu ve vzorku. Pre-exponenciální faktory tedy byly vždy kladné.

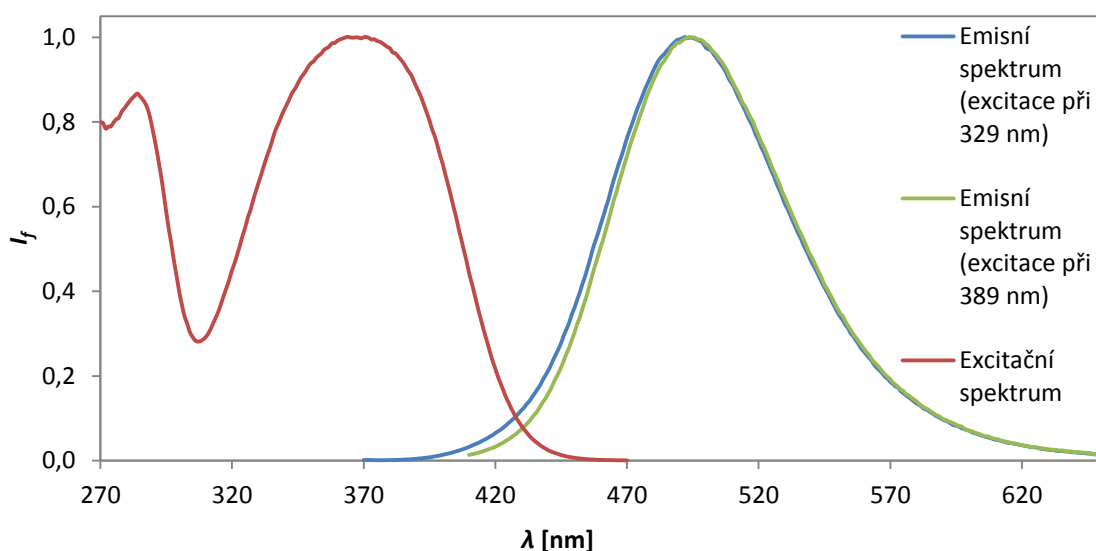
4.6 Výsledky a diskuze

4.6.1 Zkoumání systému pomocí fluorescenčních sond prodanu a laurdanu

4.6.1.1 Prodan v micelárním roztoku

Nejdříve byl prozkoumán micelární systém pomocí prodanu. Použitým vzorkem byl 200mM roztok CTAB v 0,15M NaCl. Koncentrace sondy byla $2 \cdot 10^{-5}$ M, což je koncentrace umožňující relativně rychlý sběr dat a v použitém systému by přitom neměly vznikat agregáty sondy [59].

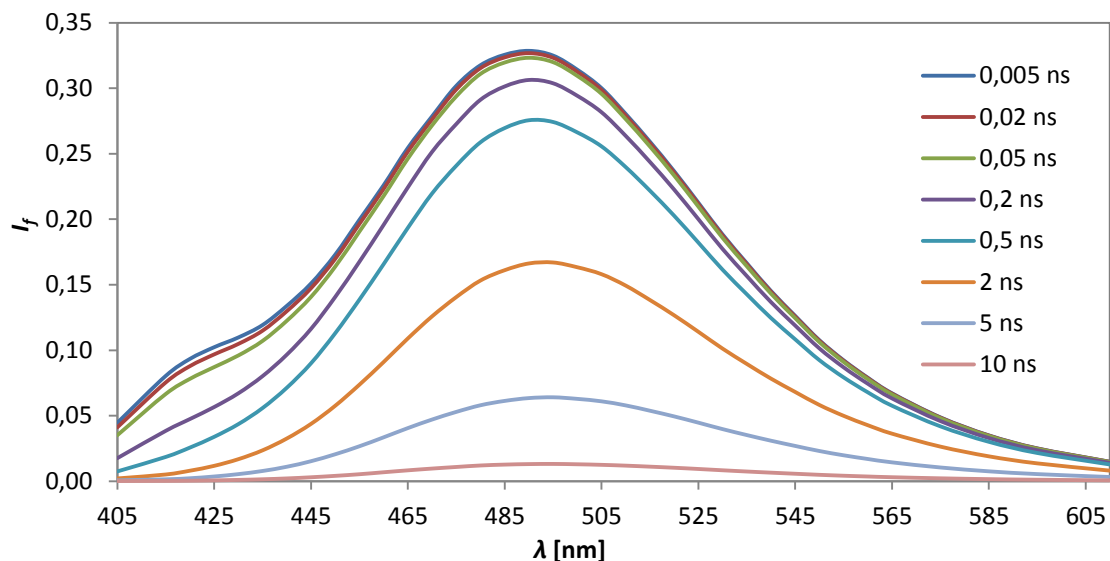
Ustálená fluorescence ukazuje (Obrázek 13), že při různé excitační vlnové délce (329 a 389 nm) je získáno jiné emisní spektrum, kdy v prvním případě bylo maximum fluorescence v 494 nm, ve druhém případě ve 495 nm. Tento rozdíl bude vysvětlen později na základě časově rozlišených měření. Emisní spektrum excitované při 329 nm bylo použito pro rekonstrukci TRES.



Obrázek 13: Normalizovaná emisní a excitační spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5}$ M) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

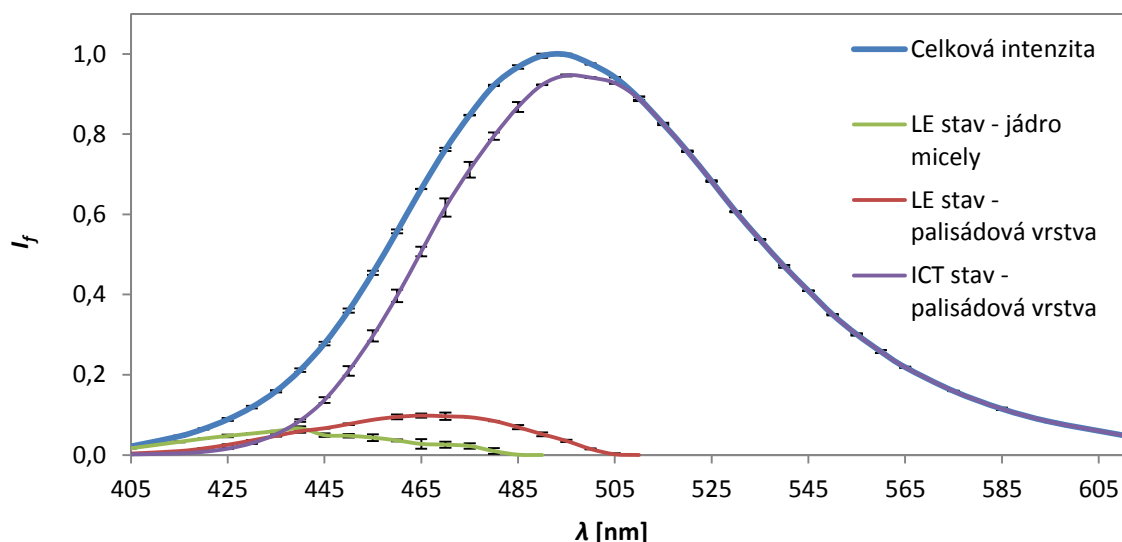
Pomocí metody TCSPC byly získány poklesy intenzity fluorescence v čase. Tyto poklesy byly prokládány jedno- až troj-exponenciální funkcí a byly stanoveny parametry proložení.

Následně byla rekonstruována TRES v časech 0,005–10 ns po excitaci pulzem záření (Obrázek 14) podle vztahu 13.



Obrázek 14: TRES prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

V nejkratších časech po excitaci obsahují TRES dva píky při asi 425 a 490 nm, z nichž první je slabší a s časem se vytrácí. V delších časech po excitaci už TRES obsahují jen jeden emisní pík. Tato skutečnost ukazuje na tzv. model dvou stavů, kdy dochází k reakci v excitovaném stavu sondy. Maximum TRES se v pozorovaném časovém intervalu posunulo od 490 nm k 495 nm, je ale nutno dodat, že tyto údaje mají oba chybu $\pm 2,5$ nm, protože data byla vyhodnocována s krokem 5 nm. Tento posun nebyl způsoben procesem relaxace rozpouštědla, jak ukázalo následující vyhodnocení, ale úbytkem fluorescence v delších časech po excitaci, která pocházela od fluoroforů s kratší dobou života a které emitovali na modré straně spektra. Platilo tedy, že prostředí fluoroforu nebylo dostatečně viskózní na to, aby relaxace rozpouštědla byla časově srovnatelná nebo delší ve srovnání s fluorescencí.



Obrázek 15: Dekonvoluce emisního spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

Poslední částí tohoto vyhodnocení byla dekonvoluce emisního spektra na jednotlivé komponenty pomocí parametrů poklesů intenzity fluorescence při jednotlivých vlkových délkách s krokem 5 nm (Obrázek 15). Emise celkem vykazovala tři doby života. Dvě kratší doby života emitující na modré straně emisního spektra, byly přisouzeny emisi ze stavu LE (local excited), ze kterého prodan emituje v nepolárních prostředích. Jedná se o prostředí uvnitř micely mezi uhlovodíkovými řetězci a o prostředí na rozhraní, tedy v palisádové vrstvě micely, v rámci které je prodan lokalizován na straně odvrácené od molekul vody. První emisní druh prodanu emitující na modré straně spektra vykázal nejkratší dobou života, která se pohybuje v rozmezí 0,15–0,23 ns, a emituje při nejkratších vlnových délkách s maximem emise mezi 430–440 nm. Tato doba života koresponduje s dobou života prodanu v n-heptanu, která je asi 0,18 ns [66]. Druhý emisní druh prodanu na modré straně emisního spektra vykazuje emisi posunutou bathochromně s maximem v 465–470 nm, což je pravděpodobně způsobeno vyšší polaritou v oblasti palisádové vrstvy micely, která je zapříčiněna kladnými náboji na polárních skupinách tenzidu a možná jistou penetrací molekul vody dovnitř palisádové vrstvy. Doba života tohoto druhého emisního druhu je delší, 0,74–1,1 ns, což koresponduje s bathochromním posunem. Třetí emisní druh prodanu je od předešlých dvou odlišný, je dominantní a jeho emise je výrazně bathochromně posunuta k maximu ve 495 nm. Tento druh prodanu se nacházel v palisádové vrstvě micel na straně, která byla přikloněna molekulám vody a polarita zde proto byla větší oproti předešlým dvěma případům. U tohoto druhu prodanu proběhl v excitovaném stavu intramolekulární přenos náboje právě kvůli zvýšené polaritě prostředí. Emise tedy proběhla ze stavu ICT (intramolecular charge transfer). Vzhledem k tomuto procesu došlo k emisi v průměru později oproti prodanu ve stavech LE. Doba života stavu ICT byla stanovena na 3,1–3,3 ns. Rozmezí dob života udané u všech tří fluoroforů ukazuje postupný vývoj této hodnoty od nejkratších po nejdelší vlnové délky, kde příslušný fluorofor emitoval [66, 67].

Vysvětlením pro odlišnost emisního spektra při excitaci v 389 nm je heterogenita prodanu v základním stavu. Tři druhy prodanu, které se v systému vyskytovaly, mají pravděpodobně mírně odlišné excitační spektra, kvůli odlišné stabilizaci svým prostředím. LE stavy prodanu potřebují pro excitaci záření o nepatrně vyšší energii než stav ICT a tak se při excitaci v 389 nm projeví méně a způsobily změnu tvaru emisního spektra. Zároveň mohl hrát roli i efekt REES, ke kterému dochází v polárních, relativně viskózních prostředích. Vztahoval by se především na prodan ve stavu ICT, který se nachází jak v polárním prostředí, tak v prostředí o vyšší viskozitě, ale i na LE stav v palisádové vrstvě. Zde je prostředí pravděpodobně polárnější než v jádru micely, kvůli penetraci molekul vody. Zároveň je zde určitá uspořádanost vrstvy způsobující zvýšení viskozity.

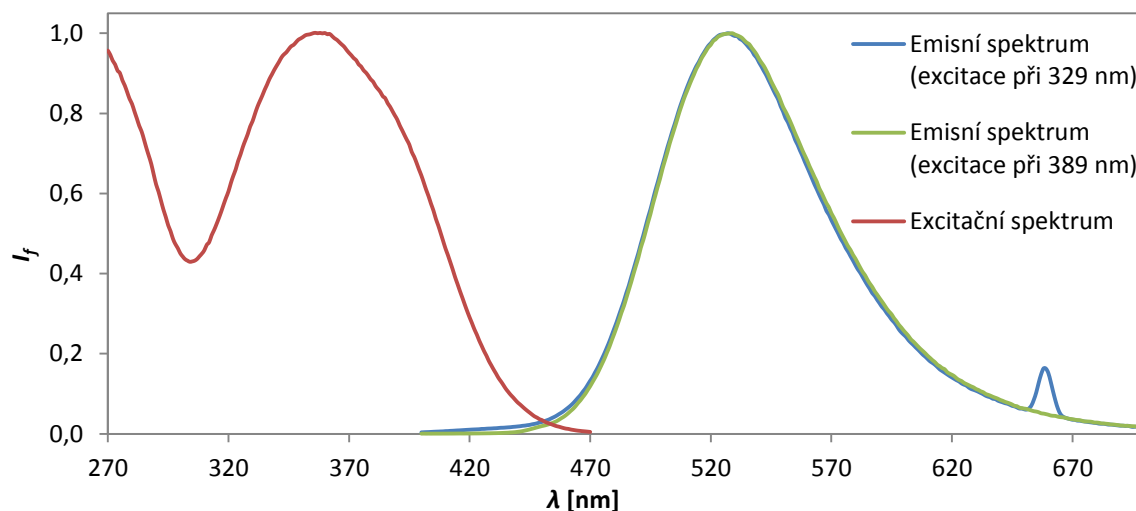
Důležitým zjištěním bylo, že prodan se nacházel v různých místech v rámci micely, byl solubilizován, ale nebyl přítomen v roztoku a nemohl tak o tomto prostředí podat žádné informace. Z tohoto důvodu byl změřen prodan pouze ve vodném prostředí, aby se tato informace potvrdila.

4.6.1.2 Prodan ve vodném roztoku

V tomto experimentu byl změřen prodan v 0,15M vodném roztoku NaCl bez přídavku tenzidu. Cílem zde bylo potvrdit existenci jiných emisních druhů prodanu, než v experimentu

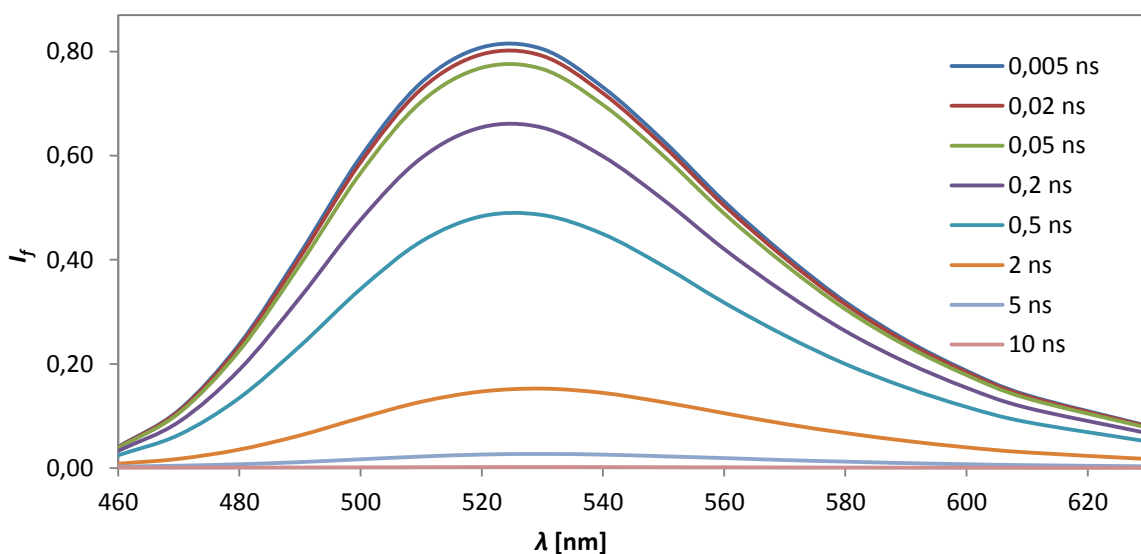
s micelárním roztokem. Koncentrace sondy byla snížena na $6 \cdot 10^{-6}$ M, protože při vyšších koncentracích bylo riziko, že dojde ke vzniku agregátů prodanu, které tvoří nový emisní druh a došlo by ke zbytečné komplikaci [59].

Emisní spektra ukázala oproti micelárnímu roztoku výrazný bathochromní posun maxima na 527 nm při excitaci v 329 nm (Obrázek 16), což svědčí o nárůstu polaroty prostředí. Při excitaci v 389 nm došlo k posunu maxima na 529 nm, což je způsobeno heterogenitou prodanu v základním stavu, jak bylo již výše zmíněno. Emisní pík v 658 nm je druhým harmonickým maximem excitační vlnové délky 329 nm.



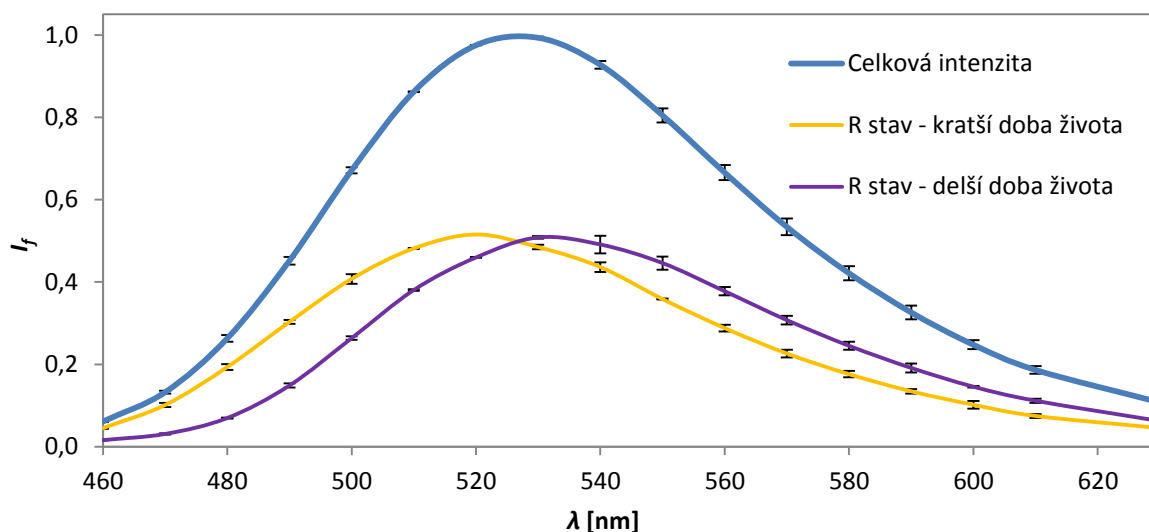
Obrázek 16: Normalizovaná emisní a excitační spektra prodanu ($6 \cdot 10^{-6}$ M) v 0,15M NaCl

TRES ukázala jeden pík s posunen maxima z 520 na 530 nm (Obrázek 17), je ale nutno dodat, že tyto hodnoty mají obě chybu ± 5 nm, protože údaje byly vyhodnocovány s krokem 10 nm. Mohlo by tedy jít jak o kontinuální model, tak o model dvou stavů. Protože vodné prostředí má ale malou viskozitu, pravděpodobněji se jevil model dvou stavů. Ten byl potvrzen i dekonvolucí emisního spektra pomocí poklesů intenzity fluorescence (Obrázek 18).



Obrázek 17: TRES prodanu ($6 \cdot 10^{-6}$ M) v 0,15M NaCl

Dekonvolucí emisního spektra byly zjištěny dva emisní druhy prodanu, které se lišily od druhů v micelárním roztoku jak v rámci emise, tak v hodnotách dob života. Oba druhy emitovaly ze stavu R (zrelaxovaný). Prodan ve vodném prostředí s dobou života 0,73–0,59 ns měl maximum emise v 520 nm a prodan s delší dobou života 2,3–1,8 ns měl maximum emise v 533 nm. Přítomnost dvou dob života prodanu v čisté vodě je způsobena možností prodanu tvořit vodíkové vazby s molekulami vody. Vznik takové vodíkové vazby způsobuje existenci kratší ze dvou dob života prodanu. V micelárním roztoku se tedy prodan nacházel jen v rámci micel a nebyl rozpuštěn ve volné vodě.

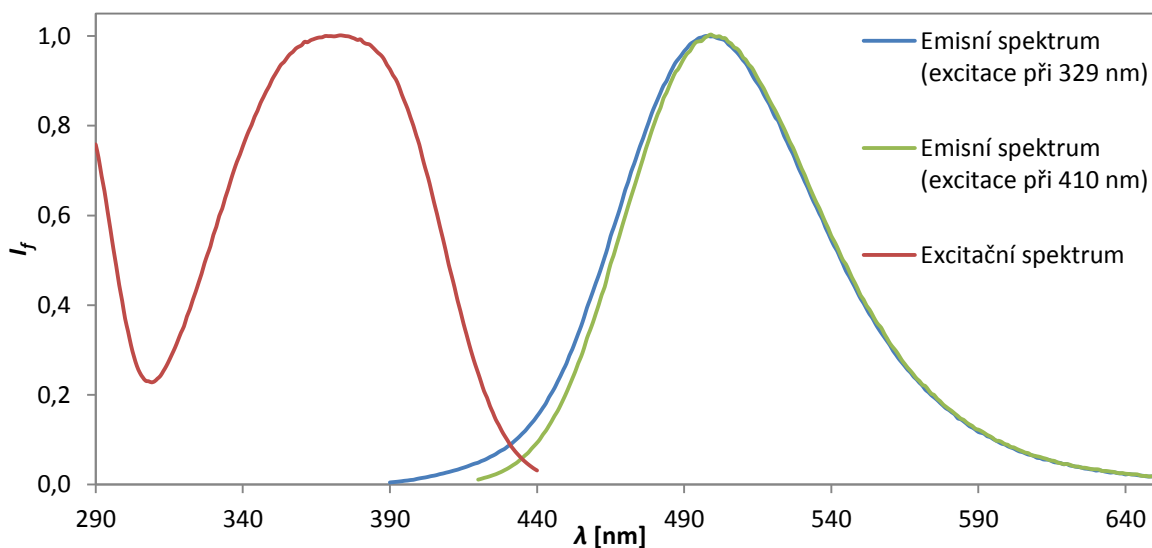


Obrázek 18: Dekonvoluce emisního spektra prodanu ($6 \cdot 10^{-6} M$) v $0,15M NaCl$

4.6.1.3 Laurdan v micelárním roztoku

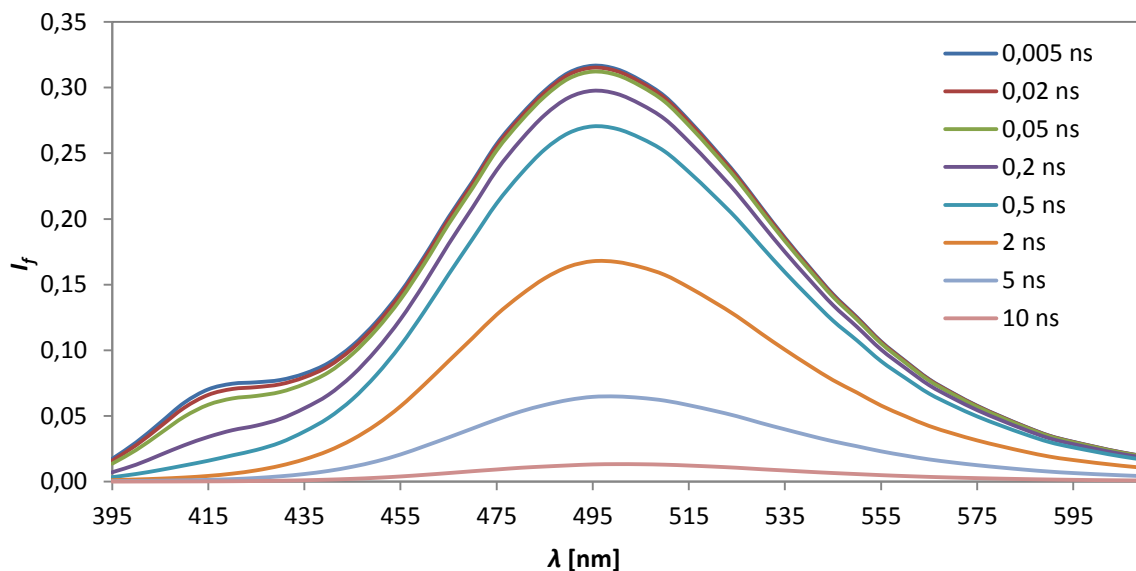
Pro upřesnění lokace prodanu v micelárním roztoku bylo provedeno obdobné měření s fluorescenční sondou laurdanem, který obsahuje stejný fluorofor jako prodan, ale nese delší uhlovodíkový řetězec. Použitým vzorkem byl 20 mM vodný roztok CTAB bez soli. Jednalo se o micelární roztok. Koncentrace sondy byla $10^{-5} M$.

Excitace laurdanu v tomto vzorku proběhla při 329 a 410 nm. Opět došlo ke změně emisního spektra (Obrázek 19). Vysvětlení je stejné jako v případě prodanu v micelárním roztoku. Korespondující maxima emise byla 498 a 499 nm.



Obrázek 19: Normalizovaná emisní a excitační spektra laurdanu ($10^{-5} M$) ve 20mM CTAB

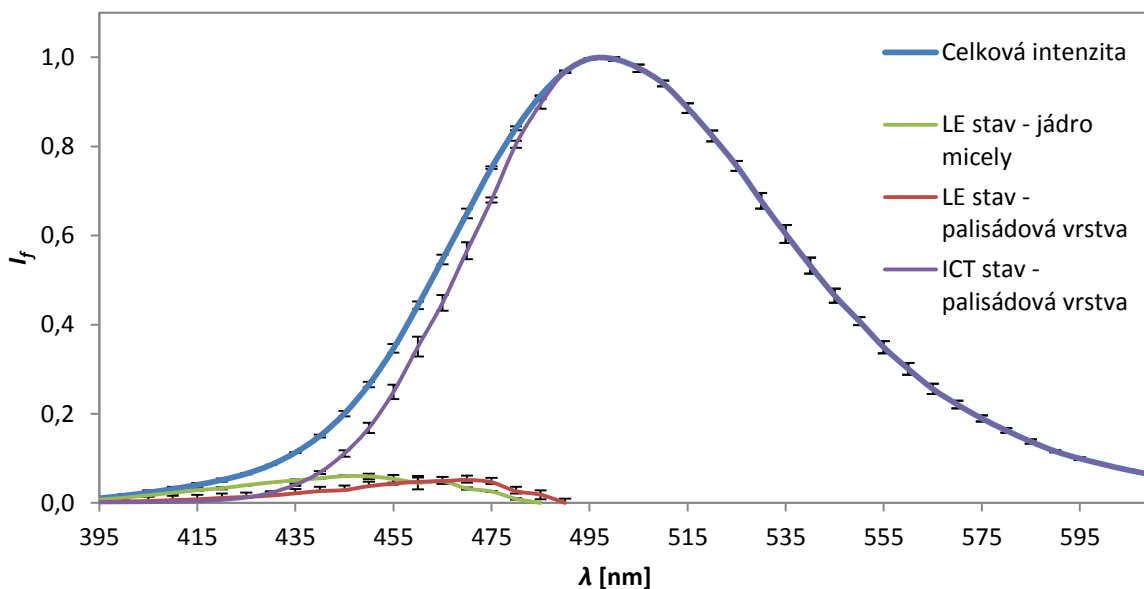
Obdobně jako v případě prodanu obsahovala TRES laurdanu v nejkratších časech po excitaci dva emisní píky – při asi 420 a 495 nm, z nichž první je slabší a s časem se vytrácí. Jde opět o model dvou stavů (Obrázek 20). Maximum TRES se v pozorovaném časovém intervalu posunulo od 495 nm k 500 nm s chybou $\pm 2,5$ nm. Tento posun byl stejně jak u prodanu způsoben úbytkem fluorescence v delších časech po excitaci, která pocházela od fluoroforů s kratší dobou života a které emitovali na modré straně spektra. TRES laurdanu jsou velmi podobné TRES prodanu.



Obrázek 20: TRES laurdanu ($10^{-5} M$) ve 20mM CTAB

Dekonvolucí emisního spektra byly zjištěny tři druhy laurdanu (Obrázek 21), jejichž emise i parametry poklesů fluorescence byly velmi podobné prodanu. Lze tedy předpokládat stejné rozmístění prodanu a laurdanu, resp. jejich fluoroforů, v rámci micelárního systému CTAB.

Nejkratší doba života laurdanu byla 0,18–0,30 ns s maximem emise v 440–450 nm (u prodanu 0,15–0,23 ns a 430–440 nm), delší doba života laurdanu byla stanovena na 0,70–1,3 ns s maximem emise v 465–475 nm (u prodanu 0,74–1,1 ns a 465–470 nm). Nejdelší stanovená doba života laurdanu byla 3,0–3,3 ns s maximem emise asi 498 nm (u prodanu 3,1–3,3 ns a 495 nm). Jde tedy stejně jako u prodanu o emisi ze stavů LE v jádru micely a LE a ICT v palisádové vrstvě [64, 65, 66, 67].



Obrázek 21: Dekonvoluce emisního spektra laurdanu (10^{-5} M) ve 20mM CTAB

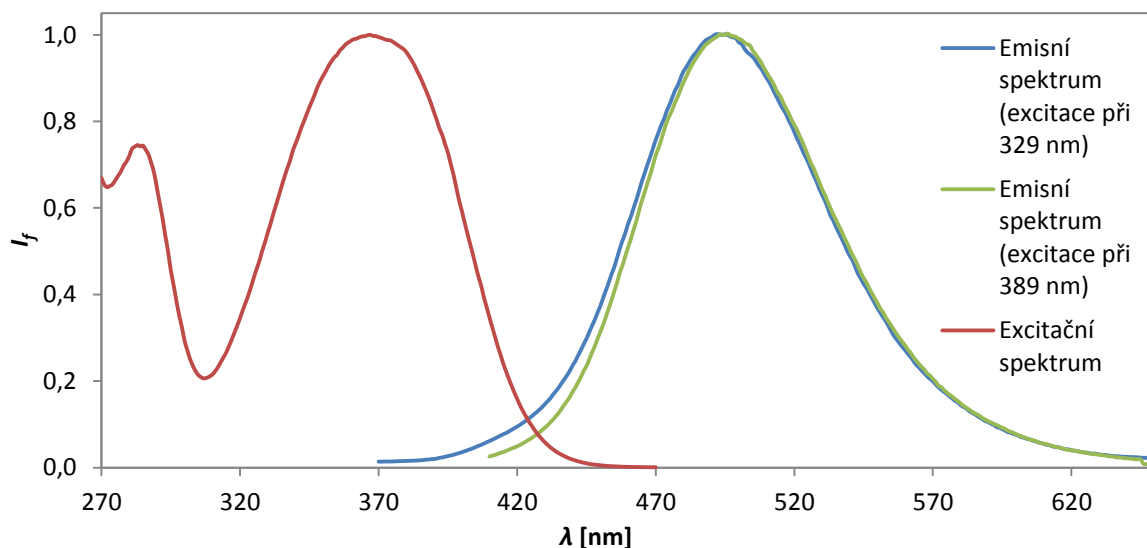
Emisní maxima jednotlivých druhů laurdanu jsou oproti prodanu bathochromně posunuta, nicméně chování těchto dvou sond je v tomto micelárním systému velmi podobné, přestože pozice laurdanu by mohla být specifitější díky delšímu nepolárnímu řetězci.

Další informace, kterou přináší chování prodanu a laurdanu v tomto micelárním systému je fakt, že palisádová vrstva micel má převážně kapalně-krytalický charakter. K tomuto závěru lze dojít na základě sledování emise těchto sond v systému lipidických membrán, které při změně podmínek transformují svou strukturu ze stavu kapalně-krytalického na gelový a naopak, přičemž z gelové fáze vykazují maximum emise při asi 450 nm a z fáze kapalně-krytalické při asi 490 nm. Dominantní emise ze stavu ICT zjištěná ve studovaném systému tedy ukazuje na převažující kapalně-krytalický charakter. Existuje zde ale i minoritní gelová fáze, kterou by reprezentoval stav LE obou sond, které jsou lokalizované v palisádové vrstvě. Gelová fáze by měla být méně přístupná molekulám vody a proto také méně polární, což by zdůvodňovalo emisi ze stavu LE, korespondující s emisí na modré straně emisního spektra a s kratší dobou života vzhledem ke stavu ICT [61, 65].

4.6.1.4 Prodan v gelu

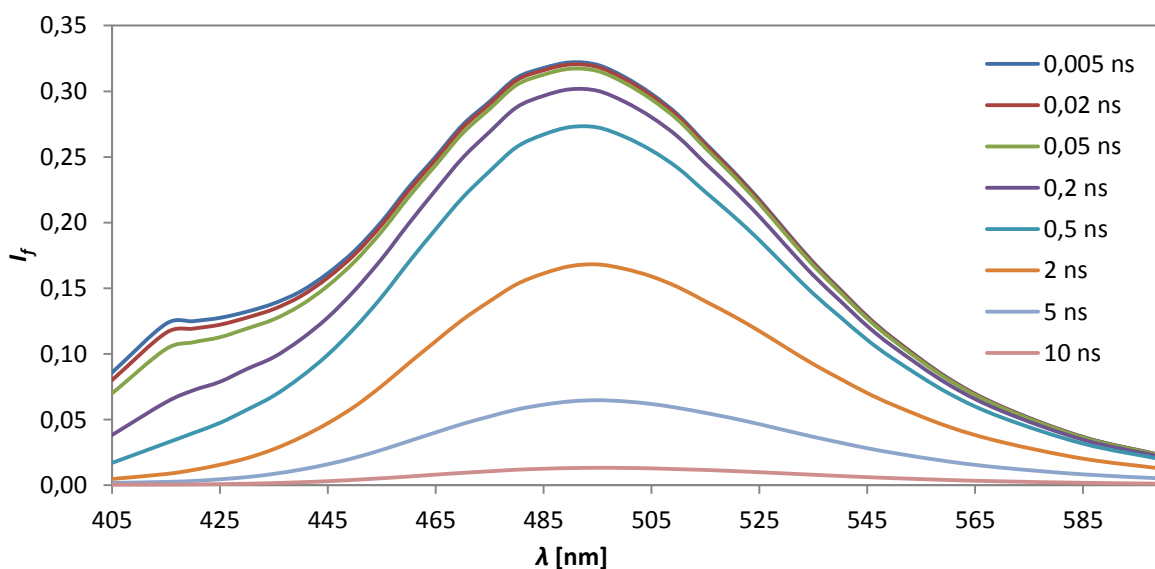
Gel byl vytvořen podle postupu popsaného dříve. Vzniklý gel tvořil čirou, na pohled izotropní fází a byl značně viskózní. Po jeho rozkrojení vznikly ostré hrany, které se zhruba do jedné minuty zaoblily.

Emisní spektra prodanu v gelu (Obrázek 22) jsou velice podobná emisním spektrům prodanu v čistě micelárním systému. Rozdíl vzniklý odlišnou excitační vlnovou délkou (opět 329 a 389 nm) má také stejnou příčinu jako u micelárního systému. Maxima emise korespondující s danými excitačními vlnovými délkami jsou stejně jako v micelárním systému 494 a 495 nm.



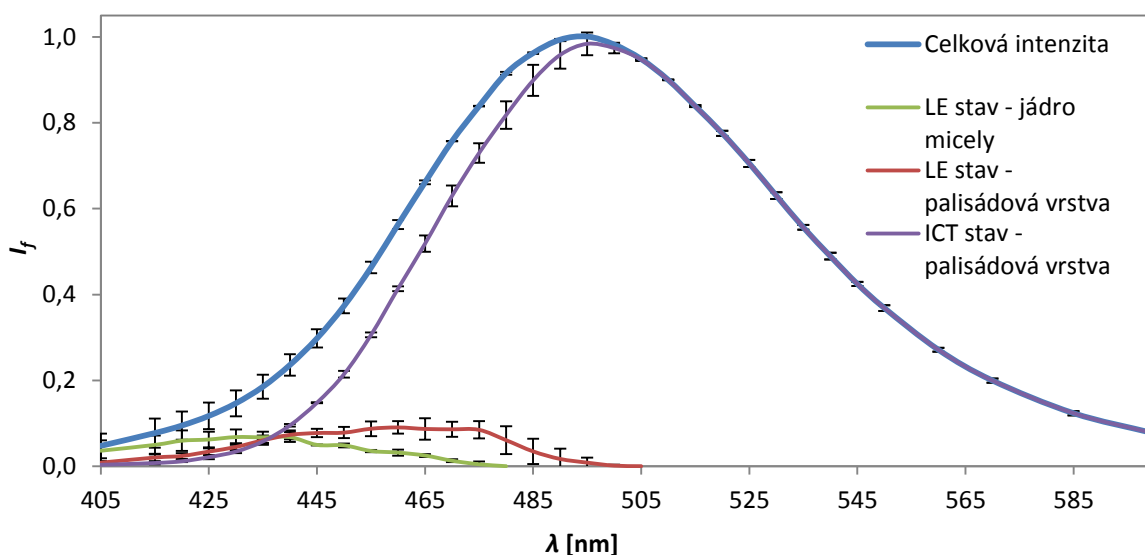
Obrázek 22: Normalizovaná emisní a excitační spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v gelu

V nejkratších časech po excitaci obsahují TRES dva píky při asi 415 a 490 nm, z nichž první je slabší a časem se vytrácí (Obrázek 23) obdobně jako v čistě micelárním systému (asi 425 a 490 nm). Maximum TRES se v pozorovaném časovém intervalu posunulo od 490 nm k 495 nm s chybou $\pm 2,5$ nm, stejně jako v čistě micelárním systému. Nerovnost na modré straně spektra je způsobena nepřítomností dat při 410 nm, kde neproběhlo měření poklesu intenzity fluorescence.



Obrázek 23: TRES prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v gelu

Dekonvolucí emisního spektra byl získán velmi podobný výsledek jako v čistě micelárním systému. Opět byly zjištěny celkem tři emisní druhy prodanu (Obrázek 24). Druh prodanu emitující z LE stavu z jádra micel vykázal dobu života 0,16–0,34 ns s maximem emise 425–440 nm, prodan emitující z LE stavu z palisádové vrstvy vykázal dobu života 0,75–1,1 ns s maximem emise 455–475 nm a prodan emitující ze stavu ICT z palisádové vrstvy vykázal dobu života 3,0–3,4 ns s maximem emise přibližně 495 nm. Opět dominovala emise ze stavu ICT.



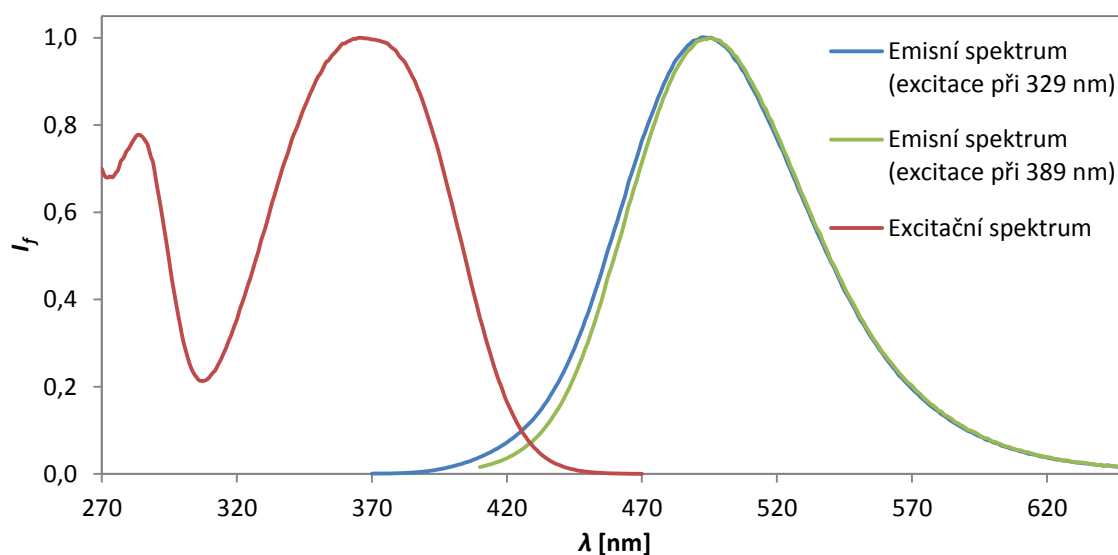
Obrázek 24: Dekonvoluce emisního spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v gelu

Všechny výsledky z měření gelu jsou téměř shodné s výsledky z čistě micelárního systému. Odtud lze jasně vyvodit, že prodan se v gelové fázi nacházel výhradně v mikroprostředích v rámci micel. Mohlo dojít ke změně tvaru micel [72], což ale nemohlo být použitou metodou zjištěno. Nedochovalo k interakci sond s hyaluronanem.

4.6.1.5 Prodan v ustáleném gelu

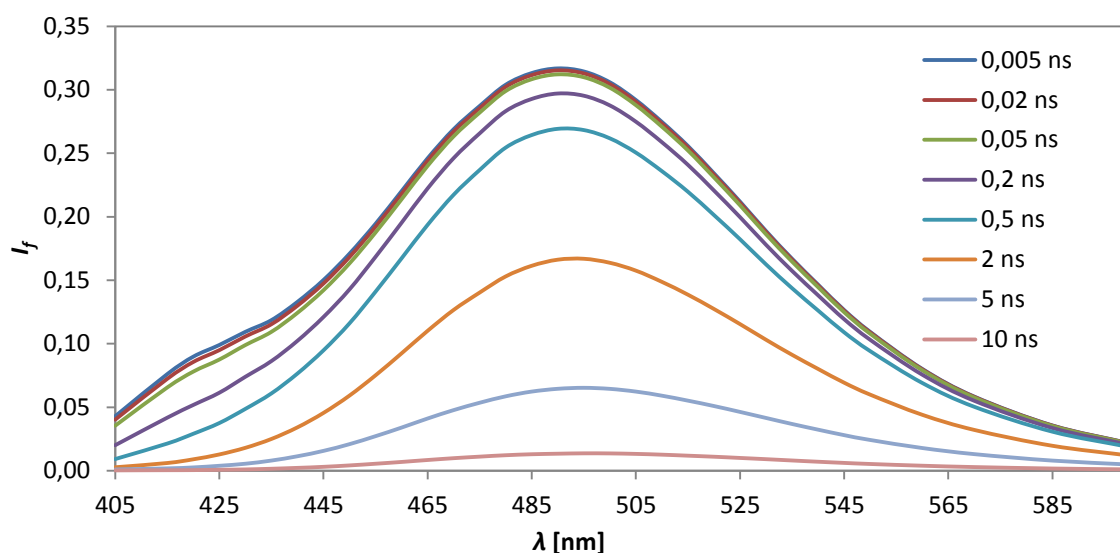
Gel použitý v tomto měření zrál po dobu jednoho týdne pod svým supernatantem a poté byl proměřen. Zrání probíhalo za laboratorní teploty a ve tmě.

Ustálená fluorescence poskytla velmi podobný výsledek jako při měření neustáleného gelu. Při excitaci v 329 a 389 nm byla získána maxima emise 494 a 496 nm (Obrázek 25).



Obrázek 25: Normalizovaná emisní a excitační spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v ustáleném gelu

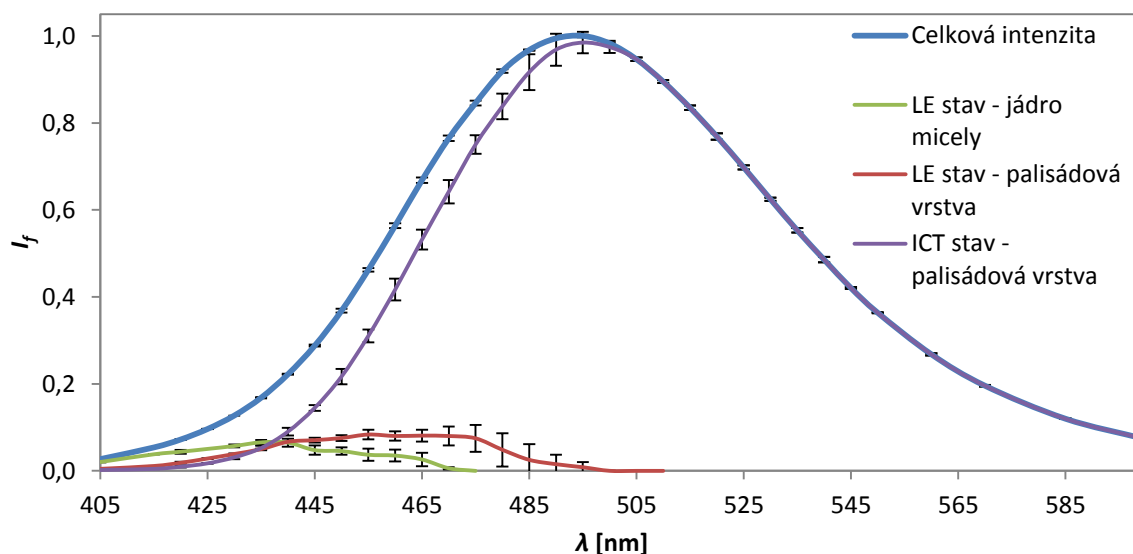
V nejkratších časech po excitaci obsahují TRES dva píky při asi 420 a 490 nm, z nichž první je slabší a s časem se vytrácí (Obrázek 26) obdobně jako v micelárním systému (asi 425 a 490 nm) a v neustáleném gelu (asi 415 a 490 nm). Rozdíl je v intenzitě slabšího píku, která po zrání gelu mírně klesla a to na hodnotu srovnatelnou s micelárním systémem. Maximum TRES se v pozorovaném časovém intervalu posunulo od 490 nm k 495 nm s chybou $\pm 2,5$ nm, stejně jako v micelárním systému a neustáleném gelu.



Obrázek 26: TRES prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v ustáleném gelu

Dekonvolucí emisního spektra byl získán velmi podobný výsledek jako v micelárním systému a neustáleném gelu. Opět byly zjištěny celkem tři emisní druhy prodanu (Obrázek 27). Druh prodanu emitující z LE stavu z jádra micel vykázal dobu života 0,18–0,38 ns s maximem emise 430–445 nm, prodan emitující z LE stavu z palisádové vrstvy

vykázal dobu života 0,84–1,1 ns s maximem emise 455–475 nm a prodan emitující ze stavu ICT z palisádové vrstvy vykázal dobu života 3,1–3,4 ns s maximem emise přibližně 495 nm. Opět dominovala emise ze stavu ICT.



Obrázek 27: Dekonvoluce emisního spektra prodanu ($2 \cdot 10^{-5} M$) v ustáleném gelu

Výsledky měření ustáleného gelu jsou téměř shodné s výsledky z čistě micelárního systému a neustáleného gelu. Nedošlo ke změnám v lokaci prodanu a žádné interakce s hyaluronanem nebyly detekovány.

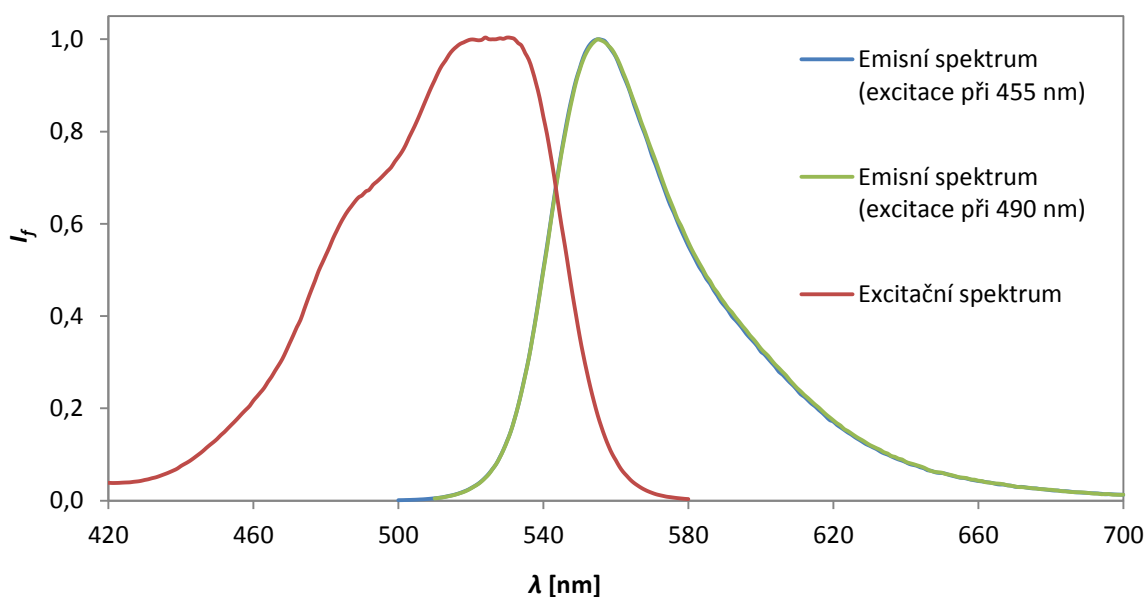
4.6.2 Zkoumání systému pomocí fluorescenční sondy rhodaminu 6G

Fluorescenční sondy prodan a laurdan se v micelárním systému a v gelu nevyskytovaly ve vodné fázi a nešlo tedy podat žádné informace o tomto prostředí. Z tohoto důvodu byla použita sonda rhodamin 6G, která se rozpouští ve vodném prostředí a reaguje na přítomnost kationtových micel, nedochází ale k její solubilizaci do jádra micel [70].

4.6.2.1 Rhodamin 6G ve vodném roztoku

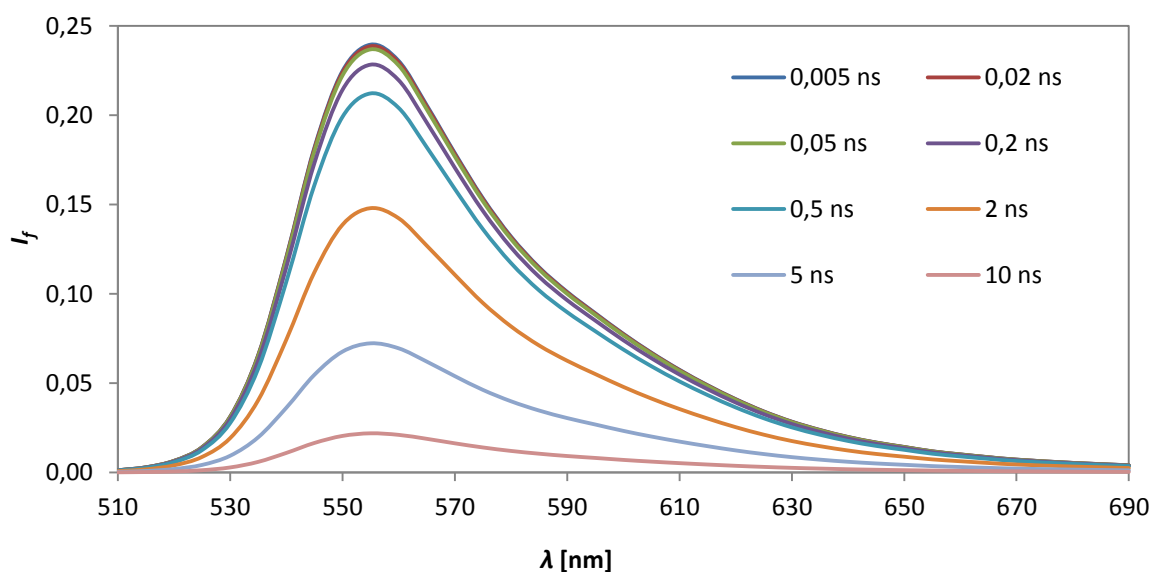
Chování rhodaminu 6G bylo nejdříve stanoveno ve vodném roztoku s obsahem NaCl o koncentraci 0,15 M. Koncentrace rhodaminu 6G byla $10^{-5} M$ stejně jako v dalších vzorcích s touto sondou.

Emisní spektra ukázala při excitaci v 455 a 490 nm stejné spektrum se stejným maximem v 555 nm (Obrázek 28).



Obrázek 28: Normalizovaná emisní a excitační spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 0,15M NaCl

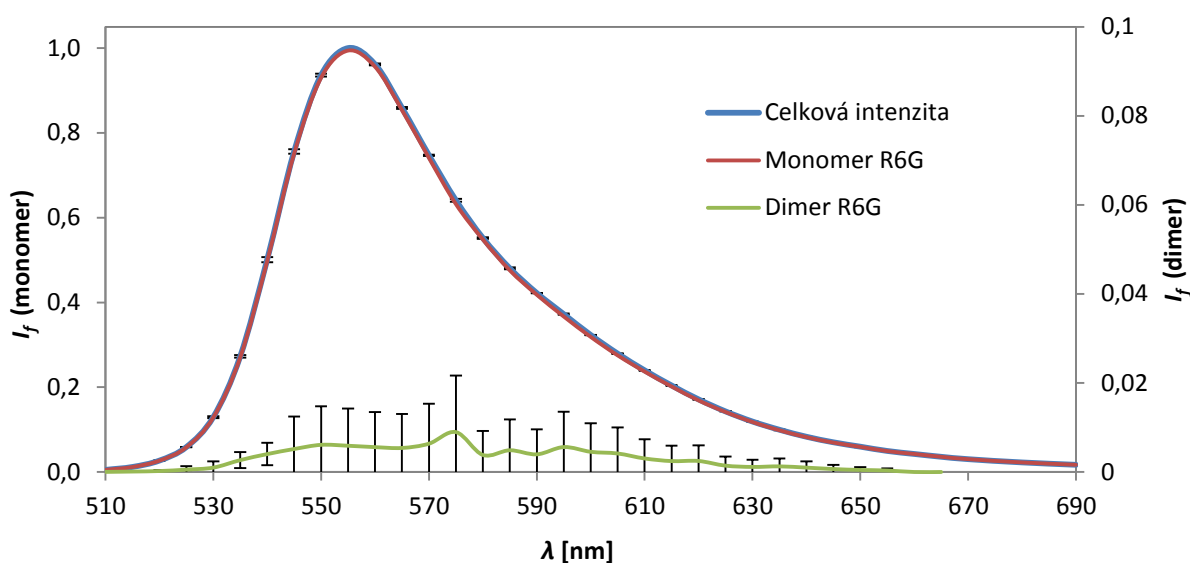
TRES rhodaminu 6G v čase neměnila svůj tvar, pouze klesala intenzita fluorescence (Obrázek 29). Existoval zde jeden pík při 555 nm v celém časovém intervalu. Toto ukazuje na přítomnost jednoho emisního druhu sondy.



Obrázek 29: TRES rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 0,15M NaCl

Analýza poklesů intenzity fluorescence však ukázala, že je zde malý příspěvek dalšího emisního druhu (Obrázek 30). Maximum emise tohoto druhu nešlo přesně specifikovat kvůli příliš nízké intenzitě fluorescence. Doba života dominantního druhu sondy byla stanovena na 4,1–4,2 ns, u druhého emisního druhu byla doba života 0,58–2,0 ns. První a dominantní doba života patřila monomerní formě sondy, druhá doba života patřila fluorescentnímu J-dimeru (dimerům) sondy, které při této koncentraci ve vodném prostředí v malé míře vznikají [23].

Chybové úsečky nejsou u dílčího spektra monomeru uvedeny kvůli přehlednosti.

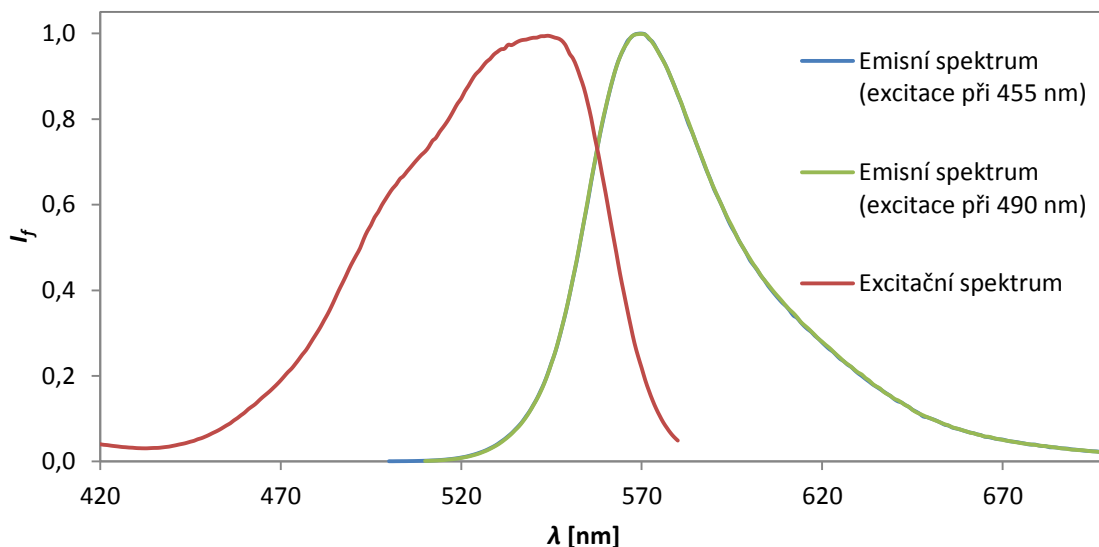


Obrázek 30: Dekonvoluce emisního spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 0,15M NaCl

4.6.2.2 Rhodamin 6G v micelárním roztoku

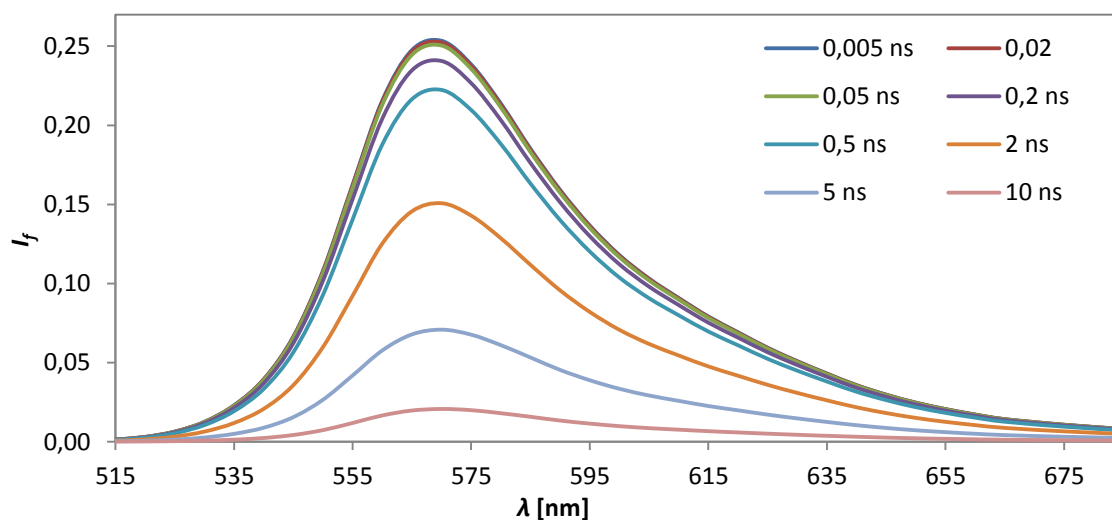
Chování rhodaminu 6G bylo stanoveno v micelárním roztoku CTAB o koncentraci 200 mM v přítomnosti NaCl o koncentraci 0,15 M.

Ustálená fluorescence ukázala při excitaci v 455 a 490 nm opět stejné emisní spektrum, ale maximum emise bylo bathochromně posunuto o 15 nm k vlnové délce 570 nm (Obrázek 31) vzhledem k emisnímu spektru rhodaminu 6G ve vodě bez přítomnosti tenzidu. Toto je způsobeno hydrofóbní a elektrostatickou interakcí rhodaminu 6G s micelami, kdy pravděpodobně dochází k částečnému zapuštění molekuly rhodaminu do palisádové vrstvy, takže uhlovodíkový řetězec rhodaminu se přiblíží k uhlovodíkovým řetězcům tenzidu a π -elektrony xantanové kostry rhodaminu se přiblíží kladně nabitým hlavám tenzidu. Nedochozí však k solubilizaci sondy do jádra micely. Tyto interakce jsou příčinou bathochromního posunu excitačního i emisního spektra a poklesu kvantového výtěžku [21].



Obrázek 31: Normalizovaná emisní a excitační spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

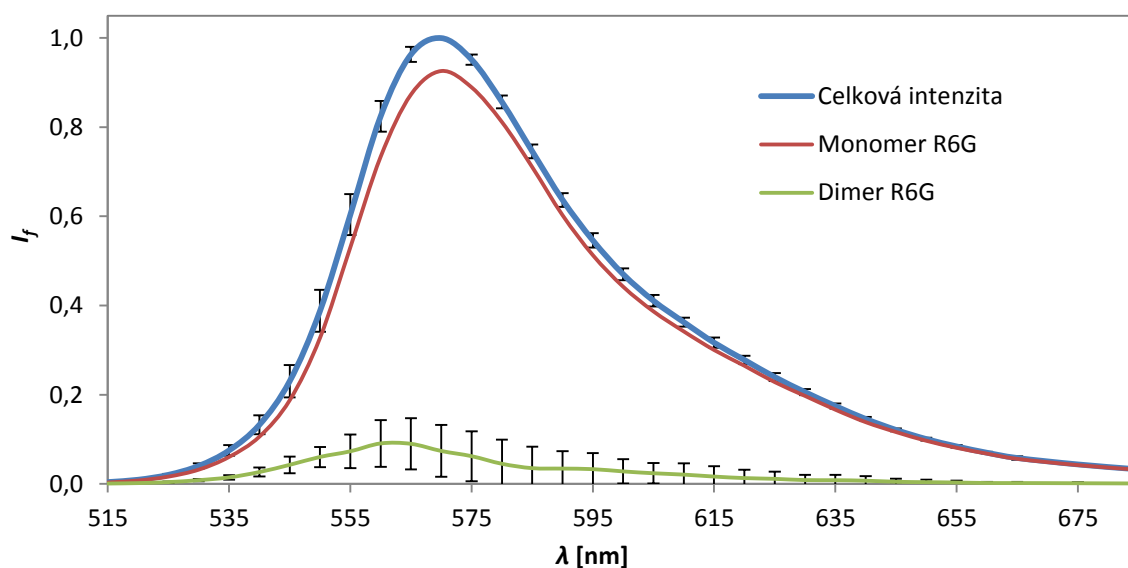
TRES rhodaminu 6G neměnila v čase svůj tvar, pouze klesala intenzita fluorescence (Obrázek 32). Existoval zde opět jeden pík při asi 569 nm, který se s časem posouval k 570 nm. Toto ukazuje na přítomnost dvou emisních druhů sondy.



Obrázek 32: TRES rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

Dekonvolucí emisního spektra byly zjištěny dva emisní druhy rhodaminu 6G (Obrázek 33). Šlo opět o monomer a dimer této sondy. Došlo ke zvýraznění příspěvku dimeru, který měl maximum emise v rozmezí 560–565 nm a způsobil mírný posun maxima TRES v čase. Důvodem většího projevení emise dimeru vzhledem k emisi monomeru je nižší kvantový výtěžek monomerní formy sondy, která interaguje s micelami (měření rozdílu v intenzitě fluorescence zde není uvedeno). Je třeba zmínit, že podle literatury způsobuje přítomnost kationtových micel dokonce mírné snížení obsahu dimerů [21, 70], nedochází tedy ke zvýšení dimerizace i když objem, ve kterém se molekuly rhodaminu mohou nacházet je

kvůli přítomnosti micel menší. Toto by mohlo být vysvětleno agregací molekul monomeru na povrchu micel, čímž dojde ke zředění rhodaminu ve vodném objemu a tedy k jistému poklesu obsahu dimerů. Přesné chování dimerů je na základě provedených měření složité určit. Tendence asociovat s micelami bude nejspíš slabší oproti monomerům, což by mohlo být způsobeno částečným vzájemným vysycením interagujících míst molekul rhodaminu a větší velikostí této jednotky, která se tak hůř zabudovává do palisádové vrstvy. Doba života monomeru byla 3,7–4,1 ns a tedy mírně kratší oproti případu v čisté vodě, což pravděpodobně souvisí se sníženým přístupem molekul vody k molekule sondy kvůli interakci s micelami. Doba života dimeru byla stanovena na 0,99–2,0 ns.

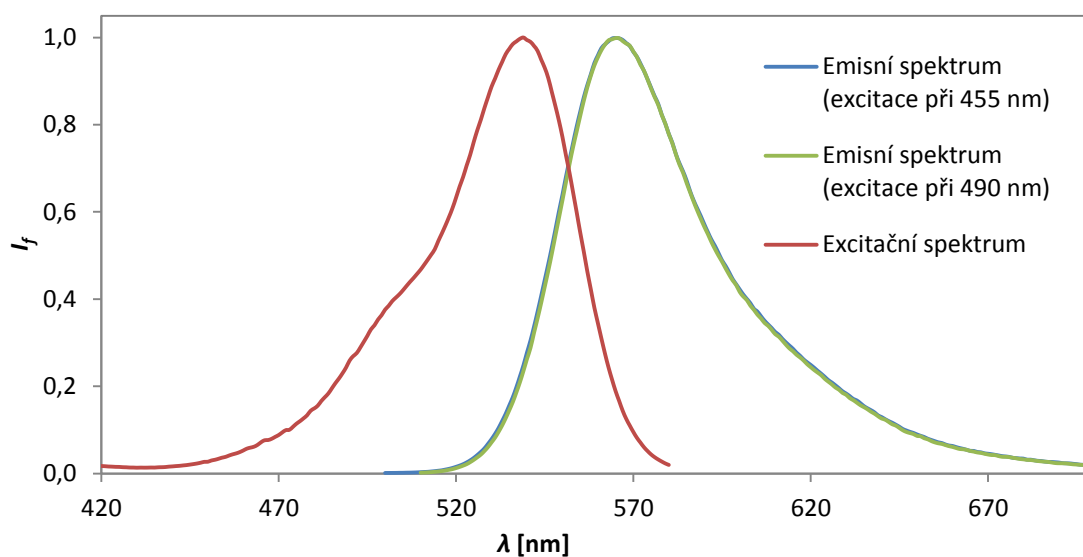


Obrázek 33: Dekonvoluce emisního spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v 200mM CTAB v 0,15M NaCl

4.6.2.3 Rhodamin 6G v gelu

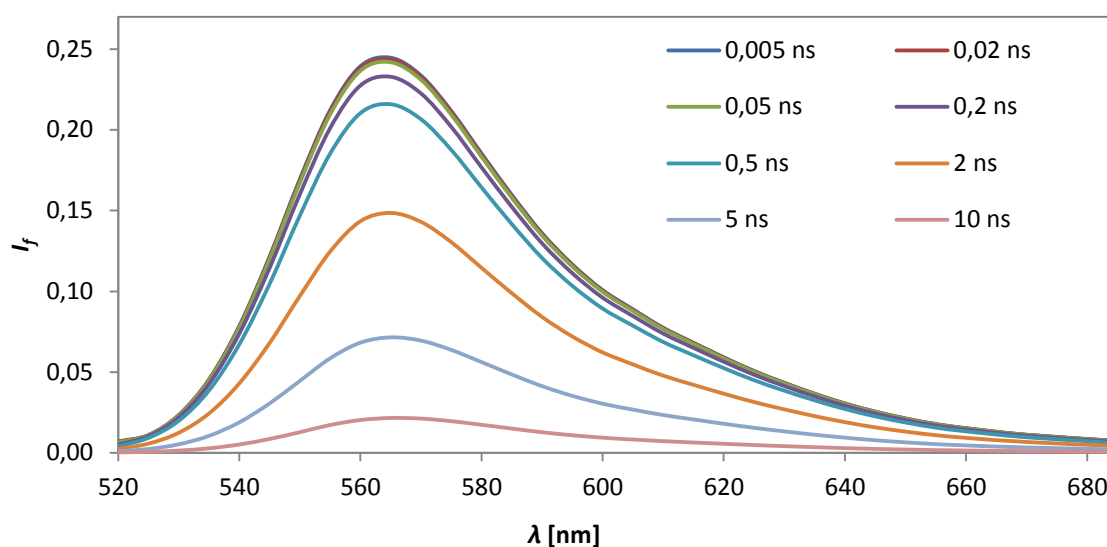
Gel byl připraven obdobně jako v případě roztoku.

Emisní spektra při excitaci v 455 a 490 nm byla opět stejná (Obrázek 34). Maximum emise bylo v 565 nm, což poukazovalo na jakýsi mezistav mezi chováním sondy ve vodě (maximum emise v 555 nm) a v čistě micelárním roztoku (maximum emise v 570 nm).



Obrázek 34: Normalizovaná emisní a excitační spektra rhodaminu 6G ($10^{-5} M$) v gelu

TRES rhodaminu 6G opět svůj tvar v čase ztelně neměnila, pouze klesala intenzita fluorescence (Obrázek 35). Existoval zde opět jeden pík při asi 564 nm, který se s časem posouval k 565 nm. Toto opět ukazuje na přítomnost dvou emisních druhů sondy.

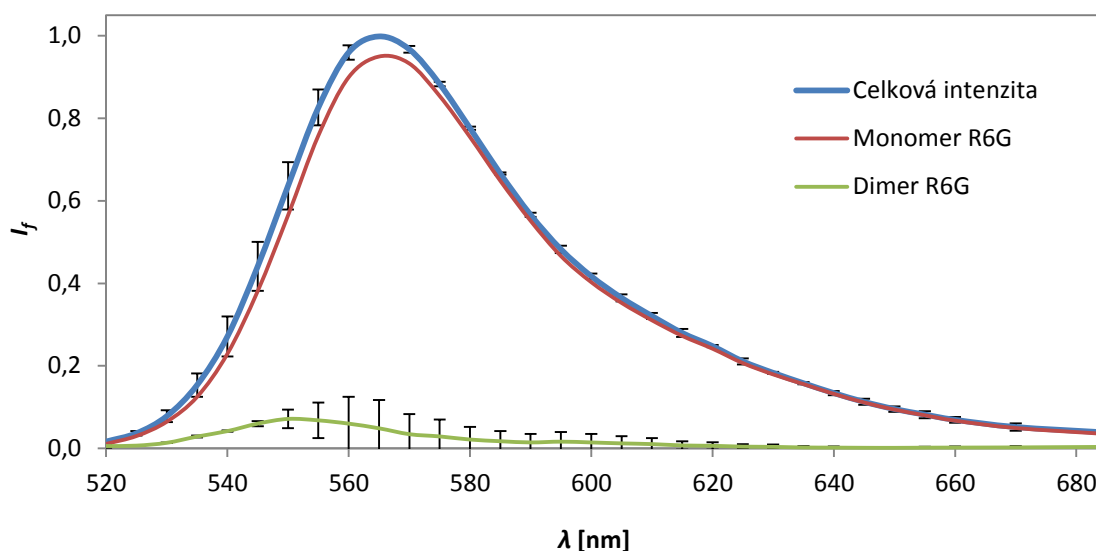


Obrázek 35: TRES rhodaminu 6G ($10^{-5} M$) v gelu

Dekonvolucí emisního spektra byly zjištěny opět dva emisní druhy rhodaminu 6G (Obrázek 36). Šlo opět o monomer a dimer této sondy. Výsledek dekonvoluce byl podobný čistě micelárnímu systému, pouze došlo k mírnému snížení intenzity fluorescence dimeru a došlo také k hypsochromnímu posunu emise jak monomeru, tak dimeru sondy. Dimer proto jistým způsobem také reaguje na přítomnost micel. Emise monomeru byla posunuta z 570 na 566 nm a emise dimeru byla posunuta z 560–565 na 545–555 nm. Toto bylo nejspíše způsobeno částečným obsazením povrchu micel řetězci hyaluronanu a výsledný stav chování

sondy tak byl kombinací chování sondy v čistě vodném prostředí a v čistě micelárním roztoku.

Doba života monomeru byla kombinací čistě micelárního roztoku a čisté vody: 3,8–4,2 ns. Doba života dimeru ale měla zvláštní průběh, nejdříve s vlnovou délkou rostla a poté zas klesala: 1,4–2,0–0,21 ns. Kromě dimeru se zde u vyšších vlnových délek nejspíš objevil i příspěvek vícemerů, který souvisí s výrazným zakoncentrováním sondy ve vodném prostředí [22, 69].



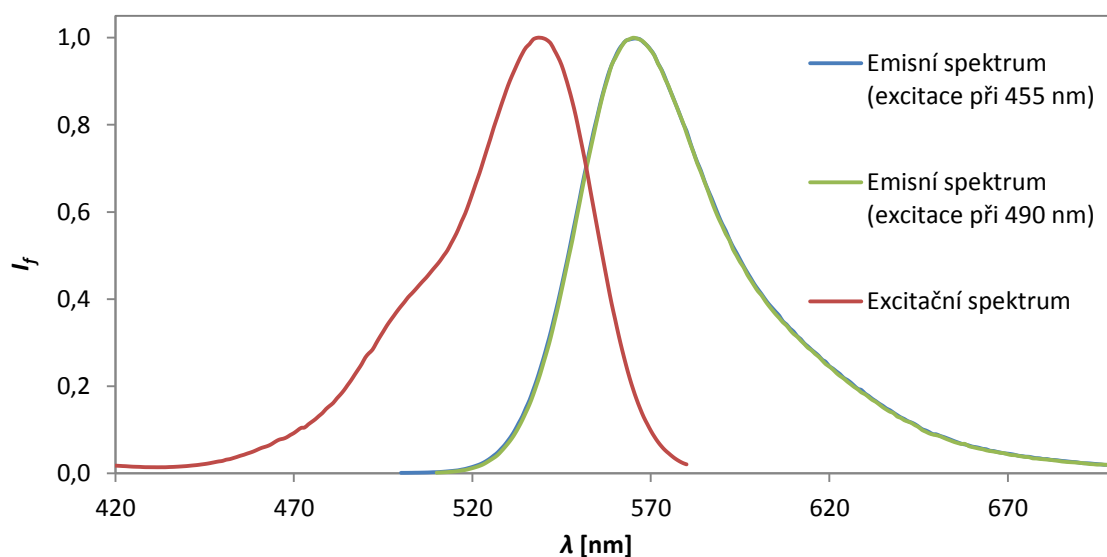
Obrázek 36: Dekonvoluce emisního spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v gelu

V gelu tedy podle očekávání bylo výrazně zredukováno vodné prostředí přítomné v čistě micelárním systému. Vodné prostředí v gelu ale nebylo tvořeno pouze množstvím molekul vody adsorbovaných na silně hydrofilním řetězci hyaluronanu. Kdyby tomu tak bylo, došlo by ke zkrácení obou dob života, kvůli menší ochotě orientovaných molekul vody relaxovat okolo excitované molekuly sondy.

4.6.2.4 Rhodamin 6G v ustáleném gelu

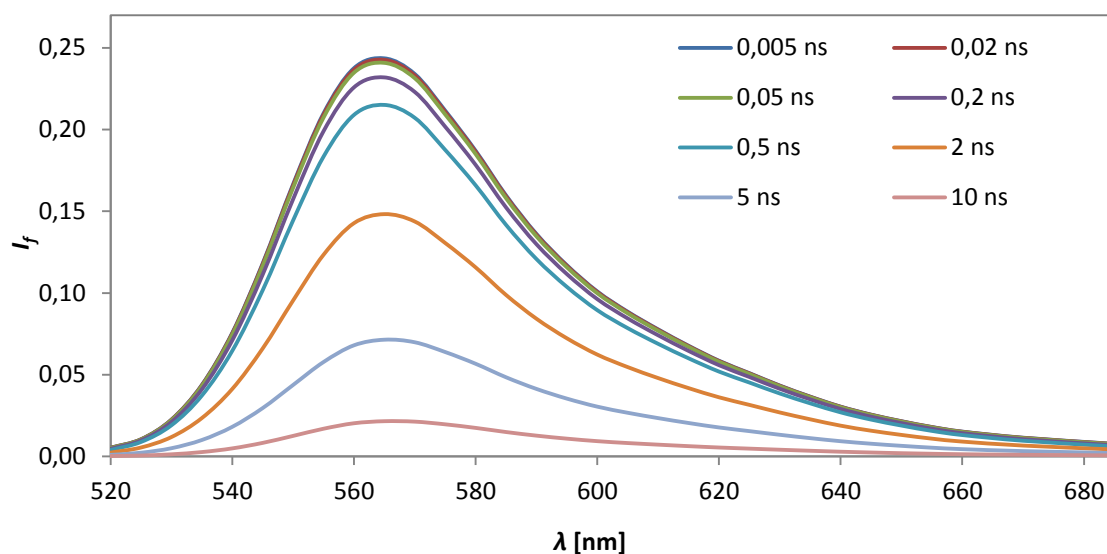
Gel byl obdobně jako v případě prodanu ponechán zrát pod svým supernatantem po dobu jednoho týdne a poté byl proměřen.

Emisní spektra při excitaci v 455 a 490 nm byla opět stejná (Obrázek 37). Maximum emise bylo stejně jako u neustáleného gelu v 565 nm.



Obrázek 37: Normalizovaná emisní a excitační spektra rhodaminu 6G (10^{-5} M) v ustáleném gelu

TRES opět znatelně neměnila v čase svůj tvar, pouze klesala intenzita fluorescence (Obrázek 38). Existoval zde opět jeden pík při asi 564 nm, který se s časem posouval k 566 nm. Toto opět ukazuje na přítomnost dvou emisních druhů sondy.

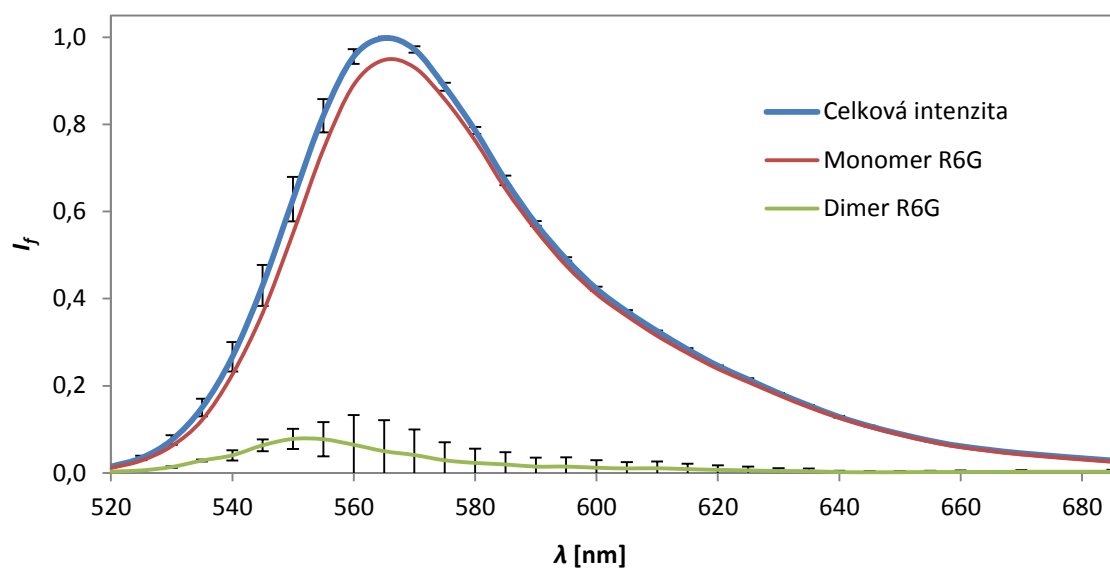


Obrázek 38: TRES rhodaminu 6G (10^{-5} M) v ustáleném gelu

Dekonvolucí emisního spektra byly zjištěny opět dva emisní druhy rhodaminu 6G (Obrázek 39). Šlo opět o monomer (maximum v 566 nm) a dimer této sondy (547–555 nm). Výsledek dekonvoluce byl velice podobný případu neustáleného gelu.

Doba života monomeru byla opět kombinací údajů z čistě micelárního a čistě vodného roztoku: 3,8–4,2 ns. Doba života dimeru měla obdobný průběh jako v neustáleném gelu, nejdříve s vlnovou délkou rostla a poté zas klesala: 1,3–1,9–0,19 ns. Také se zde objevil příspěvek vícemerů sondy díky jejímu výraznému zakoncentrování.

Týden zrání tedy v gelu nezpůsobil žádné výrazné změny.



Obrázek 39: Dekonvoluce emisního spektra rhodaminu 6G ($10^{-5} M$) v ustáleném gelu

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zkoumat vlastnosti hydrogelu vzniklého na základě specifické interakce mezi hyaluronanem a micelami kationtového tenzidu. Tento hydrogel byl posuzován z hlediska schopnosti fungovat jako potenciální nosič léčiv. Také proto byl připravován v 0,15M vodném roztoku NaCl, což mělo simulovat fyziologický roztok. Principem využití hydrogelu měla být solubilizace hydrofóbního léčiva do hydrofóbních oblastí obsažených ve struktuře hydrogelu, kterými mají být micely.

Použitými technikami pro zjištění vlastností tohoto hydrogelu byla ustálená a časově rozlišení fluorescenční spektroskopie, přesněji byla použita technika časově rozlišených emisních spekter (TRES) a metoda dekonvoluce emisního spektra na dílčí složky pomocí parametrů poklesů intenzity fluorescence měřených při jednotlivých vlnových délkách v rámci emisního spektra.

Za účelem charakterizace prostředí hydrogelu byly zjištěny charakteristiky tří fluorescenčních sond, prodanu, laurdanu a rhodaminu 6G, v systémech napodobujících dílčí prostředí hydrogelu. Byly charakterizovány vodné roztoky těchto sond a jejich micelární roztoky. Interakce sond s řetězcem hyaluronanu se nepředpokládaly a nebylo proto provedeno žádné měření vodného roztoku hyaluronanu. Výsledky nakonec neukázaly žádnou interakci sond s hyaluronanovým řetězcem.

Pomocí sond prodanu a laurdanu byla potvrzena přítomnost micelárních agregátů v gelu. Tyto agregáty mohly mít kulovitý tvar, ale pravděpodobněji byl jejich tvar deformovaný. Sondy prodan a laurdan byly v čistě micelárních roztocích i v gelových fázích lokalizovány pouze v micelách, v rámci kterých byly rozmístěny ve třech odlišných mikroprostředích. Prvním prostředím bylo jádro micely, tedy prostředí mezi uhlovodíkovými řetězci tenzidu. Další dvě mikroprostředí se nacházela v rámci palisádové vrstvy micel a lišila se obsahem molekul vody, které se do palisádové vrstvy dostaly z vodného objemu. Jedno mikroprostředí vykazovalo kapalně-krytalický charakter a umožňovalo penetraci molekul vody, což způsobilo u sond prodanu a laurdanu intramolekulární přenos náboje (ICT) v excitovaném stavu vlivem zvýšené polarizace. Tyto molekuly sond potom emitovaly ze stavu ICT. Naopak druhé prostředí v rámci palisádové vrstvy připomínalo gelovou strukturu, která ztěžovala penetraci molekul vody do vrstvy. Polarita zde tedy nebyla tak velká jako v předešlém případě a molekuly prodanu a laurdanu proto emitovaly ze stavu LE, který je charakteristický spíše pro nepolární prostředí. U micel vždy převládala emise z ICT stavu ukazující na fluidní charakter palisádové vrstvy. Většina molekul těchto dvou sond se nacházela v palisádové vrstvě, kam byly molekuly těchto sond přitahovány nejen na základě příznivých polaritních poměrů, ale také se zde koncentrovaly z důvodu přitažlivé elektrostatické interakce mezi jejich karboxylátovou skupinou a kladně nabitými hlavami tenzidu.

Vodné prostředí zvolených systémů bylo zkoumáno pomocí fluorescenční sondy rhodamin 6G, protože prodan a laurdan se v těchto systémech ve vodném prostředí vůbec nevyskytovaly a nepřinášely o tomto prostředí žádné informace. Oproti případu v čistě vodném systému (roztok NaCl) se v micelárním roztoku objevily změny v chování této sondy. Monomery sondy se asociovaly na povrchu micel i přes elektrostatickou repulzi způsobenou

kladnými náboji jak na micely, tak na molekule sondy. Převládla zde přitažlivá hydrofóbní interakce a přitažlivá elektrostatická interakce mezi π -elektrony sondy a kladně nabitými hlavami tenzidu. Fluorescence monomeru asociovaného na micelách pak byla bathochromně posunuta a byl znatelně snížen kvantový výtěžek. Tímto byla zvýrazněna emise dimeru této sondy (J-dimer), který při zvolené koncentraci vznikal v malém množství jak ve vodném, tak v micelárním systému. Ke zvýraznění emise dimeru došlo i přes schopnost micel snižovat proces dimerizace. Tyto změny v chování rhodaminu 6G při přechodu z vodného na micelární roztok byly použity pro charakterizaci prostředí gelu. Zmíněné změny se zde projeví, ale nebyly tak výrazné, což ukazuje na kombinaci chování sondy ve vodném a micelárním roztoku. Odtud lze usuzovat, že část povrchu micel byla molekulám rhodaminu znepřístupněna, tedy že tato část povrchu byla obalena řetězcí hyaluronanu. V gelu došlo dále ke změně zjištěných dob života rhodaminu. Kromě hodnot zjištěných také v čistě micelárním systému se zde na červené straně emisního spektra dimeru sondy objevily krátké doby života, které podle literatury patří víceměru rhodaminu a ukazují tak na výrazné zakoncentrování sondy ve vodném prostředí. Jinak se ale hodnoty dob života vzhledem k čistě micelárnímu systému téměř nezměnily. Toto ukazuje na výrazné zredukování objemu vodného prostředí v gelu a zároveň lze říci, že molekuly vody v gelu obsažené nebyly pouze adsorbované na povrchu hyaluronanového řetězce, ale byly také volné.

Prostředí hydrogelu bylo zkoumáno také po týdnu zrání pod svým supernatantem. Ani jedna ze tří fluorescenčních sond nezjistila významné změny, systém tedy hned po svém vzniku dosáhl určité rovnováhy. Neproběhly změny v rámci micel, ani nedošlo k většímu obsazení povrchu micel hyaluronanovými řetězcí.

Vytvořené hydrogely byly stabilní v prostředí simulujícím fyziologický roztok, byly čiré, silně viskózní, nevykazovaly změny v čase (v průběhu týdne) a obsahovaly micely tvořící hydrofóbní prostředí vhodné pro solubilizaci léčiv. Tyto hydrogely lze proto hodnotit jako vhodné pro další výzkum v oblasti nosičů léčiv. Hydrogely bude vhodné změřit po delším zrání, stejně tak je potřeba získat informace o jejich chování po odstranění supernatantu a promytí jiným roztokem. Vhodné bude také použití jiných fluorescenčních sond, popřípadě navázaných na hyaluronanovém řetězcí.

Interakce hyaluronan-kationtový tenzid zapříčiňují kromě gelace také vznik minimicel na hyaluronanovém řetězcí při nízké koncentraci hyaluronanu a tenzidu, který dosahuje kritické agregační koncentrace. Tento systém může potenciálně sloužit také jako nosič léčiv. V této práci ale nebyl zkoumán, protože se po přidání soli rozpadá.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SZARPAK, Anna, Isabelle PIGNOT-PAINTRAND, Claire NICOLAS, Catherine PICART a Rachel AUZÉLY-VELTY. Multilayer Assembly of Hyaluronic Acid/Poly(allylamine): Control of the Buildup for the Production of Hollow Capsules. *Langmuir*. 2008-09-02, vol. 24, issue 17, s. 9767–9774. DOI: 10.1021/la801274z.
- [2] TECHEN, Anne, Carsten HILLE, Carsten DOSCHE a Michael U. KUMKE. Fluorescence study of drug–carrier interactions in CTAB/PBS buffer model systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, vol. 377, issue 1, s. 251–261. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.03.063.
- [3] HRUBÝ, Martin, Jan KUČKA, Ján KOZEMPEL a Ondřej LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy 100*. 2006, s. 10–16.
- [4] ZHENG SHU, Xiao, Yanchun LIU, Fabio S PALUMBO, Yi LUO a Glenn D PRESTWICH. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004, vol. 25, 7-8, s. 1 339–1 348. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.014.
- [5] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, vol. 49, issue 8, s. 1 993–2 007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- [6] FMS - The Fluorescent Mineral Society: Luminiscence and Fluorescence. [online]. [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://uvminerals.org/fms/luminescence>
- [7] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.
- [8] Fišar Zdeněk: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze [online] 11.2.2009, poslední aktualizace 6.2.2013 [cit. 2014-01-09] Dostupný z WWW: <<http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskopie-v-neurovedach>>. ISSN 1803-6619.
- [9] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [10] RAGUŽ, Marija a Jasminka BRNJAS-KRALJEVIĆ. Resolved Fluorescence Emission Spectra of PRODAN in Ethanol/Buffer Solvents. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2005, vol. 45, issue 6, s. 1636-1640. DOI: 10.1021/ci050166p.
- [11] KARUKSTIS, Kerry K. a James R. MCDONOUGH. Characterization of the Aggregates of N -Alkyl- N -methylpyrrolidinium Bromide Surfactants in Aqueous Solution. *Langmuir*. 2005, vol. 21, issue 13, s. 5716–5721. DOI: 10.1021/la047015l.
- [12] HARIANAWALA, Abizer I a Robin H BOGNER. Sensitivity and selectivity of p-(N-dimethylamino cinnamylidene) malononitrile, 6-propionyl-2-(dimethylamino)

- naphthalene (PRODAN) and fluorescein. *Journal of Luminescence*. 1998, vol. 79, issue 2, s. 97–105. DOI: 10.1016/S0022-2313(98)00034-9.
- [13] ADHIKARY, Ramkrishna, Charles A. BARNES a Jacob W. PETRICH. Solvation Dynamics of the Fluorescent Probe PRODAN in Heterogeneous Environments: Contributions from the Locally Excited and Charge-Transferred States. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009-09-03, vol. 113, issue 35, s. 11 999–12 004. DOI: 10.1021/jp905139n.
- [14] BAGATOLLI, Luis A, Bruno MAGGIO, Felipe AGUILAR, Carlos P SOTOMAYOR a Gerardo D FIDELIO. Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* [online]. 1997, vol. 1325, issue 1, s. 80–90 [cit. 2014-01-03]. DOI: 10.1016/S0005-2736(96)00246-5.
- [15] PERIASAMY, Nagarajan a Roland WINTER. The effects of temperature, pressure and peptide incorporation on ternary model raft mixtures – A Laurdan fluorescence spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2006, vol. 1764, issue 3, s. 398–404. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.10.013.
- [16] BERNIK, D. L., D. ZUBIRI, E. TYMCZYSZYN a E. A. DISALVO. Polarity and Packing at the Carbonyl and Phosphate Regions of Lipid Bilayers. *Langmuir* [online]. 2001, vol. 17, issue 21, s. 6 438–6 442 [cit. 2014-01-03]. DOI: 10.1021/la010570s.
- [17] JURKIEWICZ, Piotr, Agnieszka OLŻYŃSKA, Marek LANGNER a Martin HOF. Headgroup Hydration and Mobility of DOTAP/DOPC Bilayers: A Fluorescence Solvent Relaxation Study. *Langmuir* [online]. 2006, vol. 22, issue 21, s. 8 741–8 749 [cit. 2014-01-03]. DOI: 10.1021/la061597k.
- [18] VINCENT, Michel, Béatrice DE FORESTA a Jacques GALLAY. Nanosecond Dynamics of a Mimicked Membrane-Water Interface Observed by Time-Resolved Stokes Shift of LAURDAN. *Biophysical Journal*. 2005, vol. 88, issue 6, s. 4 337–4 350. DOI: 10.1529/biophysj.104.057497.
- [19] GHASEMI, Jahanbakhsh, Ali NIAZI a Mikael KUBISTA. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titration and chemometrics method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005, vol. 62, 1–3, s. 649–656. DOI: 10.1016/j.saa.2005.02.012.
- [20] SHANKARLING, G. S. a K. J. JARAG. Laser Dyes. *Resonance*. 2010, Number 9, s. 804–818.
- [21] 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. 1 419–1 430. DOI: 10.1016/S0584-8539(97)00027-5.
- [22] ZEHENTBAUER, Florian M., Claudia MORETTO, Ryan STEPHEN, Thangavel THEVAR, John R. GILCHRIST, Dubravka POKRAJAC, Katherine L. RICHARD a

- Johannes 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.
- [23] PENZKOFER, A. a W. LEUPACHER. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions. *Journal of Luminescence*. 1987, vol. 37, issue 2, s. 61–72. DOI: 10.1016/0022-2313(87)90167-0.
- [24] ZHANG, Xian-Fu, Yakui ZHANG a Limin LIU. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: Structural effect on emission mechanism in different solvents. *Journal of Luminescence*. 2014, vol. 145. DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.07.066.
- [25] TOPTYGIN, Dmitri, Beverly Z. PACKARD a Ludwig BRAND. Resolution of absorption spectra of rhodamine 6G aggregates in aqueous solution using the law of mass action. *Chemical Physics Letters*. 1997, vol. 277, 5–6, s. 430–435. DOI: 10.1016/S0009-2614(97)00943-3.
- [26] DREXHAGE, K.H. Fluorescence Efficiency of Laser Dyes. *Journal of research of the National Bureau of Standards*. Washington: National Bureau of Standards, 1976, No. 3.
- [27] PERIASAMY, N. a A.S.R. KOTI. Time resolved fluorescence spectroscopy: TRES and TRANES. *Proceedings of Indian National Scientific Academy*. 2003, No.1, s. 41–48.
- [28] IRA, KOTI, KRISHNAMOORTHY a PERIASAMY. TRANES Spectra of Fluorescence Probes in Lipid Bilayer Membranes: An Assessment of Population Heterogeneity and Dynamics. *Journal of Fluorescence*. 2003, vol. 13, issue 1, s. 95–103. DOI: 10.1023/A:1022362715903.
- [29] KOTI, A. S. R., M. M. G. KRISHNA a N. PERIASAMY. Time-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy (TRANES): A Novel Method for Confirming Emission from Two Excited States. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2001, vol. 105, issue 10, s. 1 767–1 771. DOI: 10.1021/jp004361c.
- [30] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [31] BARTOVSKÁ, Lidmila a Aleš PANÁČEK. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-7080-579-X.
- [32] *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker, 2001, 886 s. ISBN 08-247-0292-1.
- [33] JAKUBOWSKA, Anna. Interactions of different counterions with cationic and anionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010, vol. 346, issue 2, s. 398–404. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.03.043.

- [34] MANOJLOVIC, Jelena. The Krafft temperature of surfactant solutions. *Thermal Science*. 2012, vol. 16, suppl. 2, s. 631–640. DOI: 10.2298/TSCI120427197M.
- [35] STRNADOVÁ, H. a L. KVÍTEK. Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. *Chemické listy*. 2009, 315–319.
- [36] NASKAR, Bappaditya, Abhijit DAN, Soumen GHOSH, V.K. ASWAL a Satya P. MOULIK. Revisiting the self-aggregation behavior of cetyltrimethylammonium bromide in aqueous sodium salt solution with varied anions. *Journal of Molecular Liquids*. 2012, vol. 170. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.03.020.
- [37] 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.
- [38] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. [online]. 1997 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [39] NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., and KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 53. 2008, s. 397–411.
- [40] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006-12-8, vol. 29, issue 1, s. 17–25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z.
- [41] SEEBECK, Petra a Peter HAIMA. Hyaluronic Acid (Hyaluronan): Biomarker for liver brosis and cirrhosis, joint disease, inflammation and others. [online]. 2013, s. 16 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.tecomedical.com/en/clinical-information>
- [42] CHONG, Barrie Fong, Lars M. BLANK, Richard MCLAUGHLIN a Lars K. NIELSEN. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, vol. 66, issue 4, s. 341–351. DOI: 10.1007/s00253-004-1774-4.
- [43] SCOTT, John E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. [online]. 1998 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [44] 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.
- [45] LIN, Chi-Ching, Chien-Hsiang CHANG a Yu-Min YANG. Gelation of spontaneously formed catanionic vesicles by water soluble polymers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009, vol. 346, 1–3. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.05.027.
- [46] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Gunnar. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte:

- tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10. DOI: 10.1021/j100373a075.
- [47] BJOERLING, Mikael, Asa HERSLOEF-BJOERLING a STILBS. An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*. 1995, vol. 28, issue 20, s. 6970-6975. DOI: 10.1021/ma00124a038.
- [48] 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.
- [49] OKUZAKI, H. a Y. OSADA. Ordered-Aggregate Formation by Surfactant-Charged Gel Interaction. *Macromolecules*. 1995, vol. 28, issue 1, s. 380–382. DOI: 10.1021/ma00105a054.
- [50] 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 system. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, vol. 96, issue 5, s. 2 345–2 348. DOI: 10.1021/j100184a061.
- [51] PERIASAMY, N. a A. S. R. KOTI. Time resolved fluorescence spectroscopy: TRES and TRANES. *Proceedings of Indian National Scientific Academy*. 2003, No.1, s. 41–48.
- [52] KOTI, A. S. R. a N. PERIASAMY. Application of time resolved area normalized emission spectroscopy to multicomponent systems. *The Journal of Chemical Physics*. 2001, vol. 115, issue 15. DOI: 10.1063/1.1405017.
- [53] KOTI, A. S. R., M. M. G. KRISHNA a N. PERIASAMY. Time-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy (TRANES): A Novel Method for Confirming Emission from Two Excited States. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2001, vol. 105, issue 10, s. 1 767–1 771. DOI: 10.1021/jp004361c.
- [54] IRA, KOTI, KRISHNAMOORTHY a PERIASAMY. TRANES Spectra of Fluorescence Probes in Lipid Bilayer Membranes: An Assessment of Population Heterogeneity and Dynamics. *Journal of Fluorescence*. 2003, vol. 13, issue 1, s. 95–103. DOI: 10.1023/A:1022362715903.
- [55] TISEANU, C., M.U. KUMKE, V.I. PARVULESCU, A.S.R. KOTI, B.C. GAGEA a J.A. MARTENS. Time-resolved photoluminescence of terbium-doped microporous–mesoporous Zeotile-1 materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007, vol. 187, 2-3, s. 299–304. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2006.10.026.
- [56] KAUSHLENDRA, K. Variable-Temperature Time-Resolved Emission Spectra Studies of Random Pyrene Urethane Methacrylate Copolymers with High Pyrene Incorporation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013-10-03, vol. 117, issue 39, s. 11863-11876. DOI: 10.1021/jp406885f.

- [57] BARJA, Beatriz C., Carlos CHESTA, Teresa D. Z. ATVARS a Pedro F. ARAMENDÍA. Relaxations in Poly(vinyl alcohol) and in Poly(vinyl acetate) Detected by Fluorescence Emission of 4-Aminophthalimide and Prodan. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, vol. 109, issue 33. DOI: 10.1021/jp050844a.
- [58] HUTTERER, R, F.W SCHNEIDER, H LANIG a M HOF. Solvent relaxation behaviour of n-anthroyloxy fatty acids in PC-vesicles and paraffin oil: a time-resolved emission spectra study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1997, vol. 1323, issue 2, s. 195–207. DOI: 10.1016/S0005-2736(96)00186-1.
- [59] MOYANO, Fernando, M. Alicia BIASUTTI, Juana J. SILBER a N. Mariano CORREA. New Insights on the Behavior of PRODAN in Homogeneous Media and in Large Unilamellar Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, vol. 110, issue 24, s. 11838-11846. DOI: 10.1021/jp057208x.
- [60] CAPEK, Ignac. Fate of excited probes in micellar systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2002-03-29, vol. 97, 1–3, s. 91–149. DOI: 10.1016/S0001-8686(01)00049-5.
- [61] LISSI, E. A., E. B. ABUIN, M. A. RUBIO a A. CERÓN. Fluorescence of Prodan and Laurdan in AOT/Heptane/Water Microemulsions: Partitioning of the Probes and Characterization of Microenvironments. *Langmuir*. 2000, vol. 16, issue 1, s. 178–181. DOI: 10.1021/la990720n.
- [62] JURKIEWICZ, Piotr, Agnieszka OLŻYŃSKA, Marek LANGNER a Martin HOF. Headgroup Hydration and Mobility of DOTAP/DOPC Bilayers: A Fluorescence Solvent Relaxation Study. *Langmuir*. 2006, vol. 22, issue 21, s. 8 741–8 749. DOI: 10.1021/la061597k.
- [63] BARUCHA-KRASZEWSKA, Justyna, Sebastian KRASZEWSKI, Piotr JURKIEWICZ, Christophe RAMSEYER a Martin HOF. Numerical studies of the membrane fluorescent dyes dynamics in ground and excited states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2010, vol. 1798, issue 9, s. 1 724–1 734. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.05.020.
- [64] VIARD, Mathias, Jacques GALLAY, Michel VINCENT a Maïté PATERNOSTRE. Origin of Laurdan Sensitivity to the Vesicle-to-Micelle Transition of Phospholipid-Octylglucoside System: A Time-Resolved Fluorescence Study. *Biophysical Journal*. 2001, vol. 80, issue 1, s. 347–359. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76019-5.
- [65] ROWE, Brad A. a Sharon L. NEAL. Photokinetic Analysis of PRODAN and LAURDAN in Large Unilamellar Vesicles from Multivariate Frequency-Domain Fluorescence. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, vol. 110, issue 30, s. 15 021–15 028. DOI: 10.1021/jp036664n.
- [66] NOVAIRA, Mercedes, M. Alicia BIASUTTI, Juana J. SILBER a N. Mariano CORREA. New Insights on the Photophysical Behavior of PRODAN in Anionic and Cationic Reverse Micelles: From Which State or States Does It Emit?. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, vol. 111, issue 4, s. 748–759. DOI: 10.1021/jp065528q.

- [67] AGAZZI, Federico M., Javier RODRIGUEZ, R. Dario FALCONE, Juana J. SILBER a N. Mariano CORREA. PRODAN Dual Emission Feature To Monitor BHDC Interfacial Properties Changes with the External Organic Solvent Composition. *Langmuir*. 2013-03-19, vol. 29, issue 11, s. 3 556–3 566. DOI: 10.1021/la304951f.
- [68] MARTÍNEZ MARTÍNEZ, V., F. LÓPEZ ARBELOA, J. BAÑUELOS PRIETO, T. ARBELOA LÓPEZ a I. LÓPEZ ARBELOA. Characterization of Rhodamine 6G Aggregates Intercalated in Solid Thin Films of Laponite Clay. 1. Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, vol. 108, issue 52, s. 20 030–20 037. DOI: 10.1021/jp047552e.
- [69] MARTÍNEZ MARTÍNEZ, V., F. LÓPEZ ARBELOA, J. BAÑUELOS PRIETO, I. LÓPEZ ARBELOA 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, s. 7 443–7 450. DOI: 10.1021/jp050440i.
- [70] TAJALLI, H., A. GHANADZADEH GILANI, M.S. ZAKERHAMIDI a M. MOGHADAM. Effects of surfactants on the molecular aggregation of rhodamine dyes in aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009, vol. 72, issue 4, s. 697–702. DOI: 10.1016/j.saa.2008.09.033.
- [71] KOHUTOVÁ, L. *Studium fyzikálních gelů s hydrofobními doménami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 77 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [72] EKWALL, Per, Leo MANDELL a Peter SOLYOM. The aqueous cetyl trimethylammonium bromide solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1971, vol. 35, issue 4, s. 519–528. DOI: 10.1016/0021-9797(71)90210-4.

7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

7.1 Seznam symbolů

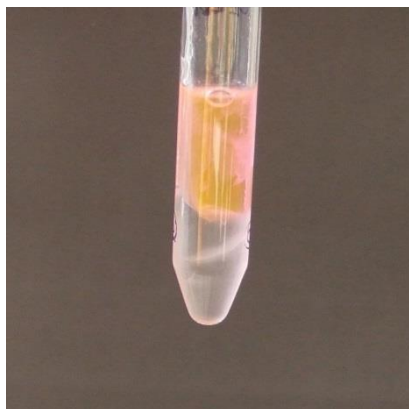
| | |
|---------------------|--|
| α | pre-exponenciální faktor |
| Γ | rychlostní konstanta zářivého přechodu |
| λ | vlnová délka |
| σ | směrodatná odchylka |
| τ, τ_{av} | doba života, průměrná doba života |
| χ^2, χ_r^2 | parametr proložení, redukovaná hodnota parametru proložení |
| $I_0, I(t), I_{SS}$ | počáteční intenzita fluorescence, intenzita fluorescence v čase t po excitaci, intenzita ustálené fluorescence |
| k_{nr} | rychlostní konstanta nezářivých přechodů |
| $L(t_i)$ | funkce odezvy přístroje |
| n, p, ν | počet dat, počet parametrů proložené funkce, počet stupňů volnosti |
| $n_0, n(t)$ | počáteční populace excitovaných fluoroforů, počet excitovaných fluoroforů v čase t |
| $N(t_i), N_c(t_i)$ | funkce poklesu intenzity fluorescence, funkce proložená poklesem intenzity fluorescence |
| N_{CMC} | agregační číslo tenzidu při kritické micelární koncentraci |
| Q | kvantový výtěžek |
| t | čas po excitaci pulzem záření |
| $W(t_i)$ | vážená rezidua pro jednotlivé časové kanály |

7.2 Seznam zkratk

| | |
|---------|---|
| ADC | analog-to-digital convertor (analogově digitální převodník) |
| AOT | 1,4-bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný |
| BHDC | benzyl-n-hexadecyldimethylammonium chlorid |
| Brij 35 | polyoxyethylen(23)laurylether |
| CAC | kritická agregační koncentrace |
| CFD | constant function discriminator („diskriminátor konstantní funkce“) |
| CMC | kritická micelární koncentrace |
| CTAB | cetyltrimethylammonium bromid |

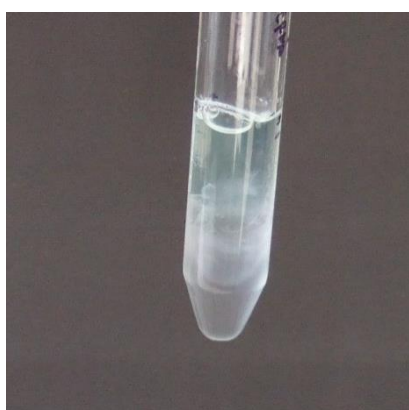
| | |
|----------|--|
| DODCI | 3,3'-diethyloxakarbocyanin jodid |
| DOPC | 1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin |
| DOTAP | di-oleoyl-trimethylammoniumpropan |
| GP | generalizovaná polarizace |
| Hy | hyaluronan |
| ICT (CT) | intramolecular charge transfer (intramolekulární přenos náboje) |
| LD | laser diode (laserová dioda) |
| LE | local excited (lokálně excitovaný) |
| LED | light-emitting diode (záření emitující dioda) |
| NLLS | nonlinear least squares (nelineární nejmenší čtverce) |
| PAL | povrchově aktivní látky (tenzidy) |
| PGA | programmable gain amplifier („programovatelný výsledný zesilovač“) |
| POPOP | 1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen |
| R | relaxed (zrelaxovaný) |
| R6G | rhodamin 6G |
| REES | red-edge excitation shift (posun emise vlivem excitace na červené straně excitačního spektra) |
| S_x | singletový elektronový stav |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| T_x | tripletový elektronový stav |
| TAC | time-to-amplitude convertor (převodník času na amplitudu) |
| TCSPC | time-correlated single photon counting (časově korelované čítání fotonů) |
| TRANES | time-resolved area-normalized emission spectra (časově rozlišená emisní spektra normalizovaná v ploše pod křivkou) |
| TRES | time-resolved emission spectra (časově rozlišená emisní spektra) |
| WD | window discriminator (diskriminátor) |

8 PŘÍLOHY



Příloha 1: První fáze přípravy gelu:

Smíchání vodných roztoků 200mM tenzidu (CTAB) a 0,5% hyaluronanu (750–1000 kDa),
obou s přítomností NaCl o koncentraci 0,15 M
Fluorescenční sonda: rhodamin 6G



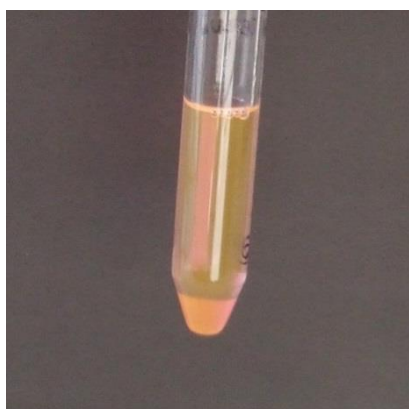
Příloha 2: První fáze přípravy gelu:

Smíchání vodných roztoků 200mM tenzidu (CTAB) a 0,5% hyaluronanu (750–1000 kDa),
obou s přítomností NaCl o koncentraci 0,15 M
Fluorescenční sonda: prodan



Příloha 3: Druhá fáze přípravy gelu:

Vzorek po rozmíchání na vířivém míchadle
Fluorescenční sonda: rhodamin 6G



Příloha 4: Třetí fáze přípravy gelu:

Vzorek po odstředění: zřetelně oddělený gel
(dole) od supernatantu
Fluorescenční sonda: rhodamin 6G



Příloha 5: Nástavec pro tuhé vzorky použitý při časově rozlišených měřeních gelu



Příloha 6: Ilustrace citlivosti fluorescenční sondy rhodaminu 6G na přítomnost micel: vodný roztok soli (vlevo) a micelární vodný roztok s přítomností soli s jasným bathochromním posunem emise (vpravo)