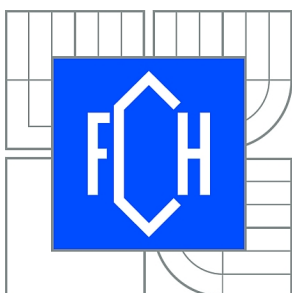




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

## IONOGENNÍ FLUORESCENČNÍ SONDY VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

IONOGENIC FLUORESCENCE PROBES IN RESEARCH OF COLLOIDAL SYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. HANA STŘONDALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2013



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

## Zadání diplomové práce

|                        |                                 |                                  |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | <b>FCH-DIP0766/2012</b>         | Akademický rok: <b>2012/2013</b> |
| Ústav:                 | Centrum materiálového výzkumu   |                                  |
| Student(ka):           | <b>Bc. Hana Střondalová</b>     |                                  |
| Studijní program:      | Spotřební chemie (N2806)        |                                  |
| Studijní obor:         | Spotřební chemie (2806T002)     |                                  |
| Vedoucí práce          | <b>Ing. Filip Mravec, Ph.D.</b> |                                  |
| Konzultanti:           | Ing. Jakub Mondek               |                                  |

### Název diplomové práce:

Ionogenní fluorescenční sondy ve výzkumu koloidních systémů

### Zadání diplomové práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití amfifilních fluorescenčních sond v koloidních systémech.
2. Seznámit se stanovováním spektrálních vlastností amfifilních fluorescenčních sond a navrhnout modelové experimenty.
3. Provést základní experimenty k ověření využití uvedených sond ve studiu interakcí koloidních částic na bázi hyaluronanu a tenzidů.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití amfifilních sond ve studiu interakce hyaluronan-tenzid.

### Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

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

-----  
Bc. Hana Střondalová  
Student(ka)

-----  
Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
Vedoucí práce

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

V Brně, dne 31.1.2013

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

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývala studiem interakcí ionogenních a amfifilních fluorescenčních sond s polyelektrolyty. Výzkum chování těchto koloidních systémů by mohl pomoci v objasnění interakcí mezi polyelektrolyty a tenzidy. Cílem bylo zjistit, zda uvedené sondy jsou vhodné pro takovýto výzkum.

V této práci byly použity dva elektrolyty, konkrétně polystyrensulfonát sodný a hyaluronan. Byla studována interakce mezi nimi a fluorescenčními sondami: 4-Di-2-Asp, dodecylakridinovou oranž, methylenovou modř, DiO a DiA. Poté byl do tohoto systému přidáván kationtový tenzid cetyltrimethylamonium bromid. Vzorky byly prozkoumány pomocí metod fluorescenční a UV/VIS spektroskopie. Byla měřena emisní a absorpční spektra uvedených sond.

Důvodem, proč byly pokusy prováděny právě s těmito sondami, byl předpoklad, že díky přítomnému kladnému náboji se budou tyto sondy elektrostaticky vázat na záporně nabitý polyelektrolyt. U fluorescenčních sond dodecylakridinové oranže a methylenové modře se také předpokládala tvorba dimerů či jiných agregátů. U sondy 4-Di-2-Asp měly být pozorovány změny intenzity fluorescence a absorpčních spekter v souvislosti s případnou tvorbou agregátů. V literatuře nebyly zatím agregáty 4-Di-2-Asp popsány. V průběhu měření toto nebylo jednoznačně prokázáno. Jednoznačná tvorba dimerů byla pozorována pouze u dodecylakridinové oranže.

Sondy DiO a DiA byly použity pouze ve studiu interakce s polyelektrolyty. Tyto fluorescenční sondy se projeví jako nevhodné, jelikož se sorbovaly na stěny zkumavek.

Bylo zjištěno, že v systému polyelektrolyt-sonda jsou fluorescenční sondy z komplexu vytěšňovány cetyltrimethylamonium bromidem, který se vázal místo nich. Tenzid interagoval s vaznými místy polyelektrolytu – se záporně nabitými skupinami.

## ABSTRACT

This diploma thesis studied the interaction of ionic and amphiphilic fluorescent probes with polyelectrolytes. The research of such colloidal system could be helpful in deeper understanding of interactions between polyelectrolytes and surfactants. The aim of this thesis was to determine whether ionic or amphiphilic probes are suitable for this research.

Two polyelectrolytes, sodium polystyrene sulfonate and hyaluronan were used in this study. Interactions of polyelectrolytes with fluorescent probes (4-Di-2-Asp, methylene blue, dodecyl acridine orange, DiO and DiA) were studied in this work. Then cationic surfactant cetyltrimethylamonium bromide was added to this system. Samples were studied using fluorescence and UV/VIS spectroscopy. Emission and absorption spectra of these probes were recorded.

This experiment was based on hypothesis that due to positive charge these probes will bind to the negatively charged polyelectrolyte. Formation of dimers or other aggregates was presumed for fluorescent probes dodecyl acridine orange and methylene blue.

When 4-Di-2-Asp was used, changes in fluorescence intensity and absorption spectra in connection with possible formation of aggregates was supposed to be observed.

It should be noted that formation of dimers for 4-Di-2-Asp is not described in literature. The formation of dimers wasn't clearly demonstrated during the measurement. Formation of dimers was observed only with dodecyl acridine orange.

Probes DiO and DiA were used only in the study of the interaction with polyelectrolytes. These fluorescent probes showed up as inappropriate, because they adsorbed on tube walls.

When cationic surfactant was added to hyaluronan-fluorescent probe system, surfactant pushed away fluorescent probe and bonded electrostatically to negatively charged groups of polyelectrolyte.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kyselina hyaluronová, polystyrenulfonát sodný, methylenová modř, 4-Di-2-Asp, dodecylakridinová oranž, DiO, DiA, tenzidy, asociativní vlastnosti

## **KEY WORDS**

hyaluronic acid, sodium polystyrene sulfonate, methylene blue, 4-Di-2-Asp, dodecyl acridine orange, DiO, DiA, surfactants, associative properties

STŘONDALOVÁ, H. *Ionogenní fluorescenční sondy ve výzkumu koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto 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

Ráda bych na tomto místě poděkovala mému vedoucímu diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a svému konzultantovi Ing. Jakubovi Mondekovi za trpělivost, cenné rady a vstřícný přístup při řešení problémů. Také bych ráda poděkovala své rodině za psychickou i finanční podporu během celého studia. Nakonec bych chtěla poděkovat Centru materiálového výzkumu, projektu OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0012.

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>   | <b>9</b>  |
|          | 2.1 Kyselina hyaluronová .....   | 9         |
|          | 2.1.1 Chemická struktura .....   | 9         |
|          | 2.1.2 Výskyt a funkce .....  | 10        |
|          | 2.1.3 Metabolismus .....   | 10        |
|          | 2.1.4 Výroba .....   | 11        |
|          | 2.1.5 Využití .....  | 11        |
|          | 2.2 Polystyrensulfonát sodný .....                                     | 12        |
|          | 2.3 Koloidní disperzní systémy .....                                   | 12        |
|          | 2.4 Asociační procesy .....  | 13        |
|          | 2.4.1 Asociativní (micelární) koloidy .....                            | 13        |
|          | 2.4.2 Molekulární struktura asociativních koloidů .....                | 14        |
|          | 2.4.3 Kritická micelární koncentrace .....                             | 14        |
|          | 2.4.4 Struktura micel .....  | 15        |
|          | 2.4.4.1 Micely ve vodném prostředí .....                               | 15        |
|          | 2.4.4.2 Reverzní obrácené micely .....                                 | 16        |
|          | 2.4.5 Solubilizace .....   | 16        |
|          | 2.4.6 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek .....                 | 17        |
|          | 2.4.6.1 Roztoky vysokomolekulárních neelektrolytů .....                | 17        |
|          | 2.4.6.2 Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů .....                  | 18        |
|          | 2.5 Základy absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti spektra ..... | 19        |
|          | 2.5.1 Princip absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti .....       | 19        |
|          | 2.5.2 Základní vztahy .....  | 19        |
|          | 2.5.2.1 Transmittance .....  | 19        |
|          | 2.5.2.2 Absorbance .....   | 20        |
|          | 2.5.2.3 Lambert-Beerův zákon .....                                     | 20        |
|          | 2.5.3 Absorpční křivky .....   | 21        |
|          | 2.6 Luminiscenční spektrometrie .....                                  | 21        |
|          | 2.6.1 Fotoluminiscence .....   | 21        |
|          | 2.6.1.1 Fluorescence .....   | 22        |
|          | 2.6.1.2 Zpožděná fluorescence .....                                    | 22        |
|          | 2.6.1.3 Fosforescence .....  | 22        |
|          | 2.6.2 Jablonskiho diagram .....  | 22        |
|          | 2.6.3 Excitační a emisní spektra molekul .....                         | 23        |
|          | 2.6.4 Zhášení fluorescence .....                                       | 23        |
|          | 2.7 Vlastní a nevlastní fluorescence .....                             | 24        |
|          | 2.7.1 Fluorescenční značky .....                                       | 25        |
|          | 2.7.2 Fluorescenční sondy .....  | 25        |
|          | 2.7.3 H a J typ agregace .....   | 27        |
| <b>3</b> | <b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>                         | <b>28</b> |
|          | 3.1 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp .....                               | 28        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.2      | Fluorescenční sondy DiO, DiA.....   | 29        |
| 3.3      | Fluorescenční sonda Methylenová modř.....   | 29        |
| 3.4      | Fluorescenční sonda DAO.....  | 30        |
| <b>4</b> | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1      | Použité chemikálie.....   | 31        |
| 4.2      | Přístroje a zařízení.....   | 31        |
| 4.2.1    | UV-VIS Spektrofotometr.....   | 32        |
| 4.2.2    | Luminiscenční spektrometr.....  | 32        |
| 4.3      | Příprava zásobních roztoků.....   | 33        |
| 4.3.1    | Zásobní roztoky hyaluronanu.....  | 33        |
| 4.3.2    | Zásobní roztok polystyrenulfonátu sodného.....  | 33        |
| 4.3.3    | Zásobní roztoky fluorescenčních sond .....  | 34        |
| 4.3.4    | Zásobní roztoky tenzidů .....   | 34        |
| 4.4      | Příprava vzorků .....   | 34        |
| 4.4.1    | Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem .....                                  | 34        |
| 4.4.2    | Interakce systému fluorescenční sonda – polyelektrolyt s tenzidem ..<br>.....           | 35        |
| 4.5      | Měření vzorků .....   | 35        |
| 4.5.1    | Měření absorpčních spekter .....  | 35        |
| 4.5.2    | Měření emisních spekter.....  | 36        |
| 4.6      | Korekce emisních spekter .....  | 36        |
| <b>5</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>  | <b>37</b> |
| 5.1      | Interakce fluorescenční sondy s polystyrenulfonátem sodným.....                         | 37        |
| 5.1.1    | Fluorescenční sonda DAO .....   | 37        |
| 5.1.2    | Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp.....   | 39        |
| 5.1.3    | Fluorescenční sonda Methylenová modř.....   | 42        |
| 5.1.4    | Fluorescenční sondy DiO a DiA.....  | 44        |
| 5.2      | Interakce fluorescenční sondy s hyaluronanem.....                                       | 46        |
| 5.2.1    | Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp.....   | 47        |
| 5.2.2    | Fluorescenční sonda Methylenová modř.....   | 48        |
| 5.3      | Interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-<br>polystyrenulfonát sodný..... | 50        |
| 5.3.1    | Fluorescenční sonda DAO .....   | 50        |
| 5.3.2    | Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp.....   | 51        |
| 5.3.3    | Fluorescenční sonda Methylenová modř.....   | 53        |
| 5.4      | Interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-hyaluronan..                     | 54        |
| 5.4.1    | Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp.....   | 54        |
| 5.4.2    | Fluorescenční sonda Methylenová modř.....   | 55        |
| <b>6</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURA.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>8</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>   | <b>63</b> |

# 1 ÚVOD

Studiem koloidních částic a systémů se zabývá mnoho vědeckých pracovníků. Proč je vlastně důležité tyto systémy studovat? I když si to plně neuvědomujeme, jsou nedílnou součástí našeho života a doprovázejí nás téměř na každém kroku a život bez nich bychom si už nedokázali představit.

Koloidní částice se nacházejí v našem těle a můžeme je nalézt také v zubní pastě, pracím prášku anebo v mýdle, které nám právě díky těmto systémům umožňují smýt nečistoty. Také mnohé potraviny mají koloidní charakter – například mléčné výrobky. Koloidní částice jsou také využívány v lékařství jako cílené nosiče léčiv.

Abychom potenciál koloidních systémů mohli naplno využít, je třeba poznat lépe jejich vlastnosti, což je nám umožněno pomocí značení koloidních částic fluorescenčními sondami a jejich následnou fluorescencí. Fluorescence nám poskytuje cenné informace o chování makromolekul i biologických systémů a tím nám pomáhá pochopit procesy odehrávající se jak v našem těle, tak i v našem okolí.

Kyselina hyaluronová se uplatňuje v lékařství díky svým protizánětlivým účinkům a využívá se také hojně v kosmetice a to díky svému hydratačnímu účinku. V oblasti cílené distribuce léčiv má silný potenciál, například při léčbě rakoviny, jelikož je obsažena v rakovinotvorných buňkách. Díky obsahu kyseliny hyaluronové mohou rakovinotvorné buňky metastázovat. Předpokládá se, že pokud by nosičový systém obsahoval kyselinu hyaluronovou, dostal by se snáze k rakovinotvorným buňkám. Tímto by se eliminovaly nežádoucí účinky celkové léčby, v případě rakoviny chemoterapie.

V této práci byly studovány interakce s kyselinou hyaluronovou a polystyrensulfonátem sodným, jelikož jsou to látky biokompatibilní a využívané především v medicíně.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

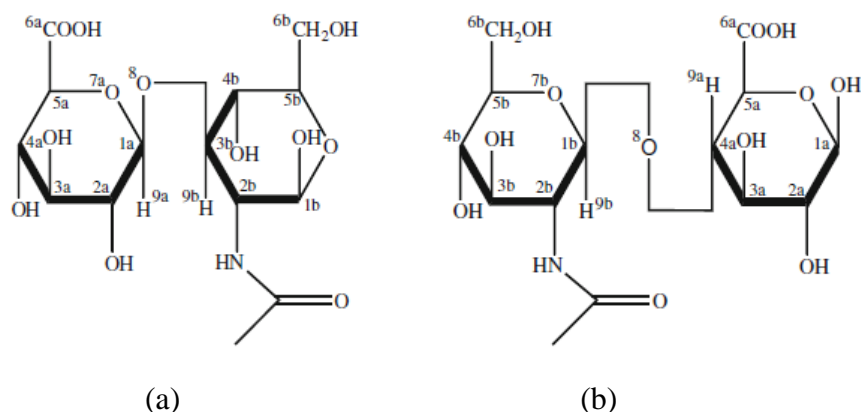
### 2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je vysokomolekulární látka, která byla poprvé izolována ze sklivce očí skotu a popsána roku 1943 Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem. Jméno dostala tato všestranná biomolekula z části dle svého původu a z části díky své struktuře. Název je odvozen od slova „hyaloid“, což znamená sklivce a poté z anglického názvu „uronic acid“ česky uronová kyselina, kterou ve své struktuře obsahuje.

Dnes je běžnější označovat tuto látku termínem hyaluronan, který byl zaveden roku 1986, aby odpovídal mezinárodní nomenklatuře sacharidů a zároveň odrážel fakt, že se tato látka může vyskytovat v různých formách, jak ve formě kyseliny tak i její soli. V těle se nevyskytuje jako kyselina nýbrž jako polyanion [1].

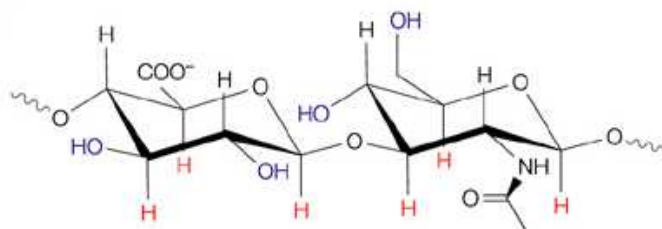
#### 2.1.1 Chemická struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid náležící do skupiny látek známých jako glykosaminyglykany. Je vytvořený z opakujících se disacharidických jednotek. Tato jednotka obsahuje kyselinu D-glukuronovou a N-acetyl-D-glukosamin. Mezi těmito složkami se vyskytují dva typy  $\beta$ -glykosidických vazeb a to 1-3 a 1-4 [2].



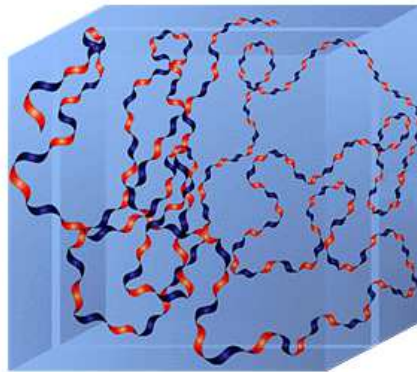
**Obr. 1** Spojení disacharidických jednotek v kyselině hyaluronové  $\beta$ -glykosidickou vazbou (a) 1 $\rightarrow$ 3 (b) 1 $\rightarrow$ 4 [3]

Obě cukerné jednotky jsou prostorově podobné glukóze, u které v  $\beta$ -konfiguraci zaujímají objemnější skupiny stericky příznivější ekvatoriální polohy, zatímco všechny vodíky zaujímají polohu axiální.



**Obr. 2** Struktura hyaluronanu – prostorové uspořádání funkčních skupin [4]

Toto uspořádání molekulu stabilizuje a zároveň takto uspořádané vodíky vytváří hydrofobní oblasti a postranní řetězce oblasti hydrofilní. Tyto oblasti mají vliv na strukturu hyaluronanu ve fyziologických roztocích, ve kterých se molekula hyaluronanu stáčí a tvoří strukturu připomínající stuhu [1].



**Obr. 3** *Struktura hyaluronanu v roztoku [5]*

Hyaluronan syntázy (viz kapitola 2.1.3) jsou schopny vytvořit dlouhý lineární řetězec, jehož počet disacharidických jednotek může dosáhnout až deseti tisíc. Molekulová hmotnost tak může dosáhnout 4 milionů Da (jelikož molekulová hmotnost jedné disacharidické jednotky činí 400 Da), což představuje řetězec dlouhý až 10  $\mu\text{m}$  při průměrné délce disacharidu 1 nm. V případě, že by se hyaluronan rozpínal po celé své délce, rovnala by se jeho délka přibližně průměru délky lidského erytrocytu [6].

### **2.1.2 Výskyt a funkce**

Hyaluronan je v různé míře přítomen téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních všech obratlovců. Také je obsažen v kapsulích (vnější ochranná vrstva) některých bakterií. Naopak u hub, rostlin a hmyzu se tento polysacharid nevyskytuje vůbec.

V organismu se hyaluronan vyskytuje v různých formách a plní také různé funkce. Může hrát roli plniva, iontově výměnného filtru, promotéra buněčné migrace. Podílí se na embryonálním vývoji či hraje důležitou roli v hojení a regeneraci tkáně.

V lidském těle se hyaluronan vyskytuje například v extracelulární matrix (vysokomolekulární hyaluronan), kde slouží jako strukturní podpora a scaffold („lešení“) pro diferenciaci tkání a buněk. Dále se nachází ve sklivci, kde je hlavní stavební jednotkou či v synoviální tekutině, ve které slouží jako lubrikant a zároveň pomáhá tlumit nárazy. Největší množství hyaluronanu v našem těle obsahuje kůže, ve které se nachází přibližně polovina z celkového množství [6].

### **2.1.3 Metabolismus**

Metabolismus hyaluronanu je dynamický. Existují i buňky, které syntetizují hyaluronan po celou dobu svého života, jako například chondrocyty v chrupavkách. Metabolické studie ukázaly, že poločas rozpadu takto syntetizovaného hyaluronanu je 2-3 týdny, avšak u keratinocytů v epidermis je to méně než jeden den [5].

Hyaluronan je přirozeně syntetizován v buňkách Golgiho aparátu pomocí tří integrálních membránových proteinů zvaných *hyaluronan syntázy*. U obratlovců se vyskytují tři typy těchto proteinů: HAS1, HAS2 a HAS3.

U savců je pak enzymatická degradace hyaluronanu výsledkem aktivity tří typů enzymů: hyaluronidázy,  $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázy. Obecně lze říci, že hyaluronidáza štěpí vysokomolekulární hyaluronan na menší oligosacharidy a zbylé dva enzymy se podílí na degradaci oligosacharidových fragmentů. Působení produktů degradace hyaluronanu má za následek zvýšení tkáňové permeability, proto se využívá hyaluronan ve spojení s jinými léky k urychlení jejich rozptýlení, jako je tomu například v oční chirurgii, kde je použit v kombinaci s lokálními anestetiky. Tohoto faktu využívají i některé bakterie, které produkují hyaluronidázu, aby zvýšily svou mobilitu skrz tělesné tkáně [1].

#### 2.1.4 Výroba

Původně byla HA izolována z mnoha různých zdrojů – sklivce, pupeční šňůry, kohoutích hřebínků apod. Extrakce hyaluronanu z kohoutích hřebínků čelila však námitkám na používání látek živočišného původu v biomedicínských a farmaceutických aplikacích. Proto byla vyvinuta mikrobiální fermentace jako alternativní způsob výroby. První takto komerčně vyrobená HA byla z bakterie kmene *Streptococcus zooepidemicus*, který zůstává stále běžně používaným kmenem [7].

#### 2.1.5 Využití

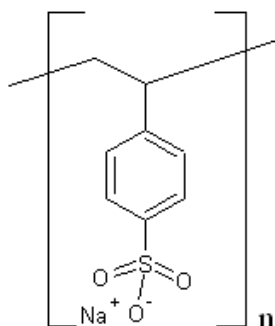
Kyselina hyaluronová, stejně tak jako její rozkladné produkty, je užívána v různých oblastech medicíny. Biologické vlastnosti fragmentů se liší od jejich větších prekurzorů. Vysokomolekulární HA vykazuje protizánětlivé, antiangiogenní a imunosupresivní vlastnosti, naopak středně velké fragmenty jsou angiogenní a imunostimulační. Tato rozmanitá řada vlastností závisející na počtu disacharidických jednotek, umožňuje užívat HA v různých lékařských aplikacích (tkáňové inženýrství, cílená distribuce léčiv, kvalitnější hojení ran atd.), k čemuž přispívá i její biologická odbouratelnost, biokompatibilita a hydratační účinky.

Kyselina hyaluronová a její deriváty se využívají k ochraně citlivé tkáně, k vyplnění a rozšíření tkáňových prostor, k oddělení pojivových tkání při zraněních, čímž se zabraňuje jejich adhezi a předchází se tvorbě nadměrných jizev, k ochraně zdravé i zraněné tkáně proti vlivu sucha a škodlivých faktorů a v neposlední řadě k náhradě a doplnění tkáňových tekutin (například doplnění poškozené synoviální tekutiny u artritických pacientů prostřednictvím intra-artikulárních injekcí) [6].

Z dalších konkrétních příkladů využití můžeme zmínit dermatologii a plastickou chirurgii, ve které se hyaluronanem vyplňují vrásky či rty a používá se také při obnově hlasivek [8]. V oftalmologii je hlavní využití náhrada tekutiny v sklivci oka ztracené například během operace šedého zákalu. Používá se také k léčbě poruch očního povrchu či v kombinaci s jinými molekulami, pokud potřebujeme do oka dostat i jinou léčivou látku k léčbě infekcí [9].

## 2.2 Polystyrensulfonyl sodný

Polystyrensulfonyl sodný je hydrofilní iontový polymer, který je velmi dobře rozpustný ve vodě a nerozpustný v nižších alkoholech.



**Obr. 4** Monomerní jednotka polystyrensulfonylu sodného [10]

V pevné formě se vyskytuje jako jemný prášek bílé či krémové až světle hnědé barvy. Bod tání je 450 °C a jeho hustota při 25 °C nabývá hodnoty 0,801 g·cm<sup>-3</sup>. Připravován bývá polymerizací či kopolymerizací styrensulfonylu či sulfonyl polystyrenu [11,12].

Své uplatnění našel polystyrensulfonyl především v lékařství, kde se používá k léčbě hyperkalemie, což je porucha homeostaze draslíku, při níž je jeho koncentrace v plazmě zvýšená nad hranici normy, tedy nad 5,3 mmol·dm<sup>-3</sup>. Při této nemoci je nejohroženějším orgánem srdce, může také nastat zvýšená nervosvalová dráždivost či celková paralýza [13].

Podstatou využití polystyrensulfonylu je v tomto případě proces částečného uvolňování iontů sodíku, které jsou nahrazeny ionty draslíku – plní tedy funkci iontoměniče. Tento proces je uskutečňován při průchodu intersticiálním traktem, převážně však v tlustém střevě. Průběh je relativně pomalý, může trvat hodiny až dny a jeho efektivita se pohybuje okolo 33%. Pacientům je lék podáván ve formě suspenze perorálně nebo rektálně [12].

V současné době se zkoumá využití polystyrensulfonylu také jako antikoncepčního prostředku a zároveň mikrobicidu. Mikrobicid je chemický prostředek, který je používán ženou a zabíjí, neutralizuje nebo blokuje virus HIV a další patogeny [14]. Kromě toho je antimikrobiálně aktivní také proti lidskému papillomaviru či oparu. V preklinických studiích bylo zjištěno, že polystyrensulfonyl inhibuje spermie a brání pronikání děložního hlenu do hrdla. Ukázalo se také, že polystyrensulfonyl vykazuje antikoncepční účinek po několik hodin [15].

## 2.3 Koloidní disperzní systémy

Disperzní soustava je systém, který tvoří dvě části, přičemž jedna část je disperzní podíl, který je rozptýlen ve formě částic ve spojitěm prostředí nazývajícím se disperzní prostředím. V roztocích je zastoupeno disperzní prostředí rozpouštědlem a disperzní podíl rozpuštěnou látkou. Povaha disperzního systému je určována řadou faktorů. Jedná se hlavně o velikost rozptýlených částic či jejich tvar, počet fází v systému, interakce mezi částicemi a okolním prostředím, vzájemné interakce mezi částicemi a také povrchové a elektrické vlastnosti částic.

Disperzní systémy jsou na základě velikosti částic rozdělovány do několika skupin, mezi kterými je však plynulý přechod [16].

- analyticky disperzní systémy – systémy s nejmenšími částicemi (do 1 nm) jsou roztoky nízkomolekulárních látek, ve kterých jsou disperzním podílem molekuly či ionty.
- koloidně disperzní systémy – systémy obsahující částice v rozmezí od 1 nm do 1  $\mu\text{m}$
- mikrodisperze – systémy s velikostí částic od 1  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$
- makrodisperze – systémy obsahující částice pozorovatelné již pouhým okem (nad 10  $\mu\text{m}$ )

Částice koloidního disperzního systému vykonávají slabší tepelný pohyb než částice v analytických disperzích, ale intenzivnější než v hrubých. Intenzita tohoto pohybu roste se stupněm disperzity, jelikož roste počet částic a tím i počet vzájemných srážek. Částice vyvolávají malý osmotický tlak, který rovněž roste s rostoucím stupněm disperzity.

Koloidní systémy mají také charakteristickou schopnost – tvořit gely, což jsou systémy s trojrozměrnou sítí vytvářející souvislou strukturu, která prostupuje celým disperzním prostředím. Disperzní prostředí i disperzní podíl jsou zde spojitě.

Koloidní disperzní soustavy můžeme dále rozdělit [16]:

- Lyofobní disperze (koloidní disperze) – heterogenní systémy, ve kterých disperzní prostředí a disperzní podíl představují dvě různé fáze. Tyto fáze jsou od sebe odděleny fázovým rozhraním, které má výrazný vliv na jejich vlastnosti. Takovéto systémy mohou vznikat disperzací z makrofág či kondenzací z pravých roztoků.
- Lyofilní koloidy (koloidní roztoky) – homogenní koloidní systémy, ve kterých disperzní podíl s disperzním prostředím tvoří jednu fázi. Jsou to pravé roztoky makromolekul, které jsou stále a vznikají samovolným rozpouštěním. Tento samovolný vznik je podmíněn afinitou makromolekul k disperznímu prostředí.
- Asociativní (micelární) koloidy – systémy vznikající samovolnou reverzibilní asociací nízkomolekulárních látek s amfifilní strukturou v pravém roztoku. Mezi vzniklými asociáty a molekulami v roztoku se ustavuje rovnováha.

## 2.4 Asociační procesy

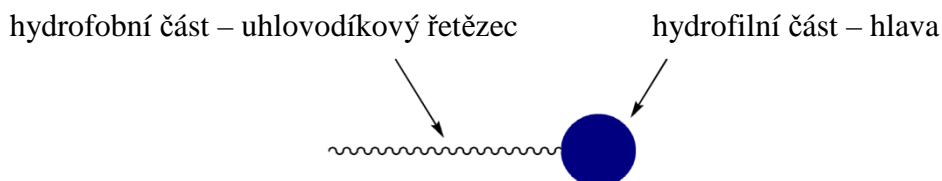
### 2.4.1 Asociativní (micelární) koloidy

Pokud zvolíme vhodné rozpouštědlo, poskytne nám určitá skupina nízkomolekulárních látek ve velkém zředění pravé roztoky. Pokud koncentrace těchto látek překročí určitou hranici, začnou utvářet částice koloidních rozměrů. Tyto polymolekulární částice se nazývají micely a látky, které se takto v roztocích chovají, jsou označovány jako micelární či asociativní koloidy.

Tyto systémy bývají označovány jako lyofilní. Od lyofobních systémů se liší tím, že nevyžadují umělou stabilizaci. Koncentrace i fyzikální vlastnosti micel jsou určovány okamžitými stavovými veličinami (teplotou, tlakem, vlastní koncentrací i koncentrací přidaných látek) a nezávisí na historii soustavy, ale jsou určeny okamžitým stavem. Asociativní koloidy jsou reverzibilní soustavy [17].

## 2.4.2 Molekulární struktura asociativních koloidů

Aby molekula byla schopna vytvářet micely, musí mít určitou strukturu. Je vyžadováno, aby molekula obsahovala dvě části a to lyofilní a lyofobní. Lyofilní část molekuly je nositelem rozpustnosti v daném prostředí a vykazuje velkou afinitu k rozpouštědлу. Lyofobní část je naopak v daném prostředí nerozpustná. Látky, které mají tuto strukturu, se nazývají amfifilní neboli tzv. tenzidy.



**Obr. 5** Amfifilní molekula

Molekula, jež tvoří micely ve vodném prostředí, obsahují hydrofobní nepolární část (uhlovodíkový řetězec) a silně hydrofilní polární skupinu, která je schopná zajistit rozpustnost ve vodě. Většinou se jedná o povrchově aktivní látky (PAL).

Podle schopnosti koloidních povrchových látek podléhat elektrolytické disociaci, je můžeme rozdělit do několika skupin. Do skupiny ionogenních tenzidů řadíme látky, které jsou schopny disociace a dále je dělíme na aniontové a kationtové. Skupina neionogenních tenzidů zahrnuje látky neschopné elektrolytické disociace [17].

## 2.4.3 Kritická micelární koncentrace

Velmi zředěné roztoky micelárních koloidů vytvářejí tzv. pravé roztoky, které jsou charakteristické závislostí fyzikálních veličin na koncentraci. Při určité koncentraci na křivkách nastává výrazný zlom, ve kterém dochází k prudké změně fyzikálně-chemických vlastností roztoku. Koncentrace, při které dochází ke zlomu, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC).

CMC nám určuje koncentraci, v níž v systému dochází k agregaci molekul rozpuštěné látky do útvarů koloidních rozměrů, které nazýváme micely. Tato koncentrace je také nejvyšší možná, při níž se ještě v roztoku vyskytuje rozpuštěná látka ve formě molekul.

Tvorbu micel lze také charakterizovat pomocí tzv. agregačního či asociačního čísla, které nám udává, z kolika jednotlivých molekul se výsledná micela skládá [16].

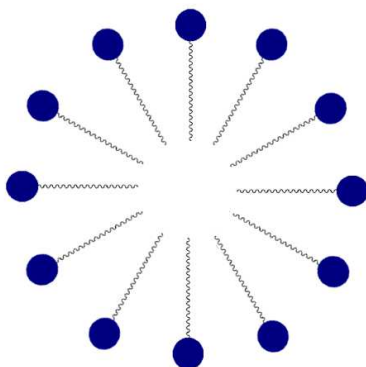
CMC může být stanovena pomocí koligativních vlastností, které jsou určeny počtem disperzních částic v objemové jednotce. Mezi koligativní vlastnosti patří například osmotický tlak, snížení bodu tání či zvýšení bodu varu. Pokud je překročena CMC, osmotický tlak stoupá se závislostí na koncentraci mnohem pomaleji, než v roztoku jehož koncentrace je nižší než CMC. Po překročení mezní hranice koncentrace vykazují zlomovou změnu i jiné vlastnosti jako povrchové napětí, molární vodivost anebo rozptyl světla.

U roztoků s vyšší koncentrací se v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech vyskytuje i druhý zlom, což naznačuje, že jsou v roztoku přítomny i micely jiného než kulovitého tvaru [17].

## 2.4.4 Struktura micel

### 2.4.4.1 Micely ve vodném prostředí

Existence micel byla potvrzena mnoha experimentálními postupy, ale v určení jejich tvaru mělo zásadní vliv měření optických vlastností, konkrétněji pomocí rozptylu světla. Takto bylo dokázáno, že ve vodných roztocích vznikají tzv. Hartleyovy neboli sférické micely. Tyto micely jsou kulovité agregáty, v nichž uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř (aby jejich kontakt s vodou byl minimální) a tvoří tak jádro micely a jejichž polární skupiny směřují do rozpouštědla (Obr. 6)[16].

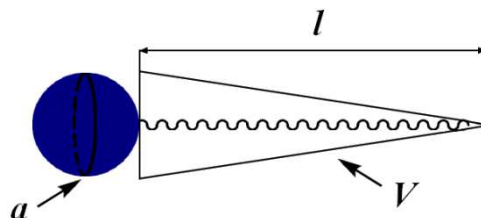


*Obr. 6* Struktura sférické (Hartleyovy) micely

Kromě rozpouštědla má vliv na agregaci také molekulární struktura samotné amfifilní molekuly. Vznikající agregát je ovlivňován vzájemným poměrem velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části. Tento poměr je vyjádřen pomocí bezrozměrné veličiny, která se nazývá kritický agregační parametr (the critical packing parameter – CPP).

$$\text{CPP} = \frac{V}{a \cdot l}, \quad (1)$$

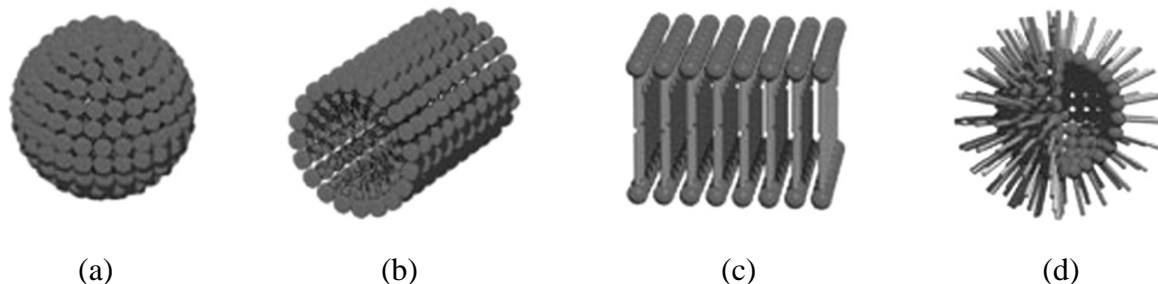
kde  $V$  představuje objem hydrofobní části molekuly, který zaujímá v prostoru,  $a$  je plocha povrchu hydrofilní hlavy, kterou zaujímá na rozhraní agregátu a  $l$  je délka hydrofobního řetězce.



*Obr. 7* Grafické znázornění kritického agregačního parametru

V závislosti na velikosti CPP mohou vznikat v roztoku [18]:

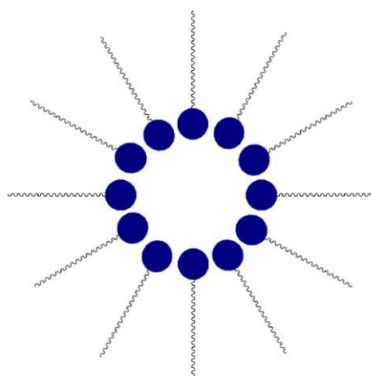
- sférické micely –  $CPP < \frac{1}{3}$  (Obr. 8a)
- válcovité micely –  $\frac{1}{3} < CPP < \frac{1}{2}$  (Obr. 8b)
- laminární micely –  $CPP \approx 1$  (Obr. 8c)
- reverzní micely –  $CPP > 1$  (Obr. 8d)



**Obr. 8** Přehled morfologie dalších možných agregátů [19]

#### 2.4.4.2 Reverzní obrácené micely

V nevodném prostředí se v některých případech mohou tvořit tzv. obrácené neboli reverzní micely (Obr. 9). Na rozdíl od micel ve vodném prostředí je jejich jádro tvořeno polárními skupinami, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ze středu ven a jsou v kontaktu s nepolárním prostředím. CMC u takovýchto systémů je těžké definovat, jelikož k přechodu z pravého roztoku na koloidní dochází v širokém intervalu koncentrací [16].



**Obr. 9** Reverzní (obrácená) micela

#### 2.4.5 Solubilizace

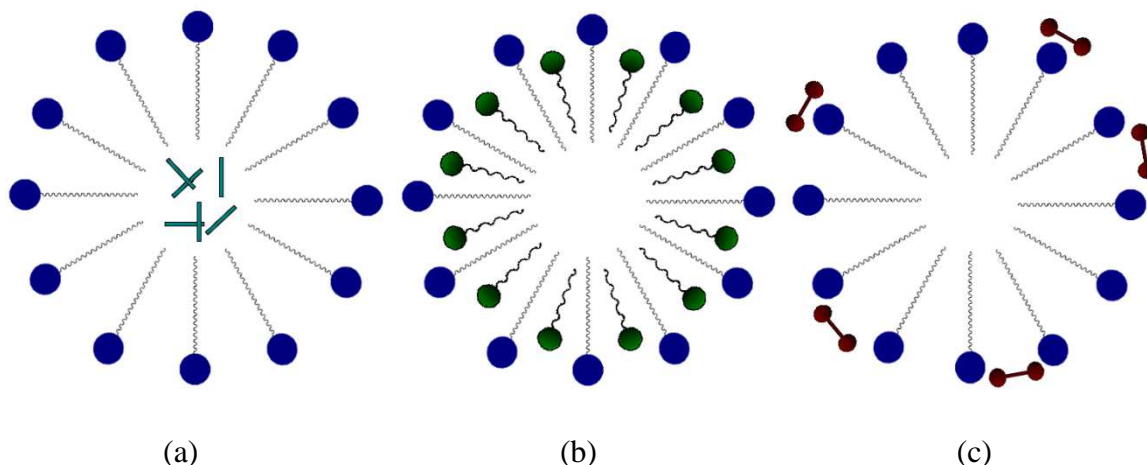
Solubilizace je významnou vlastností asociativních koloidů, která úzce souvisí se stavbou micel. Tato schopnost umožňuje rozpouštět i látky, které jsou v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Solubilizaci lze pozorovat jen, pokud je koncentrace micelárního koloidu vyšší než kritická micelární koncentrace.

Proces solubilizace je založen na tom, že solubilizovaná látka je včleňována do micely. Mechanismus tohoto procesu se liší podle molekulární struktury rozpouštěné látky. Nepolární látky se ve vodném prostředí rozpouštějí v jádru micel (Obr. 10a). Amfifilní látky



(surfaktanty) se v micely umísťujú tak, že jejich polární skupiny směřují vně micely, tedy do vodné fáze, a uhlovodíkové řetězce dovnitř jádra micely (Obr. 10b). Solubilizace polárních látek se uskutečňuje na povrchu micely nebo v její těsné blízkosti (Obr. 10c).

Význam solubilizace je praktický, jelikož se tento jev uplatňuje při detergentci, která je podstatou praní a mytí [16].



**Obr. 10** Solubilizace (a) nepolárních látek (b) kosurfaktantů (c) polárních látek

## 2.4.6 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Další látky, které jsou schopny utvářet koloidní systémy, jsou makromolekuly. Zde však nejsou disperzní částice tvořeny shlukem jednotlivých malých molekul, jako je tomu v případě asociativních koloidů, avšak jednotlivými molekulami koloidních rozměrů. V těchto tzv. lyofilních koloidech se tedy jedná o útvary, které jsou vázány chemickými valenčními silami.

U vysokomolekulárních látek závisí vlastnosti nejen na rozměrech, ale i na struktuře molekul a jejich tvaru. Dle tvaru mohou být vysokomolekulární látky rozděleny na lineární či větvené polymery, nekonečné síťovité struktury a globulární makromolekuly. Z těchto uvedených sloučenin jsou schopny tvořit koloidní roztoky pouze lineární a globulární polymery. Jako globulární jsou označovány trojrozměrné molekuly, které mají omezené rozměry.

### 2.4.6.1 Roztoky vysokomolekulárních neelektrolytů

Molekula lineárního polymeru může v roztoku vlivem tepelného pohybu nebo působením vnějších sil měnit svůj tvar. Toto otáčení je dovoleno otáčivostí členů uhlíkového řetězce kolem spojnic se sousedními uhlíky. Tvar, který touto cestou vzniká, se nazývá makromolekulární klubko.

Ve zředěných roztocích jsou od sebe makromolekuly dostatečně vzdáleny, takže prostor mezi nimi a mezi makromolekulárními klubky je vyplněn molekulami rozpouštědla. V roztoku se pak nacházejí různě svinuté řetězce, jejichž konformace se mění s časem. Stupeň svinutí makromolekuly závisí na interakci s rozpouštědlem a také na interakcích mezi řetězci.

Dle interakcí mezi rozpouštědlem a vysokomolekulární látkou můžeme rozpouštědla rozdělit na:

- dobrá – objem klubka se zvětšuje, jelikož se makromolekula snaží vystavit působení rozpouštědla co největší svou část
- špatná – klubko je co nejvíce svinuté, jelikož molekula upřednostňuje vazby mezi jednotlivými řetězci
- indiferentní (théta) – makromolekuly se navzájem neovlivňují

V roztocích s větší koncentrací dochází k propletení jednotlivých řetězců, čímž vzniká spojitá avšak řídká struktura. Tento systém představuje přechod ke gelům [16].



**Obr. 11** Roztoky vysokomolekulárních látek (a) zředěný roztok, (b) koncentrovaný roztok [17]

#### 2.4.6.2 Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Vysokomolekulární elektrolyty (polyelektrolyty) jsou látky, které jsou schopny disociace, protože obsahují ionogenní skupiny. Dle těchto skupin je můžeme rozdělit do několika skupin:

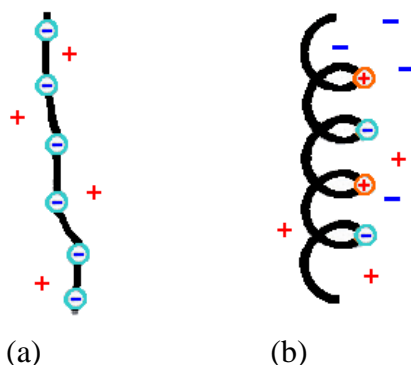
- kyselé – obsahující kyselé skupiny (např.  $-\text{OSO}_3^-$ ; zde patří i kyselina hyaluronová obsahující karboxylové skupiny)
- bazické – obsahující zásadité skupiny (např.  $-\text{NH}_3^+$ )
- amfoterní – obsahující jak kyselé tak i zásadité skupiny.

Chování elektrolyticky disociujících makromolekul v roztoku ovlivňují kromě mezimolekulárních disperzních sil také síly elektrostatické. Nenachází-li se v roztoku jiný elektrolyt než vysokomolekulární, je vliv elektrostatických sil značně velký. Je však oslabován přidávkem malého množství nízkomolekulárního elektrolytu.

Pokud lineární makromolekuly obsahují pouze náboje stejného znaménka, mají malou tendenci svinovat se v klubko. Ve zředěných roztocích se pak spíše vyskytují ve formě nataženého řetězce, což je způsobeno odpuzivými silami mezi souhlasně nabitými skupinami.

Amfoterní látky, u kterých se pravidelně střídají kladné a záporné náboje mají tendenci se svinovat do spirálovitého útvaru.

Nízkomolekulární ionty přítomné v roztoku mají vliv na tvar makromolekul a to jak u látek obsahujících pouze jeden náboj tak i u látek amfoterních.



**Obr. 12** Struktura vysokomolekulárních elektrolytů (a) makromolekula se souhlasnými náboji, (b) amfoterní makromolekula [16]

## 2.5 Základy absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti spektra

Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti se za období svého užívání stala jedním z nejdůležitějších analytických nástrojů v moderní laboratorní praxi. V mnoha aplikacích mohou být použity jiné techniky, avšak žádná nemůže konkurovat UV-VIS spektrofotometrii v jednoduchosti, univerzálnosti či rychlosti [20].

Proto jsou také UV-VIS spektrofotometry volbou většiny laboratoří, které se zabývají identifikací či měřením organických i anorganických látek v široké škále produktů a procesů, jako například nukleových kyselin, bílkovin, potravin, léčiv či hnojiv [21].

### 2.5.1 Princip absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti

V molekulární absorpční spektrofotometrii se měří množství absorbovaného ultrafialového (UV) či viditelného (VIS) záření zředěnými roztoky molekul. Touto metodou tedy zjišťujeme do jaké míry a které vlnové délky jsou roztokem pohlcovány.

Podmínkou pro absorpci záření ve viditelné nebo dlouhovlnné části ultrafialového spektra je přítomnost elektronů s dostatečně nízkou excitační energií. Tyto elektrony absorpcí fotonu přijímají energii, díky které dochází k excitaci elektronu na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Takto se vytváří velmi blízké absorpční čáry ve spektru splývající v pás. Absorpční spektra v těchto oblastech jsou proto svou podstatou elektronová a funkční skupina obsahující tyto elektrony se nazývá *chromofor* [22].

### 2.5.2 Základní vztahy

Pokud na kyvetu, která obsahuje roztok absorbující látky, dopadá zářivý tok  $\Phi_0$ , poté prošlý zářivý tok  $\Phi$  poklesne na nižší hodnotu. Toto zeslabení je zapříčiněno odražením, rozptýlením a pohlcením (absorpcí) světla.

#### 2.5.2.1 Transmittance

Transmittance je vyjádřením relativní části prošlého záření. Pokud jsou zanedbány ztráty vzniklé odrazem a rozptýlením na stěnách kyvety, pak je transmittance vyjádřena jako poměr

prošlého a dopadajícího zářivého toku. Označuje se písmenem  $T$  a často je uváděna v procentech.

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \text{ nebo také } T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \cdot 100(\%). \quad (2)$$

### 2.5.2.2 Absorbance

Absorbance neboli extinkce je záporným dekadickým logaritmem převrácené hodnoty transmittance. Pokud je absorpce roztoku rovna nule, je nulová i absorbance. Transmittance je v tomto případě naopak jednotková (100%)[22].

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (3)$$

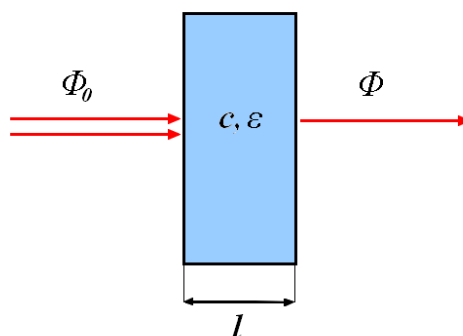
### 2.5.2.3 Lambert-Beerův zákon

Dle Lambert-Beerova zákona je absorbance roztoku přímo úměrná koncentraci absorbující látky v roztoku a tloušťce absorbující vrstvy. Tato závislost může být vyjádřena rovnicí ve tvaru

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l, \quad (4)$$

kde  $c$  představuje látkovou koncentraci,  $l$  tloušťku absorbující vrstvy a  $\varepsilon_\lambda$  je molární absorpční koeficient (Obr. 13)[23].

Absorpční koeficient je veličina charakteristická pro danou látku v daném prostředí a je závislá také na vlnové délce, při které je prováděno měření. Absorbance je veličina, která se řadí mezi aditivní. Je-li světlo absorbováno v roztoku více složkami, je konečná absorbance rovna součtu jednotlivých absorbancí [22].



**Obr. 13** Znáznornění absorpce světelného paprsku při průchodu květou

Lambert-Beerův zákon je platný pouze za určitých podmínek. Platí pouze pro monochromatické záření a zředěné roztoky o koncentracích řádově menších než  $10^{-2}$  M. Dále musí být v roztoku pouze jedna absorbující složka [24].

### 2.5.3 Absorpční křivky

Absorpční křivky jsou vyjádřením závislosti absorbovaného nebo propuštěného světla na vlnové délce, kmitočtu či vlnočtu. Obvyklým záznamem je křivka závislosti absorpance na vlnové délce.

$$A = f(\lambda) \quad (5)$$

Na absorpční křivky má vliv mnoho různých faktorů. Mezi tyto faktory patří například teplota, která se projevuje nejvíce ve zředěných roztocích. Poté má vliv iontová síla roztoku, vlivem které mohou být změněny tvary absorpčních křivek. Působením rozpouštědla může docházet k hypsochromnímu či bathochromnímu posunu. U hypsochromního efektu dochází k posunu vlnové délky absorpčního signálu směrem k menším vlnovým délkám. U bathochromního efektu dochází k posunu opačným směrem. Absorpční spektra jsou také ovlivňována přítomností tenzidů, která způsobuje posun  $\lambda_{\max}$  a vzrůst molárního absorpčního koeficientu [25].

## 2.6 Luminiscenční spektrometrie

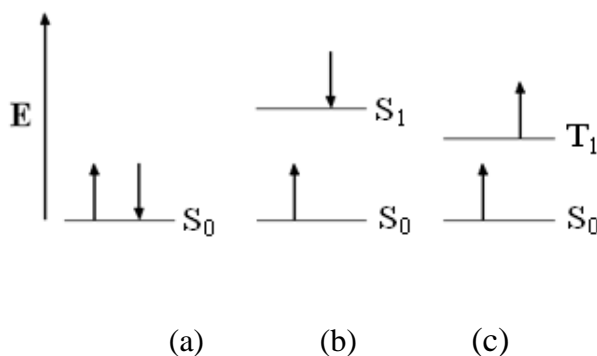
Termín *luminiscence* pochází z latinského slova *lumen*, což znamená v překladu světlo. Tento pojem označuje vlastnost látky uvolňovat energii emitováním světelného záření. Podle povahy absorbované energie můžeme luminiscenci rozdělit na fotoluminiscenci (energie byla absorbována ve formě světelného záření), chemiluminiscenci (energie byla dodána chemickou reakcí), bioluminiscenci (energie byla dodána prostřednictvím biologických pochodů) a elektroluminiscenci (energie byla dodána působením elektrického pole). Z hlediska analytického využití má největší význam fotoluminiscence [26].

### 2.6.1 Fotoluminiscence

Základem je skutečnost, že při absorpci primárního záření přechází elektron ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu. Během přesunu elektronu z excitovaného stavu zpátky do základního, tzv. deexcitace, dochází k produkci světelného záření systému. Při fotoluminiscenci je excitace iniciována UV, IR či viditelným zářením.

Alexandr Jabloňski roku 1953 sestavil diagram, který popisuje jevy probíhající při fluorescenci doprovázené různými energetickými přechody z jednotlivých hladin, které nazval singlety a triplety [27].

Singletový stav je, když dva elektrony tvořící pár mají opačný spin a tripletový stav je, když tyto elektrony mají shodný spin.



**Obr. 14** Základní singletový (a), excitovaný singletový (b) a excitovaný tripletový stav (c)

Fotoluminiscenci dělíme na dva samostatné jevy – *fluorescenci* a *fosforescenci*, a to dle toho, z jakého excitovaného stavu se elektron navrací do stavu základního.

### 2.6.1.1 Fluorescence

Poprvé popsal jev fluorescence roku 1842 Sir George Gabriel Stokes. Pojmenoval tak luminiscenci, kterou pozoroval při použití minerálu, který se nazývá fluorit (kazivec), odtud název *fluorescence*. Krátce nato po něm objevil Sir John Frederick Wiliam Herschel fluorescenci v roztoku chininu [27].

*Fluorescence* patří mezi zářivé přechody, při kterých se excitovaná molekula navrací do původního stavu za vyzáření fotonu. U fluorescence přechází excitovaný elektron z energeticky vyššího singletového stavu (například  $S_1$ ) do stavu o nižší energii ( $S_0$ ). Při tomto jevu se elektron může navrátit do stavu o nižší energii pouze z nejbližší vibrační hladiny. Tudíž se při tomto procesu uplatňuje i *vibrační relaxace* (přechod z vyšší vibrační hladiny na nižší). Při fluorescenci nedochází ke změně spinu [28].

Vlnová délka emitovaného záření je zpravidla vyšší než záření absorbovaného, má tedy nižší energii. Tomuto jevu se říká Stokesův posun (posun vlnových délek), který je vyvolán nezářivými přechody mezi vibračními hladinami [29].

### 2.6.1.2 Zpožděná fluorescence

Pokud se excitovaný elektron nachází na tripletové hladině a je mu dodána energie, může se navrátit zpět do singletového stavu. Odtud se poté vyzářením fotonu vrací na základní hladinu, jako je tomu při fluorescenci. Tento jev nazýváme *zpožděná fluorescence*, protože je při tomto procesu delší doba dohasínání zapříčiněná setrváním elektronu na tripletové hladině.

### 2.6.1.3 Fosforescence

Pokud dojde v systému k *mezisystémovému přechodu*, což je přechod ze singletového ( $S_1$ ) do tripletového ( $T_1$ ) stavu, může tento excitovaný elektron vyzářit svou přebytečnou energii ve formě fotonu a tím se dostat na singletový základní stav ( $S_0$ ). Tento zářivý přechod se nazývá *fosforescence*. Jelikož má tripletový stav nižší energii než singletový stav, je vyzářená vlnová délka větší, než při fluorescenci.

## 2.6.2 Jabloňského diagram

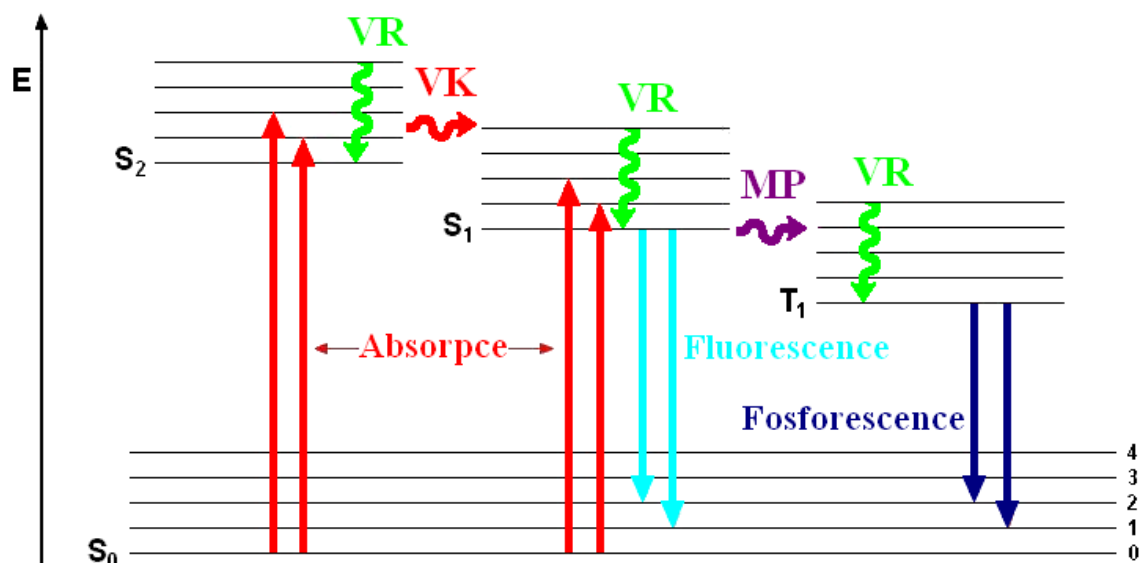
Jabloňského diagram (Obr. 15) názorně ilustruje procesy, které mohou nastat při excitovaných stavech elektronů. Po absorpci světelného kvanta mohou elektrony přecházet ze základního singletového stavu do excitovaných singletových či tripletových stavů. Na rozdíl od přechodu mezi singletovými stavy přechod do stavu tripletového je doprovázen změnou spinu.

K uvolnění energie poté dochází pomocí zářivých i nezářivých přechodů.

K nezářivým přechodům řadíme vnitřní konverzi (VK), mezisystémový přechod (MP) a vibrační relaxaci (VR).

Při vibrační relaxaci dochází k přechodu z vyšší vibrační hladiny na nižší v rámci jedné singletové či tripletové hladiny. Při vnitřní konverzi elektron přechází z vyšší singletové hladiny do nižší a při mezisystémovém přechodu dochází ke změně spinu a elektron přechází z hladiny singletové na tripletovou.

K zářivým přechodům řadíme již zmíněnou fluorescenci, zpožděnou fluorescenci i fosforescenci [28].



Obr. 15 Jabloňského diagram

### 2.6.3 Excitační a emisní spektra molekul

Excitační a emisní spektrum získáme změřením látky, která je schopna luminiscence, za pomoci spektrofluorimetru. Při měření excitačního spektra je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru a při měření emisního spektra je nastavena napevno vlnová délka excitačního monochromátoru. U excitačního spektra se v podstatě jedná o zjednodušené absorpční spektrum měřené látky.

U emisních spekter může být analyt excitován kteroukoliv vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra. Ovlivňováno je také citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce. Emisní spektrum vyjadřuje pravděpodobnost zářivého přechodu z excitovaného stavu v závislosti na emisní vlnové délce [25].

### 2.6.4 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je proces, při kterém dochází ke snížení kvantového výtěžku fluorescence, aniž by se měnilo fluorescenční emisní spektrum. Někdy se spolu s koncentračním zhášením objevuje emisní pás excimerové fluorescence, který je posunut vzhledem k vlnovým délkám fluorescence izolovaných molekul.

Zhášení lze rozdělit na dva typy – *dynamické* a *statické*.

K dynamickému zhášení dochází tehdy, je-li excitovaný fluorofor deaktivován srážkou s molekulou zhášeče a tímto se vrací do základního stavu prostřednictvím nezářivého přechodu. Při tomto procesu nedochází k chemickým změnám. Naopak statické zhášení je doprovázeno chemickou změnou, jelikož se při kontaktu fluoroforu a zhášeče vytváří komplex, který nevykazuje fluorescenci.

Nejčastějším zhášečem fluorescence i fosforescence je molekulární kyslík. Fluorescenci také zhášejí atomy halogenů (bróm, jód)[25].

## Typy zhášení fluorescence [25]

1. **Koncentrační (samo)zhášení fluorescence**  
Od určité hraniční koncentrace (tzv. prahová koncentrace analytu) dochází k poklesu kvantového výtěžku. Tento jev je důsledkem neelastických srážek mezi excitovanými molekulami a molekulami v základním stavu, které záření absorbují, ale neemitují ho. Energie je uvolňována ve formě tepla.
2. **Vnitřní konverze molekul**  
Jako důsledek srážek excitovaných molekul s neexcitovanými nastává disipace energie na nezářivé formy. Ztráty se zvyšují s rostoucí teplotou a jsou také ovlivňovány koncentrací molekul, viskozitou roztoku atd.
3. **Vnitřně filtrační efekt**  
Při tomto procesu dochází k absorpci sekundárního emitovaného záření molekuly v roztoku analytu a nastává překryv excitačního a emisního spektra.
4. **Zhášení emitovaného záření nadbytkem činidla**  
Absorbují-li činidlo (či jiné sloučeniny přítomné v roztoku) při blízké vlnové délce jako fluoreskující látka, dochází k absorpci primárního záření přednostně činidlem. Tedy již nestačí záření pro excitaci produktu analytu.
5. **Strukturní a konfigurační změny molekul (organických)**  
Je-li molekula převedena do tripletového stavu, dochází k tvorbě volného biradikálu s nepárovými elektrony. Tento biradikál je velmi reaktivní. Uskutečňuje se přechod na složitější sloučeniny (dimery, excimery), které nemusí fluoreskovat. Při strukturní a konfigurační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez vyzáření nového záření.
6. **Vliv cizích iontů**  
Pokles kvantového výtěžku může být zapříčiněn i přítomností cizích iontů a látek. Stupeň zhášení v tomto případě roste s polarizovatelností a s rostoucí kovalentní charakteristikou.  
Zhášení anionty:  $F^- < NO_3^- < SO_4^{2-} < ac < (COO)^{2-} < Cl^- < Br^- < SCN^- < I^-$   
Zhášení kationty:  $Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}$  (kationty s vakantními d-orbitaly)  
 $Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} < UO_2^{2+} < Co, Ni < Fe^{3+} < Cu < Cr^{3+}$   
Pohlčení elektronu z excitované hladiny fluoreskujícího chelátu analytu v neobsazeném d-orbitálu má za následek znemožnění návratu excitovaného elektronu na základní hladinu.

### 2.7 Vlastní a nevlastní fluorescence

Fluorescenci lze rozdělit na vlastní a nevlastní. Vlastní fluorescenci lze pozorovat u látek, které obsahují tzv. vlastní nebo vnitřní fluorofory, které se v nich přirozeně nacházejí. U buněk je dána vlastní fluorescence hlavně proteiny, ve kterých jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny (např. tryptofan, fenylalanin či tyrozin).



U nevlastní fluorescence se ke studovanému vzorku, který nemá vhodné fluorescenční vlastnosti, přidává tzv. vnější, neboli nevlastní fluorofor. V případě, že se nevlastní fluorofor váže ke sledované molekule pomocí kovalentní vazby, jedná se o *fluorescenční značky*. Pokud se váže nekovalentně, nazývají se *fluorescenční sondy*. Je důležité, aby kromě specifické vazby nevlastního fluoroforu na substrát, tato vazba nenarušovala funkce biologických systémů. Používají se například ke značení membrán a vizualizaci a identifikaci chromozomů.

### 2.7.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky by měli mít vysokou intenzitu fluorescence a být stabilní při souvislém ozařování.

Nejčastěji jsou používány k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. Fluorescenční značky mají své uplatnění například v imunologii, histochemii či v afinitní chromatografii [30].

Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou fluoresceinizothiokyanát, který se navazuje na sekundární protilátky a je honě využíván při imunofluorescenci [31] a tetrametylrhodaminizothiokyanát používaný jako sekundární barvivo k již zmíněnému fluoresceinizothiokyanátu [32].

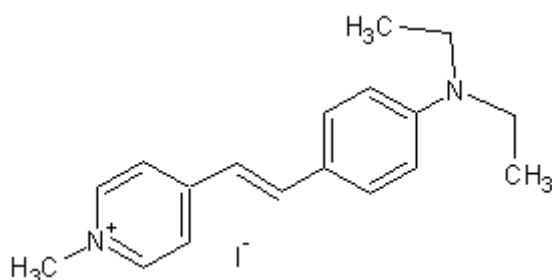
### 2.7.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou látky, které po navázání ke sledované struktuře výrazně mění svůj kvantový výtěžek a někdy i spektrální vlastnosti. Samotné v roztoku bývají málo fluorescenční.

Volba správné fluorescenční sondy je důležitá, jelikož její vlastnosti jsou zásadní při získávání potřebných informací [30].

#### 4-Di-2-Asp

neboli 4-(4-(Diethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium jodid je kationaktivní mitochondriální barvivo oranžové barvy s velkým Stokesovým posunem, které může být použito k obarvení nesynaptických nervových zakončení nezávislých na neuronové aktivitě [33].



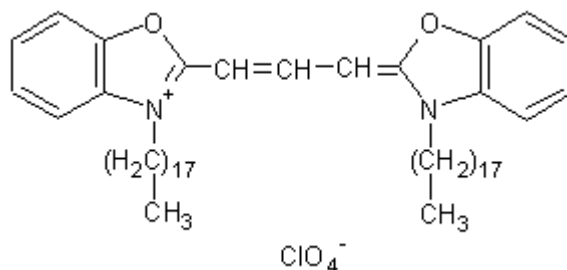
**Obr. 16** Struktura fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp [34]

Aminostyrylpyridiniová barviva se také často používají jako substráty pro funkční analýzu transportů biogenních aminů [35].

## DiO, DiA

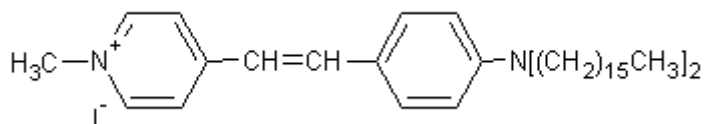
Tyto sondy patří do skupiny lipofilních fluorescenčních barviv, která se používají ke značení buněčných membrán a jiných hydrofobních struktur. Fluorescence těchto na prostředí citlivých barviv je výrazně zvýšena, pokud jsou začleněny do membrán či navázány na lipofilní biomolekuly. Po aplikaci na buňky tato barviva difundují příčně buněčnou membránou, což vede k zbarvení celé buňky v optimální koncentraci [36].

DiO neboli 3,3'-Dioctadecyloxacarbo-cyanine perchlorát je sonda, která je široce využívána jako fluorescenční membránové barvivo. Má obecně nižší difúzní rychlost než sonda DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorát; lipofilní membránové barvivo), se kterou se často společně používá.



**Obr. 17** Struktura fluorescenční sondy DiO [37]

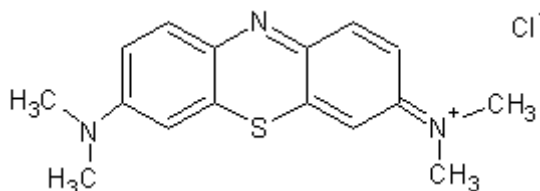
DiA, neboli 4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid označována také někdy jako 4-Di-16-Asp je membránové barvivo, které mnohem rychleji difunduje buněčnými stěnami než DiO. Má velmi široké emisní spektrum a může být detekováno zeleným, oranžovým či červeným filtrem [38].



**Obr. 18** Struktura fluorescenční sondy DiA [39]

## Methylenová modř

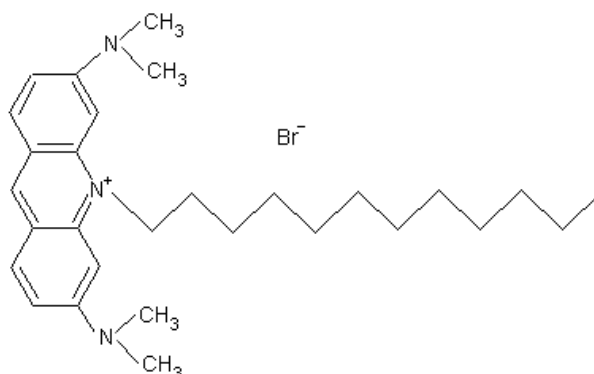
Methylenová modř (MB) je heterocyklická sloučenina, která má mnoho druhů použití v různých oblastech, jak je například biologie či chemie. Při pokojové teplotě se vyskytuje ve formě prášku bez zápachu, který má tmavě zelenou barvu. Po rozpuštění ve vodě vznikne modrý roztok [40].



**Obr. 19** Struktura fluorescenční sondy Methylenová modř [41]

### Dodecyl akridinová oranž

Dodecyl akridinová oranž (DAO) neboli 2,8-bis(dimethylamino)-10-dodecyl-acridinium bromid je kationaktivní fluorescenční sonda amfifilního charakteru.



**Obr. 20** Dodecyl akridinová oranž

### 2.7.3 H a J typ agregace

Shlukování molekul barviv v roztoku či na rozhraní pevné a kapalně fáze je častým jevem v chemii barviv, který vzniká vlivem silných mezimolekulárních van der Waalsových interakcí. Agregáty vzniklé v roztoku vykazují zřetelné změny v absorpčním spektru ve srovnání se spektrem monomeru. U agregátů J-typu dochází k bathochromnímu posunu, a u agregátů H-typu k posunu hypsochromnímu. U bathochromního posunu dochází ke změně spektrálního pásu absorpce, odrazivosti, propustnosti či posunu emisního spektra molekuly k vyšším vlnovým délkám. K této situaci může dojít na základě změny v prostředí, jakou je například změna polarizace. Bathochromní posun je jev pozorovatelný u molekulových spekter. Bathochromní efekt bývá někdy označován jako *červený* posun a hypsochromní jako posun *modrý*. U hypsochromního efektu dochází k posunu maxima absorpce k nižším vlnovým délkám, tedy je zde posun k modré části spektra.

Obecně se ví, že jak H-typ agregátů tak i J-typ se skládají z paralelně uspořádaných molekul barviva tzv. *plane to plane*, tedy rovinami molekul k sobě. H-dimery se seskupují k sobě zrcadlově (tzv. *head to tail*) zatímco J-dimery naopak [42].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp

Již roku 1987 byl uskutečněn pokus, ve kterém byla zhodnocena schopnost 18 kationaktivních mitochondriálních barviv obarvit živá nervová zakončení. Jedním z nejúčinnějších barviv byl 4-Di-2-Asp, jehož podrobnější studie pak prokázaly, že toto barvivo nemá žádný trvalý vliv na strukturu či funkci nervových zakončení [43].

Roku 1998 byla popsána technika, která kombinovala konfokální mikroskopii (ta umožňovala možnost zobrazování prostorových vztahů mezi buňkami) za použití barviva 4-Di-2-Asp a Rhodamin-alphabungarotoxinu k obarvení acetylcholinových receptorů v neuromuskulárních spojích, aby byly lépe pochopeny biologické aspekty vývoje, stárnutí těchto spojů i patologické podmínky jako například poruchy neuromuskulárního přenosu.

Nervová zakončení ve svalech dospělých žijících myší byla zbarvena právě barvivem 4-Di-2-Asp (použití této sondy je omezeno na použití in vivo, jelikož to je „vital-dependent marker“), které označilo v těchto zakončeních části obsahující mitochondrie. V tomto experimentu se ukázalo, že barvivo 4-Di-2-Asp může být použito i ve svalech, které jsou čerstvě odebrány pokusnému zvířeti. Bylo zjištěno, že touto technikou mohou být doplněny stávající vyšetřovací metody anatomie nervových zakončení a také jejich patologie [44].

U myší bylo toto barvivo také použito k zbarvení buněk v plicních neuroepiteliálních orgánech obsahující senzory které se podílí na regulaci dýchání [45]. Barvivo 4-Di-2-Asp ukázalo jasně fluoreskující skupiny buněk v epitelu dýchacích cest [46].

Z dalších využití tohoto barviva můžeme jmenovat obarvení nervových zakončení v králičím epitelu rohovky či v krysím epidermis, u žab a hadů zviditelnění neuromuskulárního spojení jakož i vizualizace inervace lidského choroidu [47](cévnatka - součást oka, vrstva mezi sítnicí a bělimou. Obsahuje krevní cévy vyživující struktury oka a pigment, který absorbuje nadbytek světla a brání tak jeho rozptylu)[48].

Barvivo 4-di-2-Asp bylo také využito při studiu stability a vlastností uvolňování částic biodegradabilní polymléčné kyseliny(PLA), které byly aplikovány na model lidské pokožky. Předmětem studie bylo zjistit, zda může začlenění hydrofilní či lipofilní molekuly zlepšit stabilitu částic PLA na povrchu kůže. Částice PLA byly označeny hydrofilním fluorochromem 4-di-2-Asp a také lipofilním fluorochromem Bodipy 630/650. Byly zkoumány změny morfologie částic po jejich inkubaci na povrchu kůže pomocí elektronové mikroskopie, zatímco fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie byla použita k pozorování penetrace částic do vlasových folikulů a uvolňování fluorochromu. Bylo zjištěno, že částice, na kterých byl navázán Bodipy 630/650 rychle tento fluorochrom uvolňovaly a během několika hodin po aplikaci na povrch kůže měnily svou částicovou morfologii. Částice označené barvivem 4-di-2-Asp naopak udržovaly tvar a konstantně uvolňovaly navázaný fluorochrom po dobu až 16 hodin.

Tyto výsledky ukázaly, že částice PLA, přestože je jejich vodná disperze stálá, ztrácejí při styku s kůží částečně svůj tvar. Stabilita částic by mohla být vylepšena pomocí modifikace chemické struktury a lipofility navázaných fluorochromů. Mohly by tak být připraveny částice PLA s adekvátními fyzikálně-chemickými vlastnostmi vhodnými pro aplikaci léčivých látek navázaných na těchto částicích [49].

### 3.2 Fluorescenční sondy DiO, DiA

Fluorescenční karbocyaninové barvivo DiO (společně s DiI) má rozsáhlou historii použití v buněčné biologii. V 80. letech bylo objeveno, že tato barviva mohou být využita k označení neuronů. Bylo také zjištěno, že hlavním mechanismem translokace těchto molekul je laterální (boční) difúze [50]. Označování neuronů tímto způsobem probíhá ve fixovaných tkáních (chemicky chráněny před rozpadem) přibližně 0,2-0,6 mm za den a v živých tkáních rychleji a to až 6 mm za den díky aktivnímu transportu barviva. Jako indikátor neuronů se DiO používá ve spojení s DiI. Fixované tkáně jsou v některých případech zbarvovány pomocí DiA [51].

Výzkumy ukazují, že DiA je ve vícebarevném označování společně s DiI lepším neuronovým indikátorem než DiO. Difúze DiA je v membránách rychlejší a zároveň je rozpustnější než DiO, což usnadňuje značení buňky [52]. Spojení těchto barviv bylo použito ve studii, která měla za cíl určit, kdy sítnice a primární zraková kůra vytvoří první axon a také kdy se navzájem spojí v průběhu embryonálního vývoje fretky [53].

Pomocí těchto barviv byla také zkoumána interakce mezi skupinou míšních aferentních (přivádějící informace do centrálního nervového systému) axonů a jejich cílovými neurony ve vyvíjející se krysí míše [54].

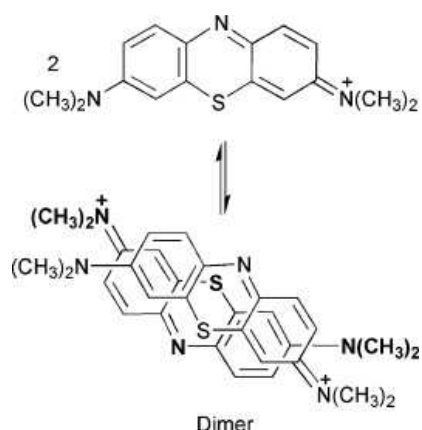
Tým z univerzity Jadavpur v Indii studoval absorpční a fluorescenční spektra DiO ve vodném i nevodném prostředí, ve kterém byl obsažen vaječný fosfatidylcholin (PC), který hrál roli modelové membrány. Disperze lipidů ve vodě tvoří liposomy o jednotné velikosti, což se ukázalo jako ideální pro studium spektrálních, fotofyzikálních a dalších vlastností předpokládaných u lipidových dvojvrstev.

V nevodném prostředí (v cyklohexanu) bylo pozorováno, že se stoupající koncentrací barviva docházelo k mírnému snížení normální (monomerní) fluorescence při 513 nm a objevovalo se nové maximum a to při vlnové délce 548 nm. Tento pás fluorescence je považován za fluorescenci excimeru. V přítomnosti PC bylo pozorováno maximum pouze při 510 nm, což nasvědčuje tvorbě komplexu. Byly změřeny i doby života, které potvrdili existenci jednoho komplexu v přítomnosti PC oproti dvěma formám v jeho nepřítomnosti.

Výsledky této studie tedy prokázaly existenci komplexu barviva (v základním i excitovaném stavu) s PC. Byl také učiněn pokus určit polaritu mikroprostředí pomocí spektrálních studií barviva v PC liposomu nebo uvnitř PC reverzní micely, která se nacházela v prostředí o známé polaritě [55].

### 3.3 Fluorescenční sonda Methylenová modř

Aby bylo porozuměno fotochemickému chování methylenové modři (MB) v případech, kdy interaguje s biomolekulami (zejména s membránami), byly studovány její vlastnosti v systémech obsahujících dodecylsírán sodný (SDS). Z důvodů elektrostatické přitažlivosti se tvoří SDS-MB komplexy, které mění vlastnosti micel i barviva. Měřením povrchového napětí se ukázalo, že CMC SDS klesá v závislosti na vzrůstající koncentraci MB. Přídavek MB tedy usnadňuje vznik micel a CMC je dosaženo při mnohem nižších koncentracích. Tento efekt je nejspíše způsoben tvorbou komplexů mezi SDS a MB. Při nízké koncentraci SDS bylo pozorováno, že absorpční spektrum nabývá maxima při 580 nm, což odpovídá absorpci dimeru. Naopak při větší koncentraci SDS a stejné koncentraci barviva, bylo pozorováno absorpční maximum při 665 nm, které odpovídá monomerní formě.



**Obr. 21** Znáznornění tvorby dimeru methylenové modři [56]

Poměr  $A_{580}/A_{665}$  nám tedy udává kvalitativní odhad koncentrace dimeru ve vzorku. Bylo pozorováno, že tento poměr se zvyšoval s koncentrací SDS až do 3 mM a poté začal klesat. Na přítomnost dimeru lze také usuzovat z poměru maximální intenzity fluorescence  $I_F$  a množství světla absorbovaného při excitační vlnové délce (při 580 nm –  $f_{580}$ ). Poměr  $I_F/f_{580}$  klesá, pokud je přítomen dimer [57].

Portugalský tým vědců se zabýval studií spektra methylenové modři, aby bylo pochopeno její chemické chování. Byla proměřována spektra tohoto barviva ve vodě i ve směsi etanolu a vody, které byly namíchány v různých poměrech. Autoři se snažili prokázat, že absorpční maximum připisované existenci dimeru je ve skutečnosti způsobeno rozdíly v iontové síle roztoků. Tvrdí, že změny spektra methylenové modři jsou způsobeny vlastnostmi prostředí (rozpuštědlo, přítomnost jiných molekul) a že má také vliv struktura solvatačního obalu kolem chromoforu. Bylo pozorováno, že v rozpouštědlech s různou dielektrickou konstantou zůstávali pozice a tvar pásu velmi podobný. U vodného roztoku byla intenzita pásu vždy nižší v porovnání s prostředím obsahující etanol. Takto získané výsledky nepotvrdily existenci dimeru, avšak podpořili teorii vlivu iontové síly na tvar a pozici absorpčních pásů [56].

### 3.4 Fluorescenční sonda DAO

Rešerše se zabývá studiem fluorescenční sondy nonylakridinovou oranž (NAO) místo DAO z toho důvodu, že dostupných informací o DAO sondě je velice málo. Zaměření se na nonylakridinovou oranž vychází ze strukturální podobnosti s dodecylakridinovou oranž.

NAO, která se od DAO liší v délce uhlíkového řetězce pouze o tři uhlíky, se používá k fluorescenční vizualizaci lipozomů a mitochondrií prostřednictvím reakce s kardiolipinem (CL), který se vyskytuje ve vnitřní mitochondriální membráně [58] je zásadní sloučeninou pro detekci apoptózy (typ programované buněčné smrti)[59].

Interakce mezi NAO a CL lze studovat pomocí absorpčních spekter. Při nízkých koncentracích volné NAO má absorpční spektrum své maximum při 495 nm. Na absorpční křivce je patrný pík (maximum při 474 nm), který prezentuje absorpci dimerní formy NAO. Se zvyšující se koncentrací se maximum posouvá směrem k 474 nm, což poukazuje na zvýšenou tvorbu dimeru. I v přítomnosti CL se absorpce NAO při 495 nm snižuje, tedy dochází k vymizení monomerní formy a naopak při 474 nm nabývá maximální hodnoty, tedy se tvoří dimery [60].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

#### *Polyelektrolyty*

Hyaluronan

$M_w=502$  kDa; Contipro Biotech s.r.o., číslo šarže: 170106-D1

Polystyrensulfát sodný

$M_w=1$  MDa; CAS: 25704-18-1; Sigma – Aldrich, číslo šarže: MKAA1218V

#### *Fluorescenční barviva*

DAO: Dodecylakridinová oranž: Acridine orange-10-dodecyl bromide

$M_w=514,59$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS: 41387-42-2; Fluka; čistota ≥ 97 %

4-Di-2-Asp:

$M_w=394,29$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS 105802-46-8; BioChemika (Fluka), for fluorescence, ≥ 97,0%

MB: Methylenová modř

$M_w=319,85$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS 7220-79-3; Sigma – Aldrich

DiA: 4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid

$M_w=758,98$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS 114041-00-8; Sigma – Aldrich, číslo šarže: D4167

DiO: 3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanine perchlorát

$M_w=881,70$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS 34215-57-1; Sigma – Aldrich

#### *Povrchově aktivní látky*

CTAB: Cetyltrimethyl amonium bromid

$M_w=364,46$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS: 57-09-0; SERVA; čistota ≥ 99 %

#### *Další použité chemikálie*

Methanol

$M_w=32,04$  g·mol<sup>-1</sup>; CAS: 67-56-1; Sigma – Aldrich; čistota ≥ 99%

Voda

$M_w=18,015$  g·mol<sup>-1</sup>; voda byla přečištěna pomocí přístroje PURELAB Flex (ELGA LabWater)

### 4.2 Přístroje a zařízení

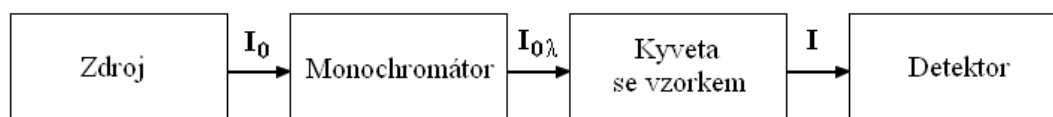
|                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| Analytické váhy           | Denver instrument           |
| Automatické pipety        | Biohit ,Finnpipette, Vitrum |
| Magnetické míchadlo       | Heidolph MR Hei-Standard    |
| Vibrační třepačka         | MS2 Minishaker              |
| UV-VIS Spektrofotometr    | Cary Probe 50, Varian       |
| Luminiscenční spektrometr | Fluorolog HORIBA Jobin Yvon |

#### 4.2.1 UV-VIS Spektrofotometr

Tabulka 1 Parametry – Cary Probe 50

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Zdroj záření             | xenonová lampa       |
| Monochromátory           | Czerny-Turner 0,25 m |
| Rozmezí $\lambda$        | 190 – 1100 nm        |
| Opakovatelnost $\lambda$ | $\pm 0,1$ nm         |
| Max rychlost skenu       | 24000 nm/min         |
| Detektor                 | 2 křemíkové diody    |

UV-VIS spektrofotometr je zařízení používané pro měření elektronových absorpčních spekter. Cary Probe 50 je spektrofotometr, jehož uspořádání je jednopaprskové a skládá se ze zdroje záření, monochromátoru, na němž se získává monochromatické záření (záření o určité vlnové délce), dále kyvety se vzorkem a nakonec detektoru (Obr. 6).



Obr. 22 Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru Cary probe 50

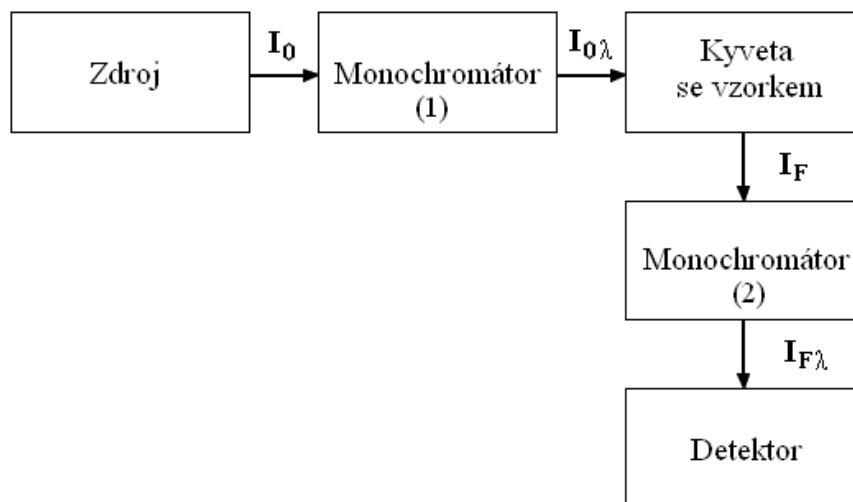
#### 4.2.2 Luminiscenční spektrometr

Tabulka 2 Parametry – Fluorolog HORIBA Jobin Yvon

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| Zdroj záření                    | xenonová lampa             |
| Monochromátory                  | Czerny-Turner              |
| Detektor                        | S1-PMT (R928), PbS, InGaAs |
| Rozmezí detektoru PMT $\lambda$ | 185 – 900 nm               |
| Rychlost skenu                  | 150 nm/s                   |

Polychromatické záření vycházející z primárního zdroje vstupuje do excitačního monochromátoru, kde se vybere záření o vhodné vlnové délce excitace. Dále paprsek o přesně definované vlnové délce prochází křemennou kyvetou se vzorkem, která leží v jeho optické dráze. Dojde k excitaci elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je poté pozorována ve směru kolmém ke směru paprsků primárního záření. Emisní záření následně prochází emisním monochromátorem, kde je vybrána příslušná vlnová délka a pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence (Obr. 22)[18].





*Obr. 23 Schéma jednopaprskového spektrofotometru HORIBA Jobin Yvon*

### 4.3 Příprava zásobních roztoků

#### 4.3.1 Zásobní roztoky hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,999 6 g hyaluronanu o molekulové hmotnosti 502 kDa. Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění tohoto množství byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $0,999\ 6\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 0,403 2 g hyaluronanu o molekulové hmotnosti 502 kDa. Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění tohoto množství byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $4,032\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ze zásobního roztoku  $4,032\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetováno 10 ml. Poté byl roztok doplněn vodou po rysku. Ze zásobního roztoku o koncentraci  $4,032\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byl tak ředěním připraven zásobní roztok o koncentraci  $0,403\ 2\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ze zásobního roztoku  $0,403\ 2\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetováno 10 ml. Poté byl roztok doplněn vodou po rysku. Ze zásobního roztoku o koncentraci  $0,403\ 2\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byl tak ředěním připraven zásobní roztok o koncentraci  $0,040\ 3\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Zásobní roztok polystyrensulfonátu sodného

Na analytických vahách bylo naváženo 1,000 5 g polystyrensulfonátu sodného o molekulové hmotnosti 1 MDa. Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění tohoto množství byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $10,005\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 0,100 6 g polystyrensulfonátu sodného o molekulové hmotnosti 1 MDa. Navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění tohoto množství byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $1,006\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ze zásobního roztoku  $1,006\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetováno 10 ml. Poté byl roztok doplněn vodou po rysku. Ze zásobního roztoku o koncentraci  $1,006\ 0\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  byl tak ředěním připraven zásobní roztok o koncentraci  $0,100\ 6\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Zásobní roztoky fluorescenčních sond

Na analytických vahách bylo naváženo 0,007 9 g fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do plastové odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven vodný roztok sondy 4-Di-2-Asp o koncentraci  $2,003\ 9\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 0,025 9 g fluorescenční sondy DAO. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do plastové odměrné baňky o objemu 25 ml a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn methanolem po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok sondy DAO v metanolu o koncentraci  $2,013\ 3\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 0,006 4 g fluorescenční sondy MB. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do plastové odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění navážky byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl připraven vodný roztok sondy MB o koncentraci  $2,000\ 9\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

U pokusů s fluorescenčními sondami DiO a DiA byly použity již připravené zásobní roztoky. Zásobní roztok DiO byl připraven rozpuštěním 23,7 mg barviva v 250 ml acetonu. Tento zásobní roztok měl tedy koncentraci  $1,075\ 2\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zásobní roztok DiA byl připraven rozpuštěním 5 mg v 250 ml acetonu. Tento zásobní roztok měl tedy koncentraci  $2,635\ 1\cdot 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.3.4 Zásobní roztoky tenzidů

Na analytických vahách bylo naváženo 3,646 3 g tenzidu cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB). Poté bylo toto množství kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněno vodou po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok CTAB o koncentraci  $0,1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ze zásobního roztoku  $0,1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetováno 10 ml. Poté byl roztok doplněn vodou po rysku. Takto byl ředěním připraven zásobní roztok o koncentraci  $0,01\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 4.4 Příprava vzorků

#### 4.4.1 Interakce fluorescenční sondy s polyelektrolytem

Do plastových zkumavek bylo nejdříve napipetováno příslušné množství kyseliny hyaluronové (polystyrensulfonátu sodného) ze zásobních roztoků, poté bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku fluorescenční sondy (4-Di-2-Asp, MB) a nakonec bylo přidáno příslušné množství vody.

Fluorescenční sonda DAO byla přidávána do vzorků jako poslední. Bylo tak učiněno proto, že byl použit methanolvý zásobní roztok, jelikož se sonda velice špatně rozpouštěla ve vodě. Zásobní roztok DAO byl namíchan v takové koncentraci, aby do vzorku byl pipetován co nejmenší objem (10  $\mu\text{l}$ ) a methanol tak co nejméně ovlivňoval zkoumaný systém.

Pokud by byl methanol před namícháním vzorků odpařován, sonda by byla silně sorbována na plastový povrch zkumavek (díky jejímu amfifilnímu charakteru) a výsledná koncentrace DAO ve vzorku by byla odlišná.

U fluorescenčních sond DiO a DiA, které byly rozpuštěny v acetonu, bylo nejdříve do skleněných vialek či plastových zkumavek napipetováno takové množství zásobního roztoku sondy, aby po odpaření rozpouštědla a doplnění vzorku na celkový objem byla konečná koncentrace sondy v roztoku řádově  $10^{-6}$  u DiO a  $10^{-7}$  u DiA. Do takto připravených vialek (zkumavek) byly dále pipetovány další složky vzorku (polyelektrolyt, voda).

Celkový objem každého vzorku činil 4 ml. Konečná koncentrace fluorescenčních sond ve vzorku a také koncentrační rozmezí polyelektrolytu jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3** Přehled koncentrací jednotlivých fluorescenčních sond ve vzorku a koncentračních rozmezí přidávaného polyelektrolytu

| Fluorescenční sonda | Konečná koncentrace sondy ve vzorku [mol·l <sup>-1</sup> ] | Koncentrační rozmezí hyaluronanu [g·l <sup>-1</sup> ] | Koncentrační rozmezí PSSNa [g·l <sup>-1</sup> ] |
|---------------------|--|---|---|
| 4-Di-2-Asp          | $1 \cdot 10^{-5}$  | 0 – 9,5   | 0 – 9,5   |
| MB                  | $1 \cdot 10^{-5}$  | 0 – 9,5   | 0 – 8,2   |
| DAO                 | $5 \cdot 10^{-6}$  | –   | 0 – 8,2   |
| DiO                 | $2,016 \cdot 10^{-6}$                                      | 0 – 1,625   | 0 – 1,238                                       |
| DiA                 | $4,941 \cdot 10^{-7}$                                      | 0 – $5,95 \cdot 10^{-1}$                              | 0 – $3,038 \cdot 10^{-1}$                       |

#### 4.4.2 Interakce systému fluorescenční sonda – polyelektrolyt s tenzidem

Do plastových zkumavek bylo nejdříve napipetováno příslušné množství kyseliny hyaluronové (polystyrensulfony sodného), dále bylo přidáno určité množství zásobního roztoku fluorescenční sondy (4-Di-2-Asp, MB), různé množství tenzidu z odpovídajících zásobních roztoků a nakonec bylo přidáno příslušné množství vody.

Fluorescenční sonda DAO byla i v tomto případě přidávána do vzorků jako poslední.

Celkový objem vzorku byl 4 ml. Konečná koncentrace fluorescenčních sond ve vzorcích byla shodná s koncentracemi uvedenými v tabulce č. 3. Koncentrační rozsah přidávaného tenzidu byl u všech pokusů mezi  $0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 4.5 Měření vzorků

Každé měření bylo třikrát opakováno. Výsledné hodnoty zaznamenané v grafech byly vyhodnoceny pomocí programu EXCEL, ke stanovení směrodatné odchylky byla použita funkce SMODCH. V grafech jsou směrodatné odchylky zobrazeny pomocí chybových úseček.

#### 4.5.1 Měření absorpčních spekter

Pomocí UV-VIS spektrofotometru bylo změřeno absorpční spektrum vzorků obsahujících fluorescenční sondy v rozmezí vlnových délek od 350 nm do 650 nm u DAO a 4-Di-2-Asp a v rozmezí vlnových délek 450 nm až 750 nm u MB. Pomocí absorpčních spekter byly provedeny korekce emisních spekter.

#### 4.5.2 Měření emisních spekter

Pomocí luminiscenčního spektrometru byla změřena emisní spektra fluorescenčních sond 4-Di-2-Asp, MB a DAO při příslušných emisních a excitačních vlnových délkách v různém rozsahu vlnových délek (viz tabulka č. 4). Byl sledován růst a pokles intenzity fluorescence v závislosti na poměru P/D, kde P představuje molární koncentraci vazebných míst pro sondu (koncentrace záporně nabitých skupin na řetězci polyelektrolytu) a D představuje koncentraci fluorescenční sondy.

*Tabulka 4 Přehled emisních, excitačních vlnových délek a rozsahu vlnových délek jednotlivých měření*

| Fluorescenční sonda | Excitační vlnová délka [nm] | Emisní vlnová délka [nm] | Rozsah vlnových délek [nm] |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 4-Di-2-Asp          | 470                         | 610                      | 480 – 750                  |
| MB                  | 520                         | 672                      | 540 – 850                  |
| DAO                 | 493                         | 520                      | 500 – 750                  |

#### 4.6 Korekce emisních spekter

Přesnost měření fluorescence může být zkreslena různými faktory. Jedním z nich je i vnitřně filtrační efekt. Z tohoto důvodu byla emisní spektra korigována podle vztahu:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{ex} + A_{em})}, \quad (6)$$

kde  $A_{ex}$  je absorbance při excitační vlnové délce a  $A_{em}$  je absorbance při emisní vlnové délce.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo uskutečnit experimenty k ověření využití fluorescenčních sond ve studiu koloidních částic především na bázi hyaluronanu. Nejprve byly provedeny experimenty s hyaluronanem a se systémem hyaluronan-tenzid, které však ukázaly, že hyaluronan pravděpodobně není dostatečně silným polyelektrolytem a některé výsledky z těchto měření jsou sporné a obtížně interpretovatelné. Z těchto důvodů byl použit i další, syntetický polyelektrolyt polystyrensulfonyl sodný. Tento polyelektrolyt a systémy na něm založené (s přísadkou tenzidu) byl nejprve studován pomocí fluorescenční sondy DAO a to z toho důvodu, že tato sonda byla již použita v bakalářské práci, kde byla ověřena tvorba dimerů a to právě v systémech založeném na hyaluronanu. Tímto chtělo být ukázáno typické chování sondy tvořící dimery H typu projevující se posunem absorpčních maxim k nižším vlnovým délkám. S pomocí těchto výsledků mohou být interpretovány i výsledky dalších sond (MB, 4-Di-2-Asp), jelikož u sondy MB se různí výzkumní pracovníci neshodují, zda tato sonda tvoří dimery či nikoliv (viz kapitola 3.3) a u sondy 4-Di-2-Asp nejsou v literatuře dimery vůbec popsány.

### 5.1 Interakce fluorescenční sondy s polystyrensulfonyl sodným

Řetězec polystyrensulfonylu obsahuje záporně nabitě sulfonové skupiny ( $-\text{SO}_3^-$ ), pomocí kterých je schopen na sebe vázat kationtové molekuly. Měřené veličiny byly také studovány v závislosti na poměru P/D. P představuje koncentraci vazebných míst, tedy sulfonových skupin. Platí, že 205 molů polystyrensulfonylu obsahuje přibližně 1 mol sulfonových skupin. D představuje koncentraci fluorescenční sondy v roztoku.

#### 5.1.1 Fluorescenční sonda DAO

Při interpretaci výsledků měření s fluorescenční sondou DAO bylo vycházeno ze strukturní analogie této sondy s fluorescenční sondou NAO, u které byla v literatuře popsána tvorba dimerů, jejichž absorbance nabývá maximální hodnoty při 474 nm. Bylo vycházeno také z předpokladu, že DAO je ve vodném roztoku přítomna v monomerní formě, která u DAO nabývá maximální hodnoty při 493 nm (uvedeno výrobcem). Byla brána v úvahu také hydrofobní interakce, která mohla způsobit tvorbu agregátů jiného typu (premicelární útvary)

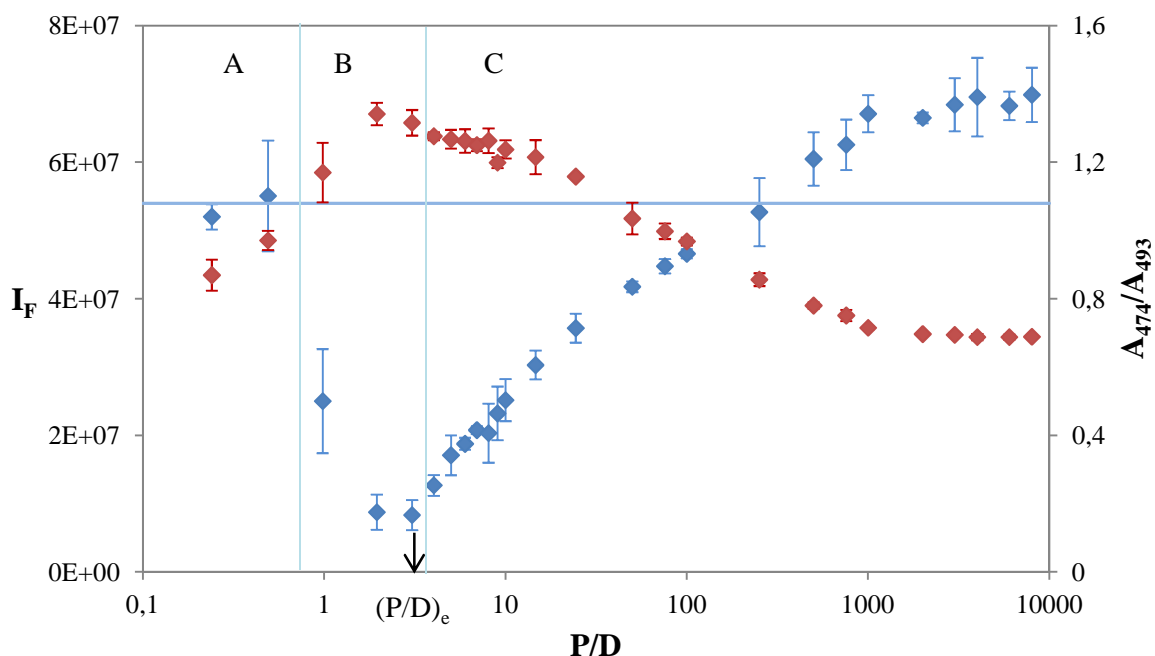
Tvorba dimerů byla také ověřena pomocí poměru absorbance dimeru ( $A_{474}$ ) ku absorbanci monomeru ( $A_{493}$ ), která je zaznamenána v grafu společně s intenzitou fluorescence (Obr. 24).

Oblast A (Obr. 24): V grafu je patrné, že s prvním přidáním malého množství polystyrensulfonylu došlo k snížení intenzity fluorescence oproti intenzitě fluorescence samotné sondy (v grafu zobrazeno pomocí modré přímky). Tento pokles byl způsoben navázáním fluorescenční sondy na řetězec polystyrensulfonylu. S dalším přísadkou se intenzita fluorescence zvýšila.

Oblast B: Poté dochází k prudkému snížení intenzity fluorescence v důsledku tvorby dimerů, což je potvrzeno i zvyšujícím se poměrem  $A_{474}/A_{493}$ . Při P/D=3 byla pozorována nejnižší intenzita fluorescence. Tento bod představuje tzv. koncový bod titrace, při kterém jsou všechny disociované karboxylové skupiny nasyceny molekulami barviva. V grafu je tento bod označen jako  $(P/D)_e$ . Tato hodnota odpovídá koncentraci polystyrensulfonylu  $3,125 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . V tomto bodě tedy dochází k nasycení záporně nabitých skupin dimery či oligomery DAO.

Oblast C: Se vzrůstající koncentrací polystyrensulfonátu dochází k výraznému nárůstu intenzity fluorescence a zároveň k poklesu poměru absorbancí, což svědčí o tom, že se dimery s přibývajícími vaznými místy rozpadají na monomerní formu či mohlo docházet k redistribuci molekul DAO podél řetězce polystyrensulfonátu.

Hodnota  $(P/D)_e$  byla použita v dalším zkoumání interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-polystyrensulfonát.



**Obr. 24** Porovnání závislosti intenzity fluorescence (modře zobrazené body) a poměrů absorbance dimeru ku absorbanci monomeru ( $A_{474}/A_{493}$ ; červeně zobrazené body) na podílu koncentrací vazných míst polystyrensulfonátu sodného a koncentrace sondy. Zleva doprava roste koncentrace polystyrensulfonátu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Modrá příčka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného polystyrensulfonátu, tedy samotné sondy.

Dalším důkazem tvorby dimeru může být porovnání absorpčních spekter vzorků s různou koncentrací polystyrensulfonátu (Obr. 25).

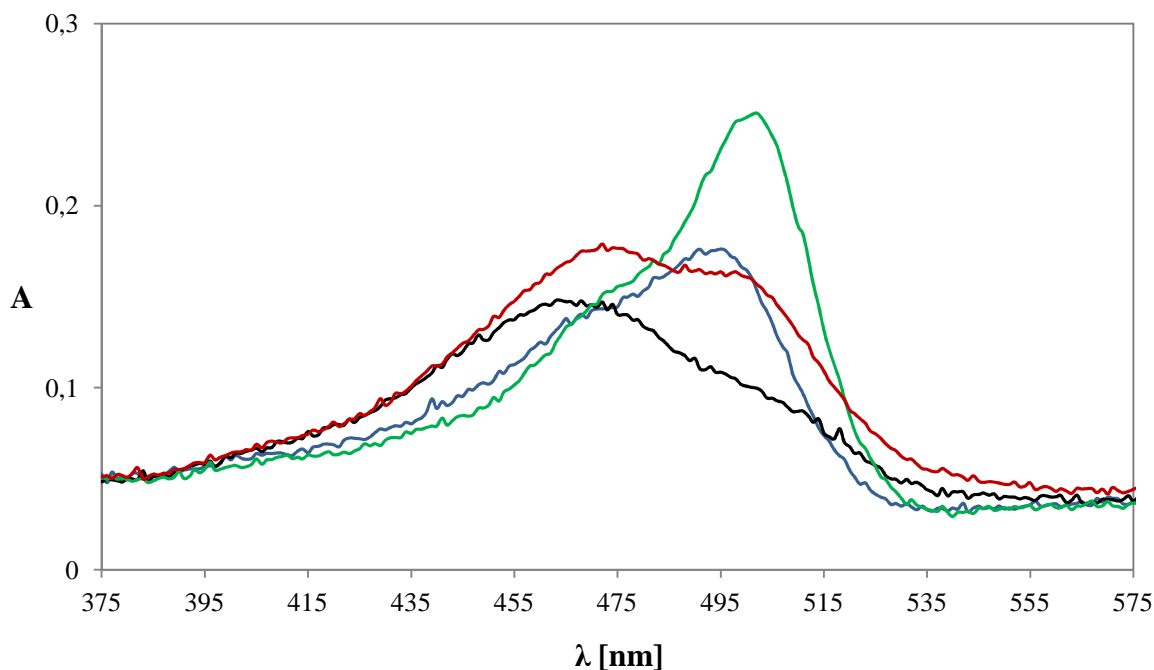
Pro zakreslení do grafu byly vybrány čtyři reprezentativní vzorky, aby byla znázorněna změna ve tvaru absorpčního spektra v důsledku tvorby či rozpadu dimerní formy DAO.

Modře vykreslené spektrum znázorňuje vzorek s nulovou koncentrací polystyrensulfonátu. Je patrné, že absorpční křivka nabývá maxima v okolí 493 nm (maximum absorpce monomeru), což potvrzuje, že je sonda ve vodném roztoku přítomna ve formě monomeru.

Černě je poté vykresleno absorpční spektrum vzorku, jehož  $P/D=(P/D)_e=3$ . V tomto bodě dochází k největší tvorbě dimerů, což je také potvrzeno tvarem absorpčního maxima, kterému schází vykreslený pík odpovídající monomeru.

Červená křivka náleží vzorku, jehož  $P/D=50$ , zde lze pozorovat opětovný nárůst monomerního píku. Rozdíl v maximech absorpce dimeru a monomeru se snižuje.

Křivka vykreslená zeleně náleží bodu o hodnotě  $P/D=2000$ . Zde lze pozorovat absolutní převahu monomerního píku, přičemž pík dimeru je zde přítomen již v minimální míře.



**Obr. 25** Absorpční spektra vzorků s různou koncentrací polystyrenulfonátu a konstantní koncentrací fluorescenční sondy DAO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Modrá křivka –  $P/D=0$ ; černá křivka –  $P/D=3$ ; červená křivka –  $P/D=50$ ; zelená křivka –  $P/D=2000$

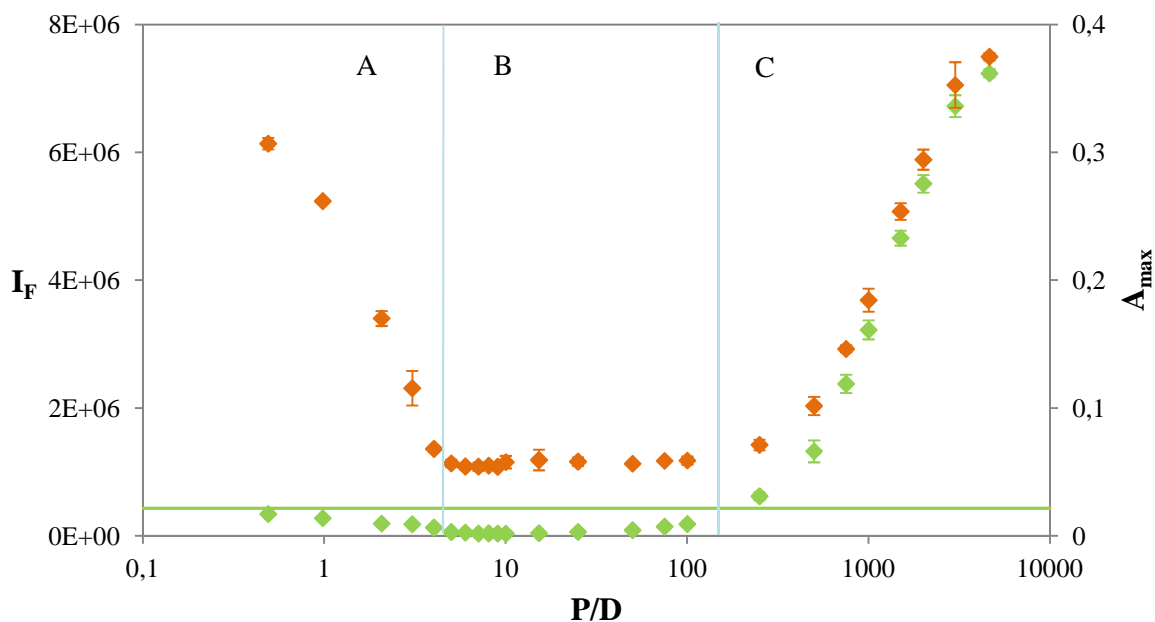
### 5.1.2 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp

U sondy 4-Di-2-Asp nebyly v literatuře nalezeny experimenty potvrzující či vyvracející tvorbu dimeru. Pokud bychom na interpretaci naměřených dat pohlíželi z hlediska tvorby dimerů (či jiných agregátů) pak v oblasti A dochází ke snižování intenzity fluorescence právě z důvodu jejich tvorby a navázání molekul sondy 4-Di-2-Asp na řetězec polystyrenulfonátu (Obr. 26).

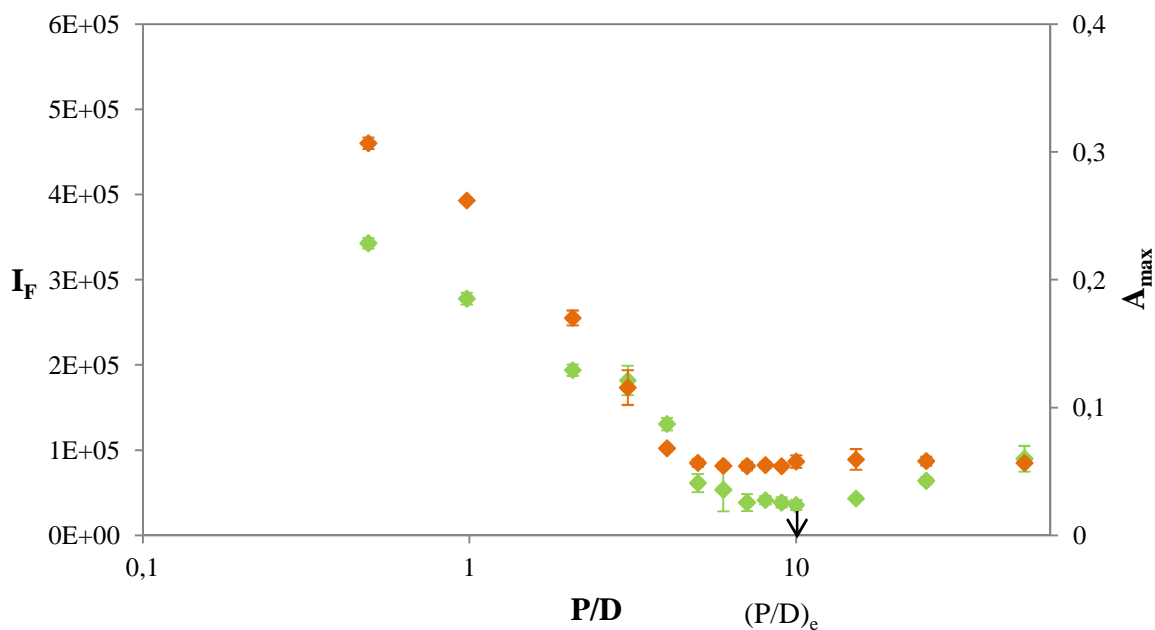
V oblasti B pozorujeme intenzitu fluorescence přibližně konstantní v rozsahu  $P/D$  5 až 100. Toto může být způsobeno vysycením vazných míst polystyrenulfonátu. Tento široký rozsah nízké intenzity fluorescence může být způsoben tím, že pokud není v roztoku dostatečná koncentrace polystyrenulfonátu (aby molekuly 4-Di-2-Asp mohly zaujímat vazná místa na řetězci, která jsou od sebe vzdálenější), pak molekuly sondy působí i mezi sebou kvůli malým vzájemným vzdálenostem.

Dále v oblasti C dochází k prudkému nárůstu intenzity fluorescence, která je nejspíše způsobena redistribuováním molekul 4-Di-2-Asp podél řetězce polystyrenulfonátu. Tento neobvykle prudký nárůst může být také podpořen zvýšením viskozity roztoku v důsledku stoupající koncentrace polystyrenulfonátu.

Jelikož v literatuře nebyly dostupné informace o maximu absorpce dimeru, je v grafu vynášena závislost maxima absorpce na  $P/D$ . Můžeme pozorovat, že má stejný průběh jako intenzita fluorescence.



**Obr. 26** Závislost maxima absorbance (oranžově zobrazené body) a intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp na poměru  $P/D$ . Osa  $x$  je vynesena v logaritmickém měřítku. Zleva doprava roste koncentrace polystyrensulfonátu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného polystyrensulfonátu, tedy samotné sondy.



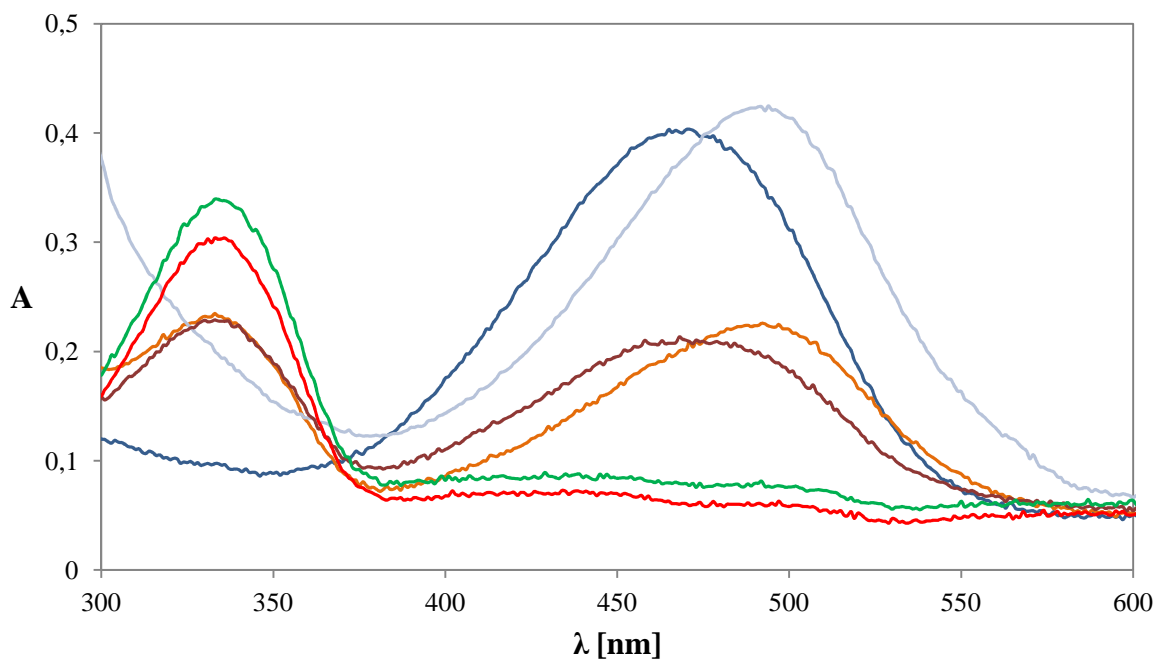
**Obr. 27** Závislost intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp a její maximální absorbance (oranžově zobrazené body) na podílu  $P/D$  – detailnější pohled – zobrazení  $(P/D)_e=10$ . Osa  $x$  je vynesena v logaritmickém měřítku, koncentrace polystyrensulfonátu roste zleva doprava.



Minimální intenzity fluorescence bylo dosaženo při  $P/D=10$  (Obr. 27), což představuje koncentraci polystyrensulfonátu  $2,05 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Tato hodnota koncentrace byla poté použita při zkoumání interakce sondy 4-Di-2-Asp se systémem polystyrensulfonát-tenzid CTAB.

Maxima absorpce vynesena v grafu (Obr. 26) s intenzitou fluorescence vycházela z měření absorpce v rozsahu 350 až 650 nm. Nakonec byly vzorky proměřeny ve větším rozsahu vlnových délek, čímž se zjistilo, že pod hodnotou 350 nm nabývá absorpce sondy 4-Di-2-Asp dalšího maxima (Obr. 28). Lze předpokládat, že toto druhé maximum může poukazovat na tvorbu agregátů, avšak nelze s určitostí říci či dimerního charakteru. Druhé maximum se začalo objevovat již při  $P/D=1$ . Maximální hodnoty nabývala při  $P/D=75$ . S postupným přidáváním polystyrensulfonátu toto maximum sláblo a znovu nabývalo na intenzitě maximum předpokládané monomerní formy, které vykazovalo mírný posun k delším vlnovým délkám, což poukazuje na tvorbu J-agregátů [42].

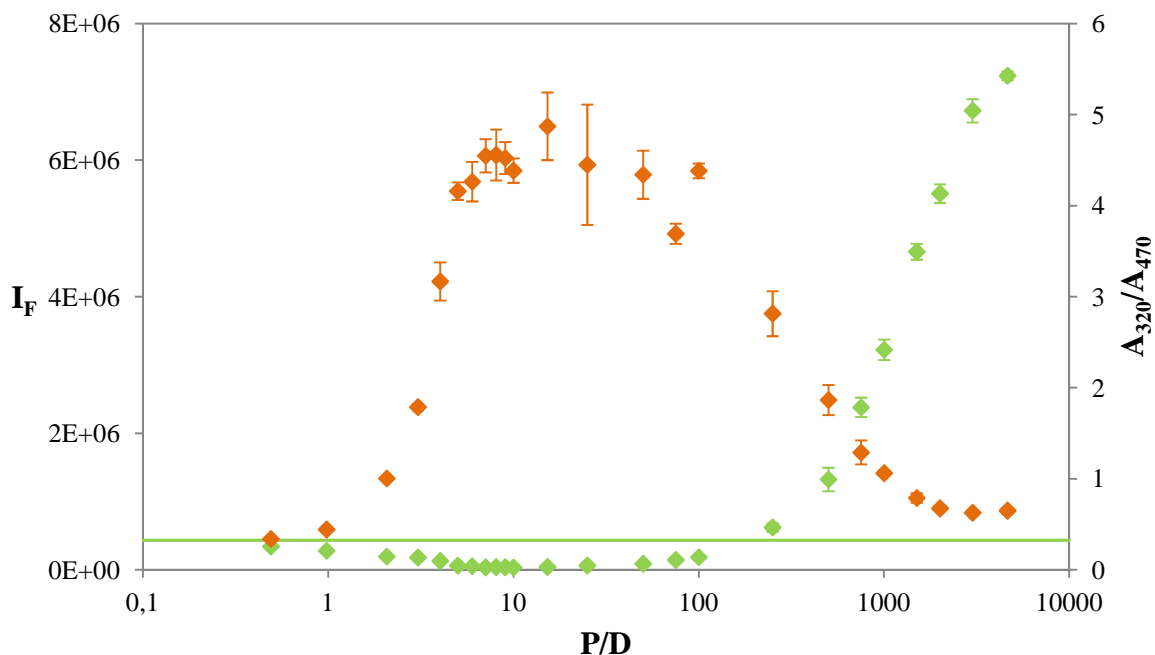
V grafu (Obr. 28) je tmavě modře vykreslena absorpce vzorku, jehož  $P/D=0$ , tmavě červeně  $P/D=2$ , jasně červeně  $P/D=(P/D)_c=10$ , zeleně  $P/D=75$ , oranžově  $P/D=1000$  a světle modře  $P/D=4634$  (což byla nejvyšší možná hodnota  $P/D$ ).



**Obr. 28** Absorpční spektra vzorků s různou koncentrací polystyrensulfonátu a konstantní koncentrací fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Modrá křivka –  $P/D=0$ ; tmavě červená křivka –  $P/D=2$ ; jasně červená křivka  $P/D=10$ ; zelená křivka –  $P/D=75$ ; oranžová křivka –  $P/D=1000$  a světle modrá křivka –  $P/D=4634$

Na základě měření absorbance ve větším rozmezí vlnových délek byl vypočítán poměr absorbance předpokládaného agregátu fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp ( $A_{320}$ ) ku absorbanci monomerní formy ( $A_{470}$ )(Obr. 29). Lze pozorovat, že závislost poměru  $A_{320}/A_{470}$  na  $P/D$  stoupá s klesající intenzitou fluorescence a tedy má opačný průběh než závislost  $A_{\text{max}}$  na  $P/D$ .

Tento poměr nám tedy poukazuje na to, že snížení intenzity fluorescence je následkem tvorby předpokládaných agregátů fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp.



**Obr. 29** Závislost poměru absorpance agregátu ku absorpanci monomerní formy (oranžově zobrazené body) a intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp na poměru P/D. Osa x je vynesena v logaritmicke měřítku. Zleva doprava roste koncentrace polystyrenulfonátu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného polystyrenulfonátu, tedy samotné sondy.

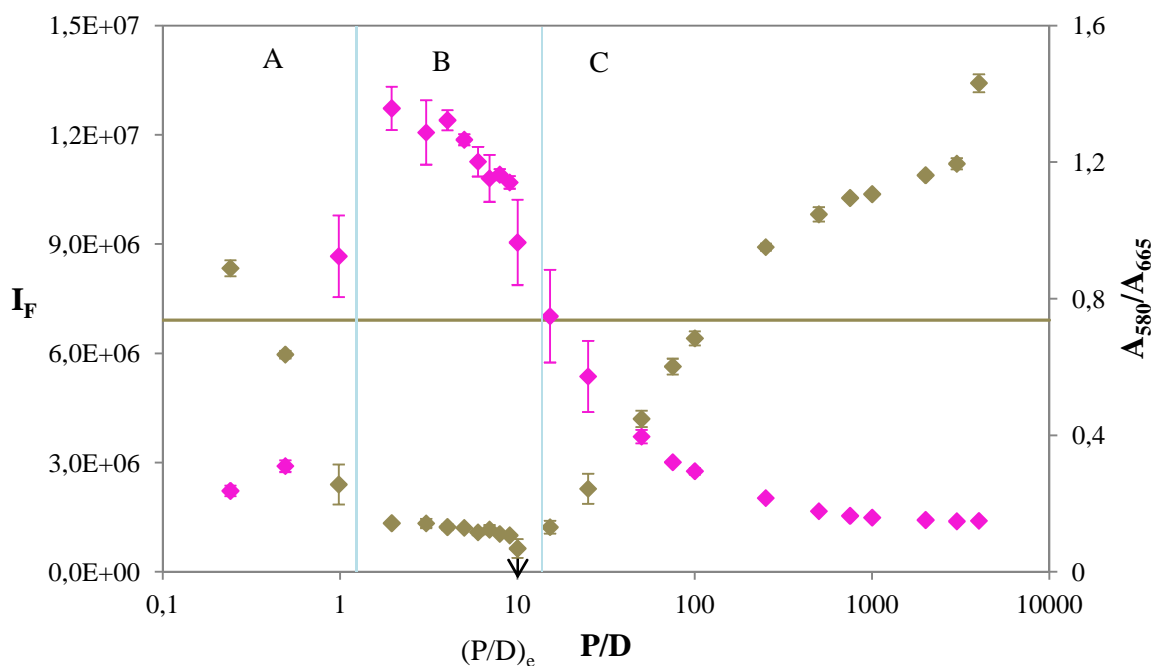
### 5.1.3 Fluorescenční sonda Methylenová modř

Dle dostupné literatury, ve které se předpokládá tvorba dimerů fluorescenční sondy MB, monomer nabývá maxima absorpance při vlnové délce 665 nm a dimer při vlnové délce 580 nm. V těchto zdrojích se uvádí, že přítomnost dimeru může být potvrzena hodnotou poměru absorpance dimeru ku absorpanci monomeru ( $A_{580}/A_{665}$ )[57].

Oblast A (Obr. 30): Po přidání polystyrenulfonátu k fluorescenční sondě 4-Di-2-Asp došlo k poklesu intenzity fluorescence a zároveň nárůstu poměru absorpance dimeru ku monomeru. Tato skutečnost poukazuje na to, že v systému dochází k navazování molekul sondy na řetězec polystyrenulfonátu a také k tvorbě dimerů.

V rozmezí P/D, které je v grafu vymezeno jako oblast B je intenzita fluorescence konstantní a poměr  $A_{580}/A_{665}$  klesá. V této oblasti se také nachází bod ekvivalence (P/D)<sub>e</sub>, při kterém jsou pravděpodobně všechna vazná místa na polystyrenulfonátu vysycena dimery sondy. Stejně jako při zkoumání systému 4-Di-2-Asp-polystyrenulfonát, bylo dosaženo minimální intenzity fluorescence při P/D=10, což představuje koncentraci polystyrenulfonátu  $2,05 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Tato hodnota koncentrace byla poté použita při zkoumání interakce sondy MB se systémem polystyrenulfonát-tenzid CTAB.

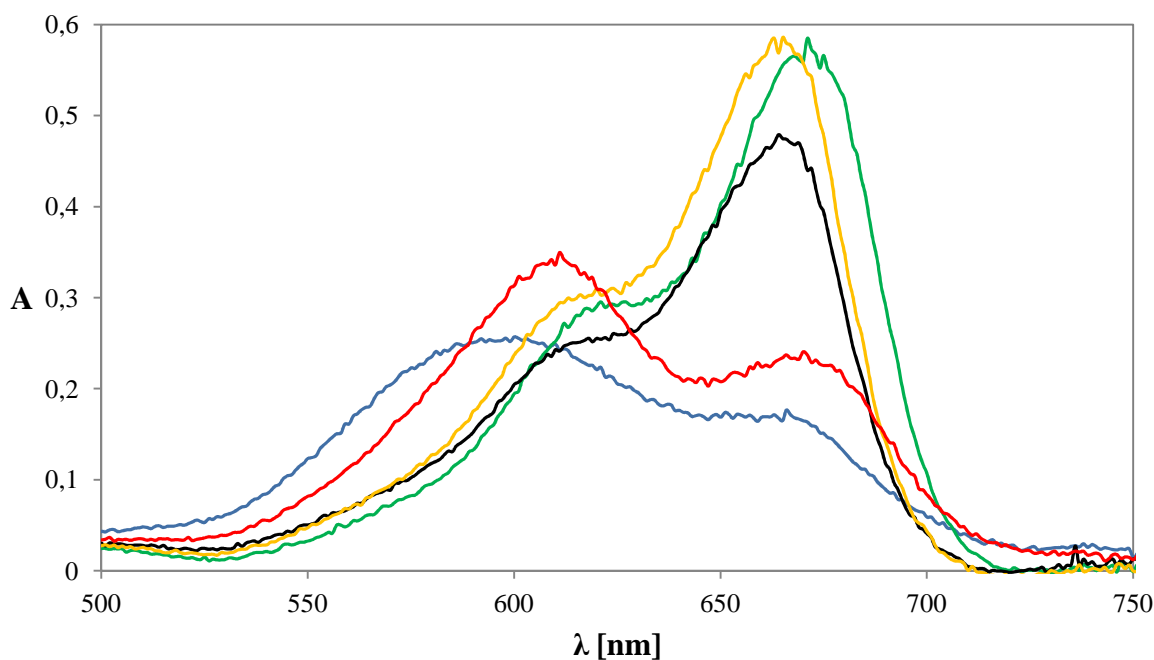
V oblasti C byl pozorován vzrůst intenzity fluorescence, což odpovídalo i pozorovanému poklesu poměru absorbancí  $A_{580}/A_{665}$ . V této oblasti P/D dochází zřejmě k rozpadu dimerů na monomery.



**Obr. 30** Porovnání závislosti intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy MB a poměru absorpce dimeru ku absorpenci monomeru ( $A_{580}/A_{665}$ ; růžově zobrazené body) na podílu koncentrací vazebných míst polystyrenulfonátu sodného a koncentrace sondy. Zleva doprava roste koncentrace polystyrenulfonátu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného polystyrenulfonátu, tedy samotné sondy.

Tvary absorpčních spekter naznačují přítomnost dimeru (Obr. 31). V grafu je tmavě oranžově vykreslena absorpce vzorku, jehož  $P/D=0$ ; černě  $P/D=0,25$ ; modře  $P/D=2$ ; červeně  $P/D=10$  a zeleně  $P/D=500$ .

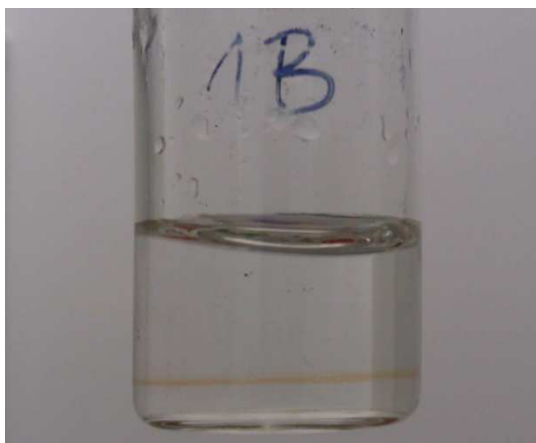
U vzorku jehož  $P/D=(P/D)_e=10$  je patrné, že maximum absorpce dimeru převažuje nad absorpcí monomeru. Tyto získané výsledky podporují teorii o tvorbě dimerů fluorescenční sondy MB.



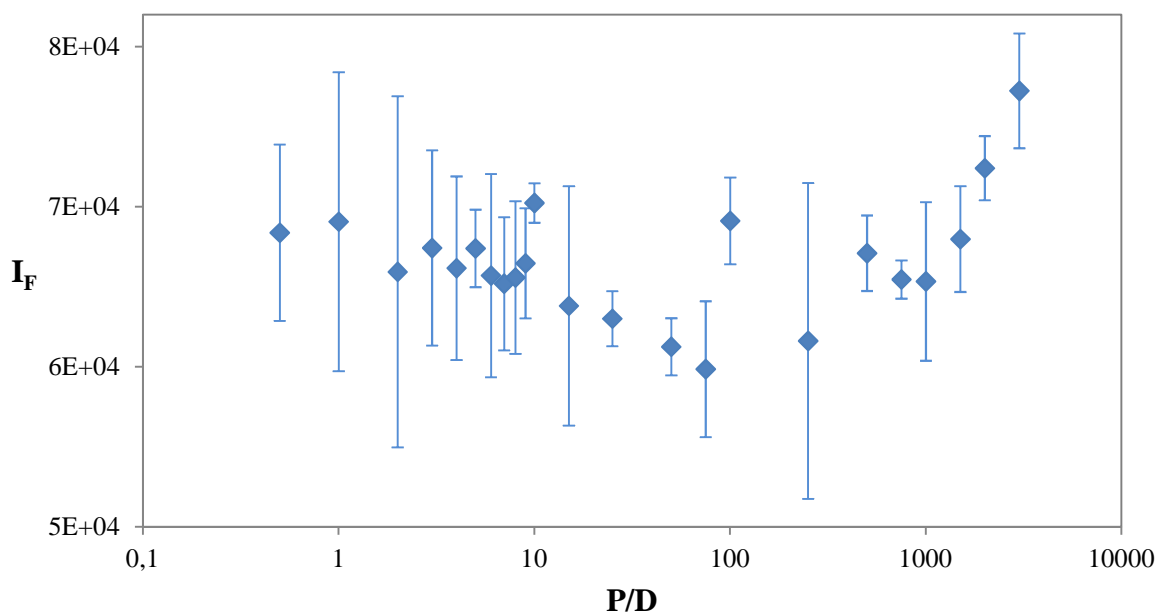
**Obr. 31** Absorpční spektra vzorků s různou koncentrací polystyrensulfony a konstantní koncentrací fluorescenční sondy MB ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Oranžová křivka –  $P/D=0$ ; černá křivka –  $P/D=0,25$ ; modrá křivka –  $P/D=2$ ; červená křivka –  $P/D=10$  a zelená křivka –  $P/D=500$

#### 5.1.4 Fluorescenční sondy DiO a DiA

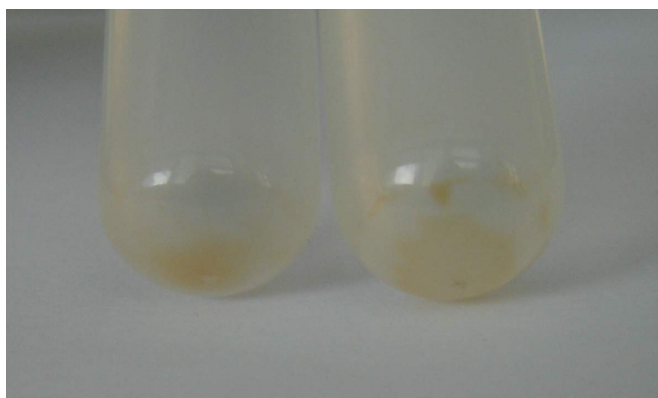
Po přípravě vzorků obsahujících fluorescenční sondy DiO a DiA bylo zjištěno, že se silně sorbují jak na sklo, tak i na plastový povrch (Obr. 32 a 34) a to při interakci s hyaluronanem i polystyrensulfony. Tato skutečnost je způsobena silným amfifilním charakterem uvedených sond, tudíž nebylo možné je použít v dalších experimentech, jelikož koncentrace sond ve vzorcích nebyla stejná a přesná. Také intenzita fluorescence byla velmi kolísavá, což bylo potvrzeno při vyhodnocení i vypočtenou směrodatnou odchylkou, která nabývala vysokých hodnot (Obr. 33).



**Obr. 32** Ukázka sorpce fluorescenční sondy DiO na skleněný povrch vialek (oranžový lem)

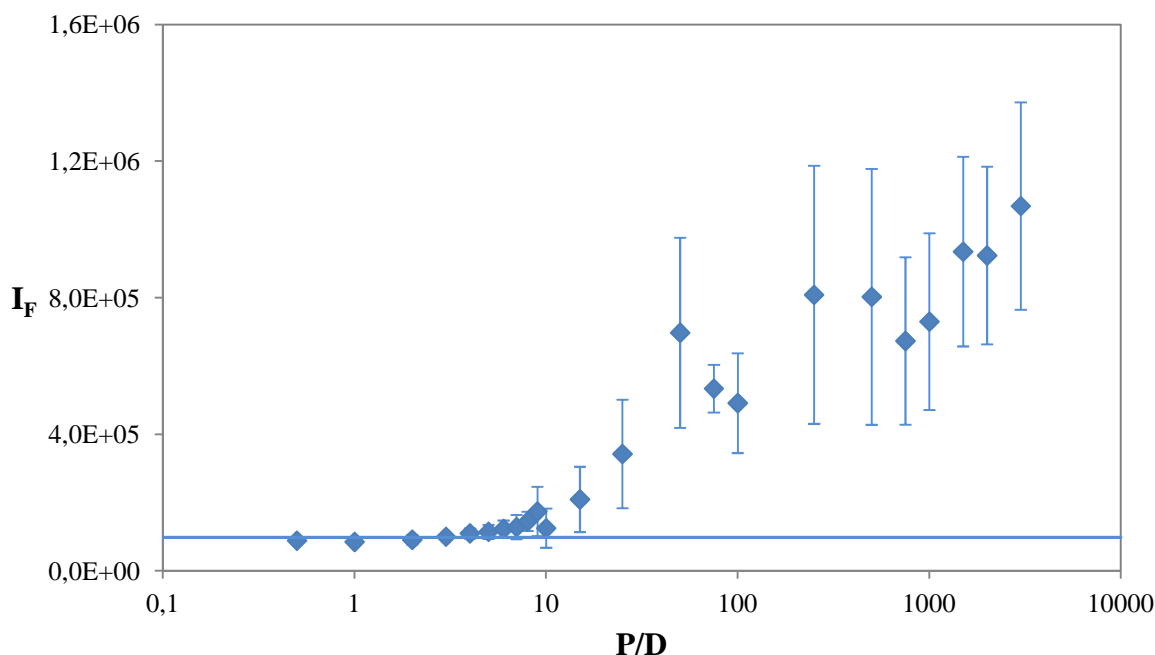


**Obr. 33** Ukázka chybových úseček při měření interakce mezi fluorescenční sondou DiA a hyaluronanem. V grafu je vynesena závislost intenzity fluorescence na poměru P/D. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Zleva doprava roste koncentrace hyaluronanu při konstantní koncentraci ( $4,941 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) sondy DiA ve všech vzorcích.



**Obr. 34** Ukázka sorpce fluorescenční sondy DiA na povrch plastových zkumavek

I přes sorpci fluorescenční amfifilní sondy DiA na plastový povrch zkumavek, který byl jasně viditelný (Obr. 34) byly při měření interakce DiA s polystyrensulfonylátom chybové úsečky v nižších P/D, tedy v nižších koncentracích polystyrensulfonylátu oproti chybovým úsečkám ve vyšších koncentracích zanedbatelné (Obr. 35). Celkově měla intenzita fluorescence stoupající charakter.



**Obr. 35** Závislost intenzity fluorescence na poměru vazných míst polystyrensulfonátu ku koncentraci sondy, která byla ve všech vzorcích konstantní ( $4,941 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Zleva doprava roste koncentrace polystyrensulfonátu. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Modrá přímka znázorňuje fluorescenci bez přidaného polystyrensulfonátu, tedy samotné sondy

Příčinou rozdílu chybových úseček byla nejspíš stoupající koncentrace polystyrensulfonátu. Sonda DiA má velkou afinitu k mezifázovému rozhraní díky svému amfifilnímu charakteru, tedy se po odpaření silně sorbovala na rozhraní plast-vzduch. Po přidání vody a polystyrensulfonátu zůstala tato afinita nenarušena. Při zvyšování koncentrace polystyrensulfonátu v průběhu koncentrační řady se začala sonda DiA nejspíše vázat na polystyrensulfonát (polystyrensulfonát DiA „stahoval“ do roztoku). Tento proces se však nejspíše odehrával s různou rychlostí a intenzitou, což způsobilo nerovnoměrné rozpuštění fluorescenční sondy DiA v roztoku a tím i velké chybové úsečky v této oblasti.

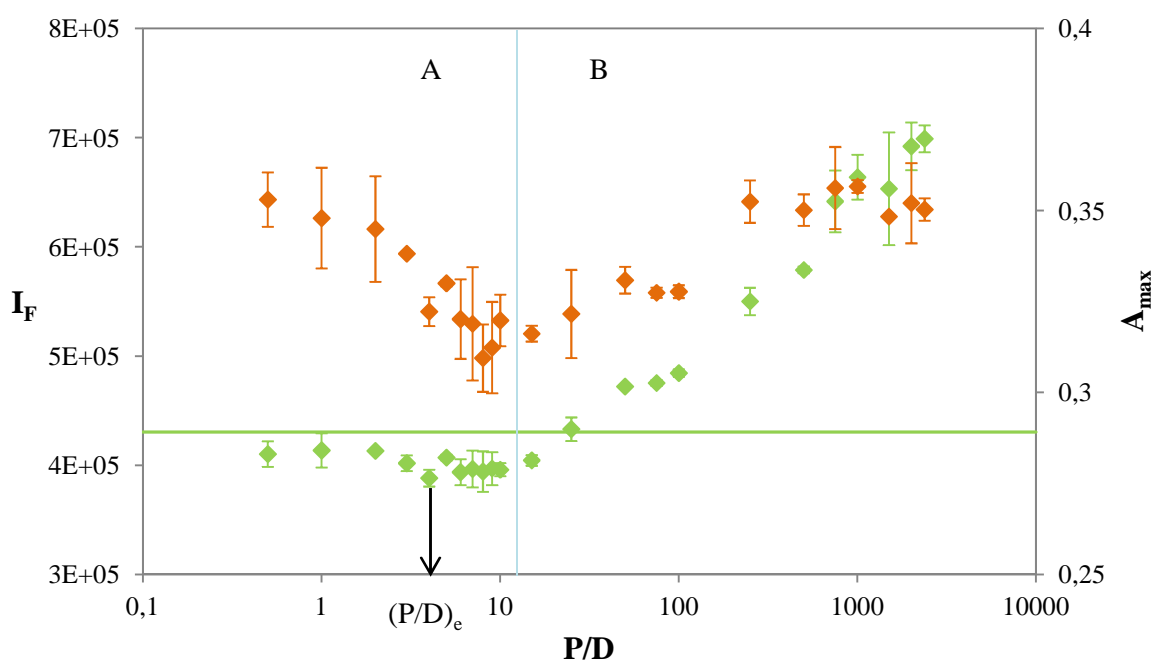
## 5.2 Interakce fluorescenční sondy s hyaluronanem

Kationtové fluorescenční sondy se na kyselinu hyaluronovou váží prostřednictvím záporně nabitých karboxylových skupin, které se vyskytují po celé délce řetězce hyaluronanu. Interakce mezi vaznými místy hyaluronanu a fluorescenčními sondami byly studovány pomocí měření intenzity fluorescence v závislosti na poměru P/D, kde P představuje počet vazebných míst hyaluronanu (koncentraci karboxylových skupin). Obecně platí, že 402,3 molů kyseliny hyaluronové obsahuje přibližně 1 mol karboxylových skupin. D představuje koncentraci fluorescenční sondy v roztoku.

### 5.2.1 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp

Oblast A (Obr. 36): Po přidání malého množství hyaluronanu byl zaznamenán mírný pokles intenzity fluorescence oproti intenzitě fluorescence samotné sondy, která je v grafu zobrazena zelenou přímkou. Snížení intenzity fluorescence je nejspíše způsobeno navázáním sondy 4-Di-2-Asp na karboxylové skupiny hyaluronanu. S dalšími přidávkami hyaluronanu zůstávala intenzita fluorescence přibližně konstantní. Nejnižší intenzity fluorescence je dosaženo při  $P/D=4$ . Tento bod představuje tzv. koncový bod titrace, při kterém jsou všechny disociované karboxylové skupiny nasyceny molekulami barviva. V grafu je tento bod značen jako  $(P/D)_e$ . Bod  $(P/D)_e = 4$  představuje koncentraci hyaluronanu  $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Hodnota  $(P/D)_e$  byla použita v dalším zkoumání interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda – hyaluronan.

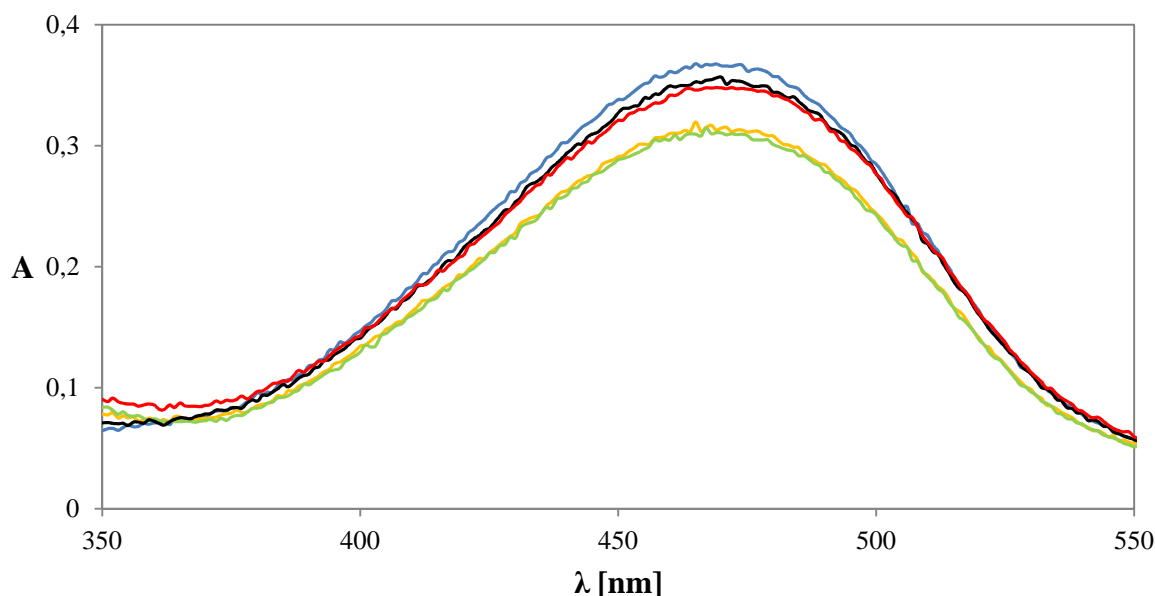
Oblast B: Po dosažení koncentrace  $4 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  došlo k nárůstu intenzity fluorescence. Tento nárůst intenzity by mohl být způsoben rozpadem agregátů či rozprostřením molekul sondy 4-Di-2-Asp podél řetězce hyaluronanu. Ve vysokých hodnotách  $P/D$  bylo pozorováno, že i když intenzita fluorescence rostla, maximum absorbance zůstávalo přibližně konstantní. Stejně jak u interakce 4-Di-2Asp-polystyrenulfonát zde může hrát roli charakter prostředí (vyšší viskozita roztoku) a podporovat tak fluorescenci.



**Obr. 36** Závislost maxima absorbance (oranžově zobrazené body) a intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp na podílu koncentrací vazebných míst hyaluronanu a koncentrace sondy. Zleva doprava roste koncentrace hyaluronanu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Zelená příčka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného hyaluronanu, tedy samotné sondy.

V případě interakce hyaluronanu s fluorescenční sondou 4-Di-2-Asp nebylo pozorováno při měření absorbancí jiné maximum jako tomu bylo u interakce s polystyrensulfonátem. S přidavkem hyaluronanu se pouze mění intenzita absorbance (Obr. 37), ale nedochází k žádnému rozeznatelnému posunu maxima absorbance k vyšším či nižším vlnovým délkám. Nejnižší absorbance byla vykazována systémem při  $P/D=(P/D)_e=10$ .

Tvary absorpčních spekter v tomto případě neprokazují tvorbu dimeru. V grafu je světle modře vykreslena absorpce vzorku, jehož  $P/D=0$ , oranžově  $P/D=4$ , zeleně  $P/D=15$ , černě  $P/D=250$  a červeně  $P/D=2375$  (maximální dosažitelná hodnota  $P/D$ ).



**Obr. 37** Absorpční spektra vzorků s různou koncentrací hyaluronanu a konstantní koncentrací fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Světle modrá křivka –  $P/D=0$ ; oranžová křivka –  $P/D=4$ ; zelená křivka –  $P/D=15$ ; černá křivka –  $P/D=250$  a červená křivka –  $P/D=2375$

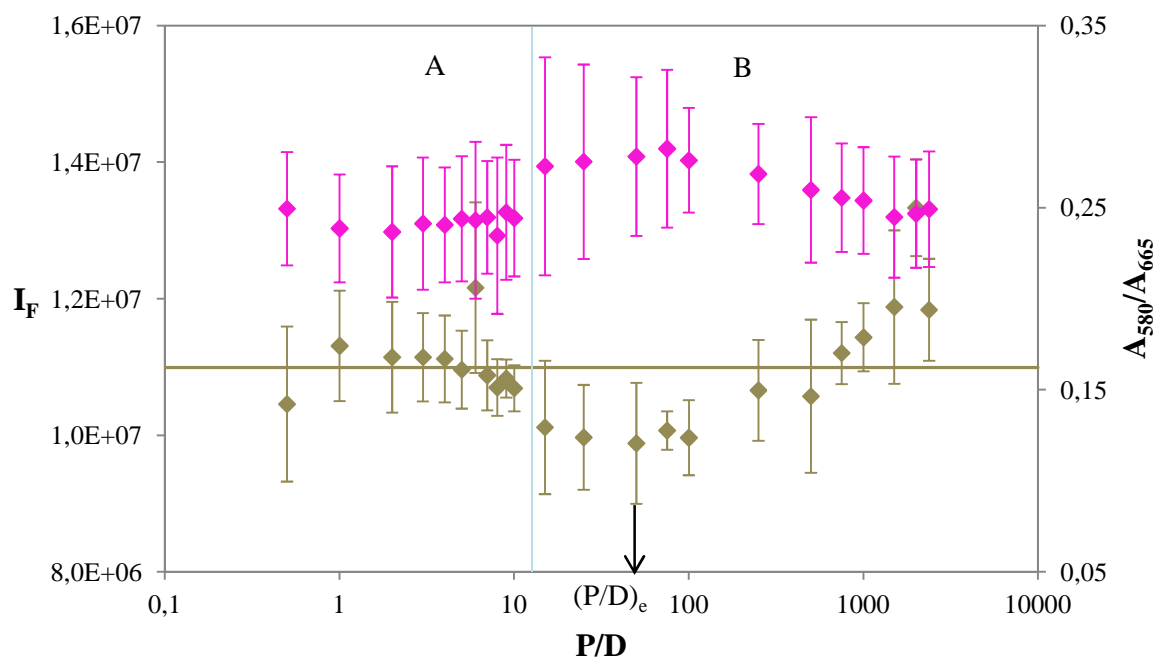
### 5.2.2 Fluorescenční sonda Methylenová modř

V případě interakce fluorescenční sondy MB a hyaluronanu je patrné, že po prvním přidavku tohoto polyelektrolytu dochází ke kolísání intenzity fluorescence kolem hodnoty intenzity fluorescence samotné sondy, což je v grafu (Obr. 38) znázorněno zelenou přímkou (Oblast A).

V oblasti B dochází se zvyšováním koncentrace hyaluronanu ke snížení intenzity fluorescence a zároveň ke zvýšení poměru absorbancí dimeru ku monomeru. To by poukazovalo na tvorbu dimerů, avšak porovnáme-li graf interakce MB s polystyrensulfonátem, jsou tyto změny jak v intenzitě fluorescence, tak v hodnotě poměru  $A_{580}/A_{665}$  zanedbatelné. Lze tedy předpokládat, že ke tvorbě dimeru v přítomnosti kyseliny hyaluronové dochází jen v malé míře či nikoliv. Při měření interakce fluorescenční sondy MB s hyaluronanem bylo zjištěno, že nejmenší intenzita fluorescence nastává při  $P/D=50$ . Tento bod je v grafu označen jako  $(P/D)_e$  a odpovídá koncentraci hyaluronanu  $2 \cdot 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .



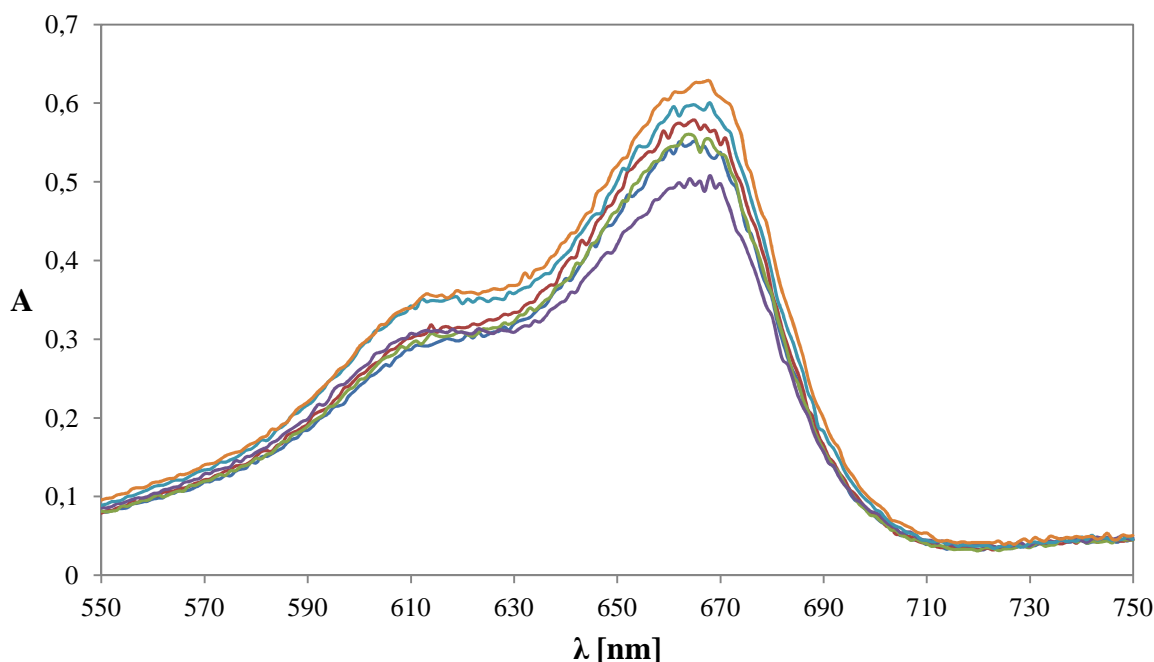
Hodnota  $(P/D)_e$  byla použita v dalším zkoumání interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-hyaluronan.



**Obr. 38** Porovnání závislosti intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy MB a poměru absorbance dimeru ku absorbanci monomeru ( $A_{580}/A_{665}$ ; růžově zobrazené body) na poměru  $P/D$ . Zleva doprava roste koncentrace hyaluronanu ve vzorcích, koncentrace sondy je konstantní ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Osa  $x$  je vynesena v logaritmickém měřítku. Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence bez přidaného hyaluronanu, tedy samotné sondy.

Při interakci fluorescenční sondy MB s hyaluronanem nedocházelo ke změně tvaru absorpčních spekter (Obr. 39). Se zvyšující se koncentrací hyaluronanu se pouze mění intenzita absorpčního maxima. Všechny křivky mají maximum kolem 665 nm, což odpovídá maximu absorbance monomeru.

Tvary absorpčních spekter v tomto případě neprokazují tvorbu dimeru. V grafu je tmavě modře vykreslena absorpce vzorku, jehož  $P/D=0$ , červeně  $P/D=3$ , zeleně  $P/D=9$ , která se překrývá s tmavě modrou křivkou pro  $P/D=0$ , fialově  $P/D=(P/D)_e=50$  (nejnižší hodnota absorbance), světle modře  $P/D=500$  a oranžově  $P/D=2375$  (maximální dosažitelná hodnota  $P/D$ ), která nabývá nejvyšší intenzity absorbance.



**Obr. 39** Absorpční spektra vzorků s různou koncentrací hyaluronanu a konstantní koncentrací fluorescenční sondy MB ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Tmavě modrá křivka –  $P/D=0$ , červená křivka –  $P/D=3$ , zelená křivka –  $P/D=9$ , která je v překryvu s tmavě modrou křivkou pro  $P/D=0$ , fialová křivka –  $P/D=(P/D)_e=50$ , světle modrá křivka –  $P/D=500$  a oranžová pro  $P/D=2375$

### 5.3 Interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-polystyrensulfonát sodný

K sestavení koncentračních řad pro měření interakce mezi systémem fluorescenční sonda-polystyrensulfonát sodný a tenzidem CTAB, byly použity hodnoty  $(P/D)_e$ , které byly získány z předchozích měření

#### 5.3.1 Fluorescenční sonda DAO

Při studiu interakce mezi tenzidem CTAB a systémem fluorescenční sonda-polystyrensulfonát, byla měřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku, za konstantní koncentrace DAO ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) a konstantní koncentrace polystyrensulfonátu (zvoleno dle  $(P/D)_e$ ), která byla  $3,125 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

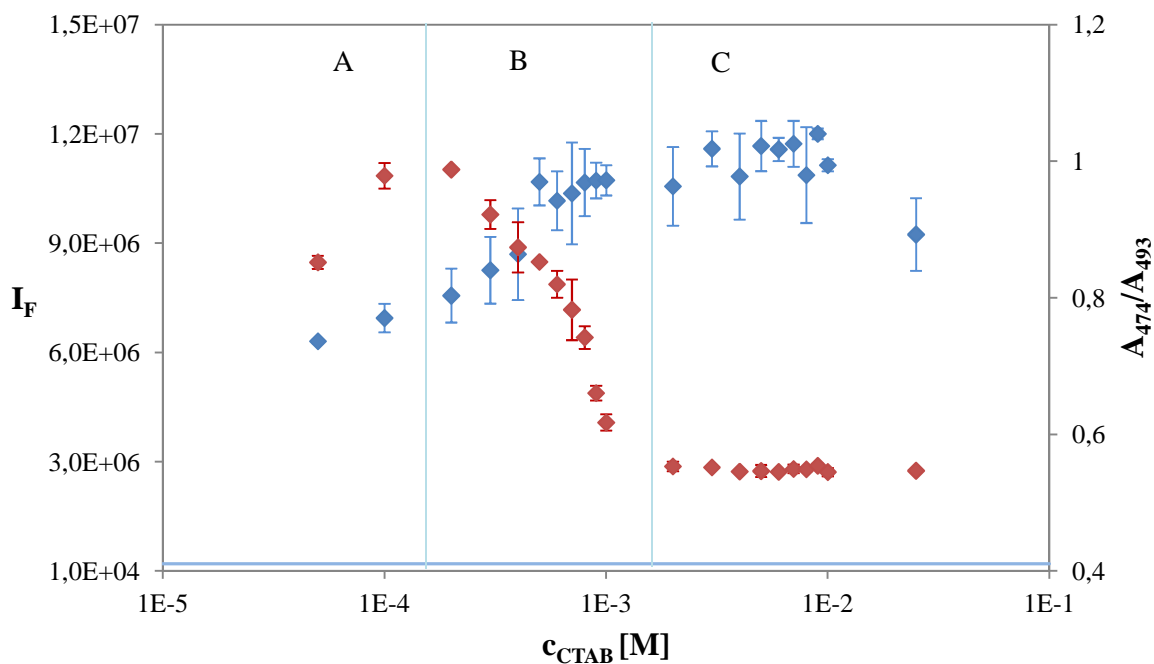
Chování tenzidu v systému fluorescenční sonda-polystyrensulfonát bylo studováno také pomocí poměrů absorbance dimeru ku absorbanci monomeru  $A_{474}/A_{493}$  (Obr. 40).

V oblasti A dochází k nárůstu intenzity fluorescence (zároveň doprovázena vzrůstem poměru  $A_{474}/A_{493}$ ) oproti vzorku jehož  $P/D=(P/D)_e$ , ve kterém je přítomen pouze systém fluorescenční sonda-polystyrensulfonát (znázorněno modrou přímkou). Vzrůst intenzity fluorescence je způsoben pravděpodobně vytěšňováním dimerů tenzidem CTAB z vazných míst polystyrensulfonátu a jejich následným rozpadem v roztoku na monomerní formu.

Oblast B je oblastí nárůstu intenzity fluorescence a zároveň poklesu poměru absorbancí dimeru ku monomeru. Tento průběh ukazuje na rozpad dimerů.

S překročením koncentrace tenzidu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  dochází ke změně průběhu poměru absorbancí. Tento jev může být spojen s překročením tzv. kritické agregační koncentrace (CAC), která je přibližně o jeden koncentrační řád nižší, než CMC [61]. Při této koncentraci dochází k tomu, že se jednotlivé molekuly kumulují na fázovém rozhraní.

Mezi oblastí C a D došlo k překročení CMC tenzidu CTAB (0,9 mM). Takže docházelo k vytěšňování molekul sondy z vazných míst polystyrenulfonátu a tím ke vzrůstu intenzity fluorescence. V oblasti C zůstává již intenzita fluorescence přibližně konstantní kromě posledního bodu, který může poukazovat na opětovnou tvorbu dimeru či navázání molekul fluorescenční sondy v podobě kosurfaktantu do micel tenzidu.



**Obr. 40** Závislost poměru absorbance dimeru ku absorbanci monomeru ( $A_{474}/A_{493}$ ; červeně zobrazené body) a intenzity fluorescence (modře zobrazené body) sondy DAO na vzrůstající koncentraci tenzidu CTAB, při konstantní koncentraci polystyrenulfonátu i fluorescenční sondy DAO. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Modrá přímka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorku, jehož  $P/D = P/D_e = 3$ . V tomto vzorku je koncentrace sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentrace polystyrenulfonátu  $3,125 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 5.3.2 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp

Při studiu této interakce byla měřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku, za konstantní koncentrace 4-Di-2-Asp ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) a konstantní koncentrace polystyrenulfonátu (zvoleno dle  $(P/D)_e$ ), která byla  $2,05 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

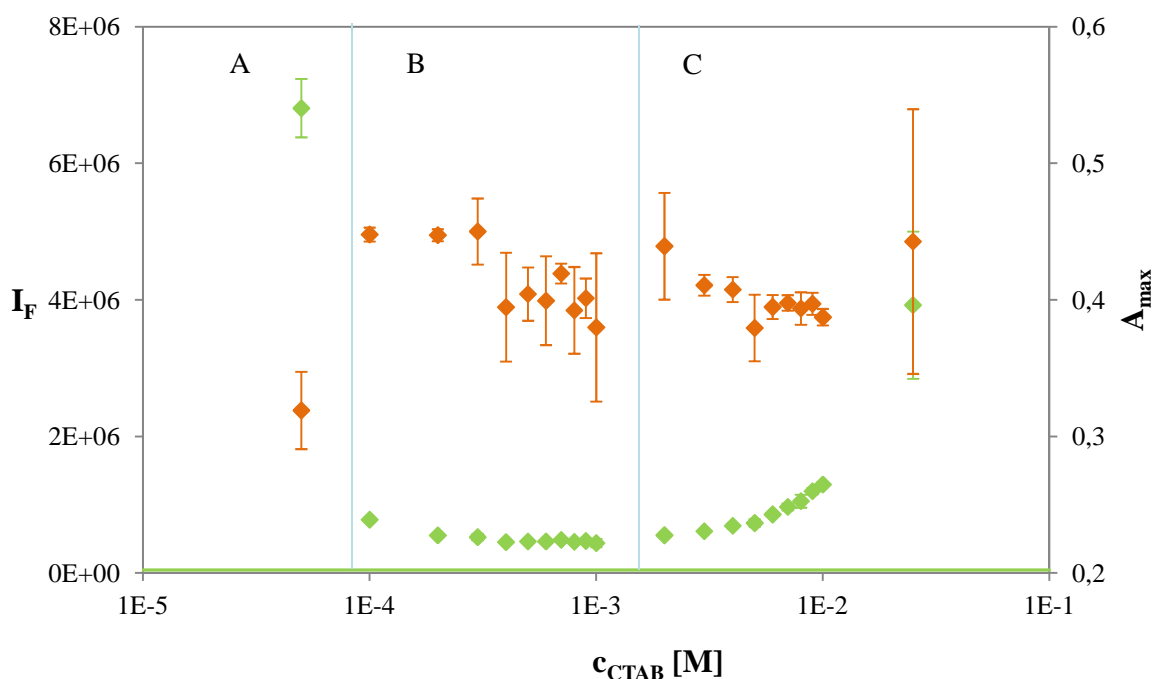
Oblast A (Obr. 41): Při přidání tenzidu CTAB je pozorován nárůst intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) oproti vzorku, který obsahuje pouze polystyrenulfonát a fluorescenční sondu 4-Di-2-Asp (v grafu znázorněno zelenou přímkou). Docházelo tedy nejspíše k vytěšňování agregátů z vazných míst polystyrenulfonátu.

Prudký pokles intenzity fluorescence mezi oblastí A a B koreluje s překročením CAC CTAB. V této oblasti koncentrací dochází zřejmě k tvorbě agregátů, které jsou podobné micelám (avšak jsou menších rozměrů) a jsou navázány na řetězci polyelektrolytu. Tento model interakce je označován jako „perlový náhrdelník“ [62].

V oblasti B, tedy oblasti s koncentrací CTAB nižších než je jeho CMC byla pozorována přibližně konstantní intenzita fluorescence. Mírný pokles intenzity fluorescence na konci oblasti B, je pravděpodobně způsoben navázáním molekul sondy 4-Di-2-Asp na tvořící se micely tenzidu CTAB.

Po překročení CMC dochází k nárůstu intenzity fluorescence (Oblast C). Stejně jako u hyaluronanu je tento nárůst spojen s vytvořením micel tenzidu CTAB (0,9 mM), které vytěsňují molekuly barviva z vazných míst polystyrensulfonátu.

Maximum absorpce (oranžově zobrazené body) má mezi oblastmi A a B a poté v oblasti C opačný průběh než intenzita fluorescence na rozdíl od ostatních uskutečněných experimentů. K objasnění této skutečnosti, by bylo potřeba dalších cíleně zaměřených experimentů.



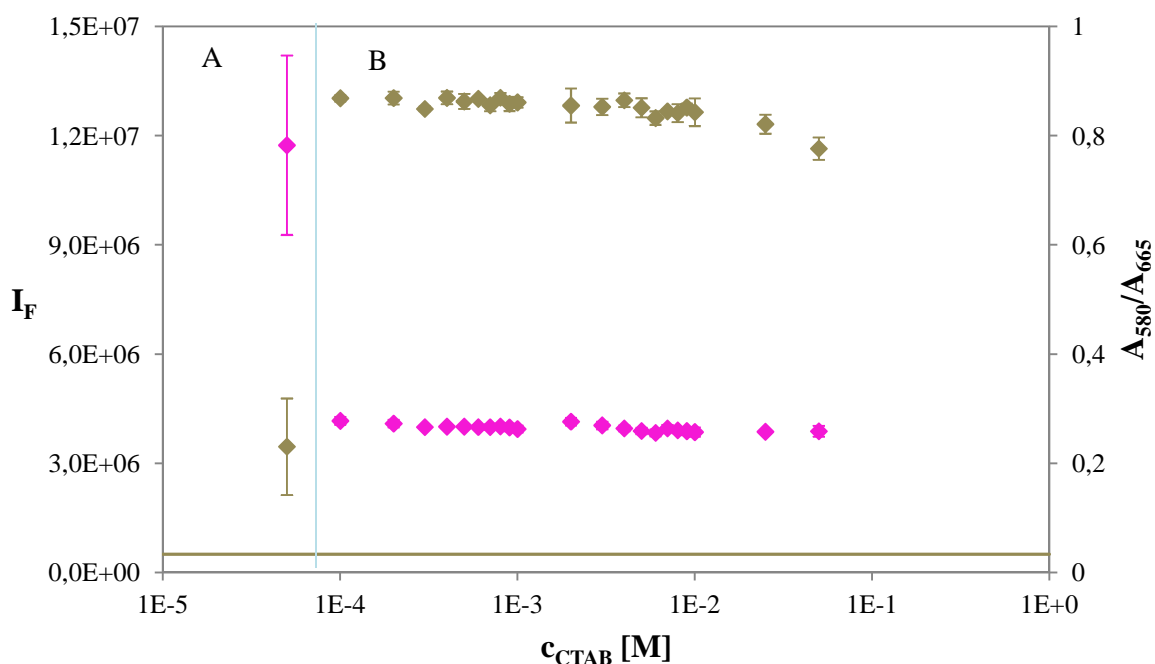
**Obr. 41** Závislost maxima absorpance (oranžově zobrazené body) a intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp na vzrůstající koncentraci tenzidu CTAB ve vzorcích obsahujících konstantní množství fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp a konstantní koncentraci polystyrensulfonátu. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorku, jehož  $P/D = P/D_e = 10$ . V tomto vzorku je koncentrace sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentrace polystyrensulfonátu  $2,05 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 5.3.3 Fluorescenční sonda Methylenová modř

Při studiu interakce mezi systémem methylenová modř-polystyrenulfonát a tenzidem CTAB byla měřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku, za konstantní koncentrace MB ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) a konstantní koncentrace polystyrenulfonátu (zvoleno dle  $(P/D)_e$ ), která byla  $2,05 \cdot 10^{-2}$  g·l<sup>-1</sup>.

V oblasti A (Obr. 42) došlo k významnému nárůstu intenzity fluorescence oproti intenzitě fluorescence vzorku, který obsahoval pouze fluorescenční sondu MB a polystyrenulfonát (v grafu znázorněno zelenou přímkou). Vzrůst intenzity fluorescence je doprovázen stejně významným poklesem poměru absorbancí  $A_{580}/A_{665}$ . Oba dva průběhy závislostí ukazují v této oblasti na rozpad dimerů či agregátů na monomerní formu.

V oblasti B nedochází k žádným výrazným změnám, intenzita fluorescence i poměr absorbancí zůstávají konstantní. Z tohoto průběhu lze usuzovat, že fluorescenční sonda je přítomna v roztoku v monomerní formě, jelikož byla vytěsněna již malým přídatkem CTAB z vazných míst polystyrenulfonátu. Na to poukazuje i zásadní změna v intenzitě fluorescence spojená s překročením nikoliv CMC CTAB ale již s odpovídající CAC CTAB. Tenzid CTAB a polystyrenulfonát k sobě mají tudíž mnohem větší afinitu než sonda MB-polystyrenulfonát.



**Obr. 42** Porovnání závislosti intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy MB a poměru absorbance dimeru ku absorbanci monomeru ( $A_{580}/A_{665}$ ; růžově zobrazené body) na rostoucí koncentraci tenzidu CTAB ve vzorcích obsahujících konstantní množství fluorescenční sondy MB a konstantní koncentraci polystyrenulfonátu. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Tmavě zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorku, jehož  $P/D=P/D_e=10$ . V tomto vzorku je koncentrace sondy  $1 \cdot 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> a koncentrace polystyrenulfonátu  $2,05 \cdot 10^{-2}$  g·l<sup>-1</sup>.

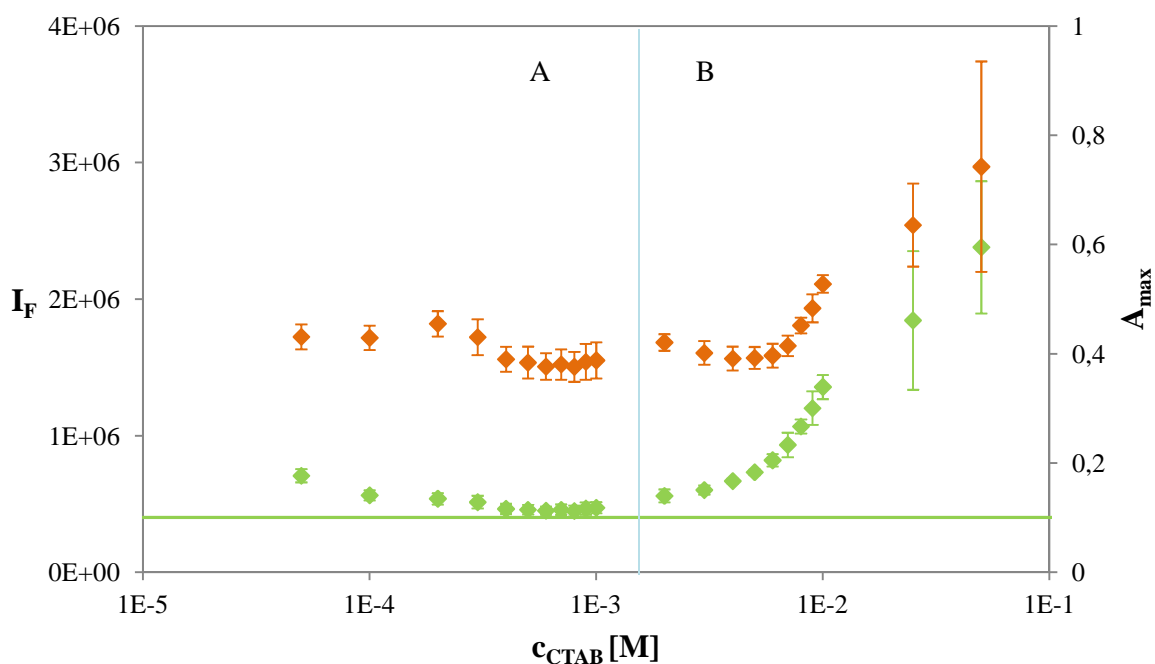
## 5.4 Interakce tenzidu CTAB se systémem fluorescenční sonda-hyaluronan

### 5.4.1 Fluorescenční sonda 4-Di-2-Asp

Při studiu této interakce byla měřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku, za konstantní koncentrace 4-Di-2-Asp ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) a konstantní koncentrace hyaluronanu (zvoleno dle  $(P/D)_e$ ), která byla  $1,6 \cdot 10^{-2}$  g $\cdot$ l $^{-1}$ .

Oblast A (Obr. 43): Po přidání tenzidu CTAB do systému fluorescenční sonda-hyaluronan byl zaznamenán mírný nárůst intenzity fluorescence oproti vzorku, který obsahoval pouze fluorescenční sondu a hyaluronan. Se zvyšující se koncentrací CTAB dochází k velmi mírnému poklesu intenzity fluorescence, což může být spojeno s interakcí označovanou jako „perlový náhrdelník“ [62]. V této oblasti koncentrací zřejmě dochází k tvorbě agregátů, které jsou podobné micelám (avšak jsou menších rozměrů) a jsou navázány na řetězci hyaluronanu.

Oblast B: Při dosažení koncentrace CTAB  $1 \cdot 10^{-3}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  intenzita fluorescence vykazuje nárůst, stejně jako hodnota maxima absorbance. Tento nárůst je nejspíše spojen s překročením CMC tenzidu CTAB (0,9 mM). Po překročení této hraniční koncentrace se v roztoku tvoří micely, které vytěsňují molekuly barviva z vazných míst hyaluronanu a nacházejí se tudíž v roztoku v monomerní formě.



**Obr. 43** Závislost maxima absorbance (oranžově zobrazené body) a intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy 4-Di-2-Asp na vzrůstající koncentraci tenzidu CTAB, ve vzorcích obsahujících konstantní množství fluorescenční sondy 4-Di-2-Asp a konstantní koncentraci hyaluronanu. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Zelená přímka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorku, jehož  $P/D=P/D_e=4$ . V tomto vzorku je koncentrace sondy  $1 \cdot 10^{-5}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  a koncentrace hyaluronanu  $1,6 \cdot 10^{-2}$  g $\cdot$ l $^{-1}$ .

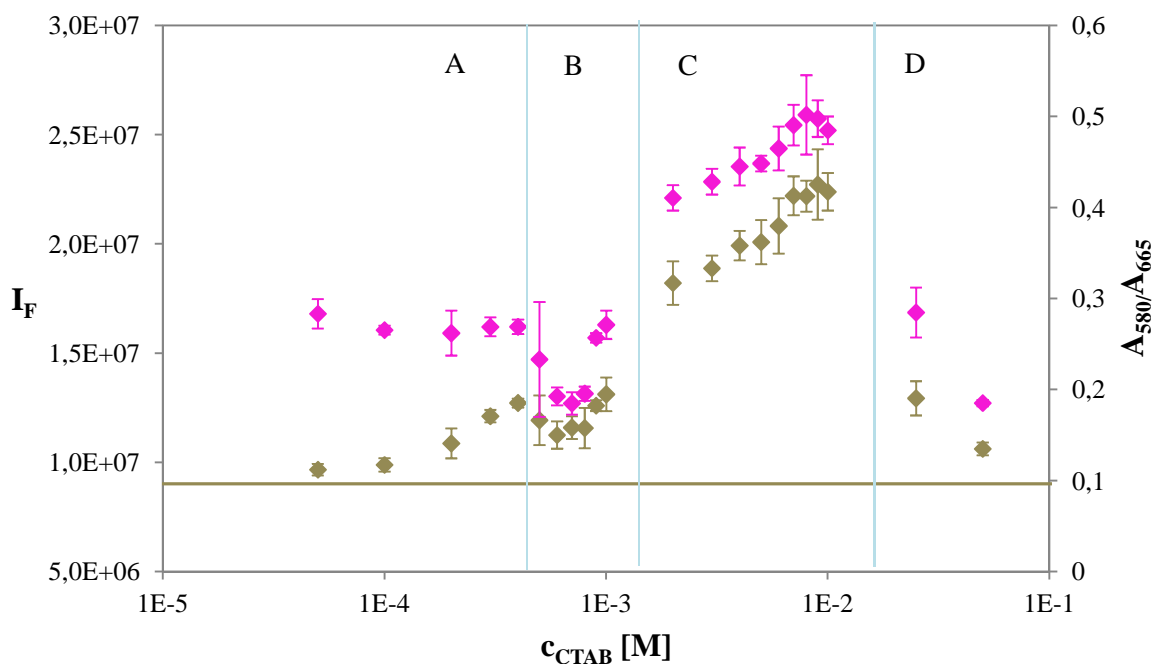
## 5.4.2 Fluorescenční sonda Methylenová modř

Při studiu interakce mezi systémem methylenová modř-hyaluronan a tenzidem CTAB byla měřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci CTAB ve vzorku, za konstantní koncentrace MB ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) a konstantní koncentrace hyaluronanu (zvoleno dle  $(P/D)_e$ ), která byla  $2 \cdot 10^{-1}$  g $\cdot$ l $^{-1}$ .

Oblast A (Obr. 44): Nárůst intenzity fluorescence je doprovázen mírným poklesem poměru  $A_{580}/A_{665}$ . Tyto dvě veličiny zde mají opačný průběh a dle teorie o tvorbě dimerů poukazují na jejich rozpad.

V oblasti B se koncentrace CTAB pohybuje kolem CMC (0,9 mM). V koncentracích těsně pod CMC dochází k poklesu jak intenzity fluorescence, tak i poměru absorbancí  $A_{580}/A_{665}$ . Po překročení obě dvě tyto závislosti prudce stoupají. V oblasti C poté intenzita fluorescence stoupá stejně jako poměr absorbancí. U vzorků v oblasti B a C (v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-2}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$ ) byl pozorován zákal, který se však u posledních dvou vzorků vyčelil. S tímto jevem může být spojen prudký pokles intenzity fluorescence v oblasti D. Zákal byl nejspíše způsoben navázáním micel tenzidu CTAB na vazná místa hyaluronanu v takové míře, že snížila částečně jeho rozpustnost ve vodě a objevil se zákal. Navázáním na tato místa se zároveň uvolnila MB do roztoku a zvýšila tak intenzitu fluorescence.

Stejný průběh intenzity fluorescence a poměru absorbancí dimeru ku monomeru nekorespondují s teorií tvorby dimeru, jelikož tvorba dimeru, na kterou poukazuje vzrůstající poměr  $A_{580}/A_{665}$  intenzitu fluorescence zhaší a ne naopak. K přesnějšímu objasnění této skutečnosti by bylo potřeba dalších cíleně zaměřených experimentů.



**Obr. 44** Porovnání závislosti intenzity fluorescence (zeleně zobrazené body) sondy MB a poměru  $A_{580}/A_{665}$  (růžově zobrazené body) na rostoucí koncentraci tenzidu CTAB ve vzorcích obsahujících konstantní množství fluorescenční sondy MB a konstantní koncentraci hyaluronanu. Osa x je vynesena v logaritmickém měřítku. Tmavě zelená příčka znázorňuje intenzitu fluorescence vzorku, jehož  $P/D = P/D_e = 50$ . V tomto vzorku je koncentrace sondy  $1 \cdot 10^{-5}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  a koncentrace hyaluronanu  $2 \cdot 10^{-1}$  g $\cdot$ l $^{-1}$ .

## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat interakce mezi polyelektrolyty (hyaluronan, polystyrensulfony) a ionogenními fluorescenčními sondami (DAO, 4-Di-2-Asp, MB, DiO, DiA). Dále také provést experimenty k ověření využití těchto sond ve studiu interakcí polyelektrolytu s tenzidem.

První studie byly zaměřeny na interakci mezi ionogenními sondami a hyaluronanem. Jelikož však tyto pokusy ukázaly, že hyaluronan není dostatečně silným polyelektrolytem a některé z těchto výsledků byly obtížně interpretovatelné, byl použit i syntetický polyelektrolyt, a to polystyrensulfony. Tento polyelektrolyt a systémy na něm založené byly nejdříve studovány pomocí fluorescenční sondy DAO, jelikož byla tato sonda používána již v průběhu bakalářské práce, ve které byla ověřena tvorba dimerů v systémech založených na hyaluronanu. S pomocí výsledku měření interakce DAO s polystyrensulfony a jeho systémy byly interpretovány i výsledky dalších sond (MB, 4-Di-2-Asp).

Studie zaměřená na zkoumání interakce mezi polystyrensulfony a ionogenní sondou byla realizována s pěti sondami (DAO, 4-Di-2-Asp, MB, DiO, DiA). Bylo předpokládáno, že se molekuly sondy budou vázat na vazná místa polystyrensulfony (na záporně nabitě sulfonové skupiny) a popřípadě zde tvořit dimery či jiné agregáty. Vzorky jednotlivých měření byly namíchány tak, aby obsahovaly konstantní množství ionogenní fluorescenční sondy a aby bylo dosaženo rostoucí koncentrace polystyrensulfony. Při vlastním měření emisních spekter byl sledován pokles a vzrůst intenzity fluorescence vlivem vzájemných interakcí mezi sondou a polystyrensulfony. Tvorba dimerů (agregátů) byla doprovázena poklesem intenzity fluorescence a naopak rozpad dimerů (agregátů) zvyšováním intenzity fluorescence.

Účelem těchto experimentů bylo nalézt takovou koncentraci polystyrensulfony, při které bude intenzita fluorescence nabývat minimální hodnoty, jelikož v tomto bodě by měly dimery obsadit všechny disociované sulfonové skupiny přítomné na řetězci polystyrensulfony.

V průběhu měření se sondami DiO a DiA bylo pozorováno, že se sorbují jak na skleněný tak i plastový povrch při interakci s hyaluronanem i polystyrensulfony. Nebylo tedy možné nalézt minimální hodnotu intenzity fluorescence a také nebylo možné tyto sondy použít v dalších experimentech se systémem polyelektrolyt-tenzid. Koncentrace sond ve vzorcích totiž nebyla z důvodu sorpce stejná a přesná, což dosvědčovala kolísavá intenzita fluorescence a také vysoké hodnoty směrodatných odchylek, které byly graficky znázorněny pomocí chybových úseček.

**Tabulka 5** *P/D a jim odpovídající koncentrace polyelektrolytu odpovídající nejnižším hodnotám intenzit fluorescence v jednotlivých experimentech*

| Sonda      | Interakce s hyaluronanem |   | Interakce s polystyrensulfony |   |
|------------|--------------------------|---|-------------------------------|---|
|            | (P/D) <sub>e</sub>       | Odpovídající koncentrace [g·l <sup>-1</sup> ] | (P/D) <sub>e</sub>            | Odpovídající koncentrace [g·l <sup>-1</sup> ] |
| 4-Di-2-Asp | 4                        | 1,6·10 <sup>-2</sup>                          | 10                            | 2,05·10 <sup>-2</sup>                         |
| MB         | 50                       | 2·10 <sup>-3</sup>                            | 10                            | 2,05·10 <sup>-3</sup>                         |
| DAO        | –                        | –   | 3                             | 3,125·10 <sup>-3</sup>                        |

Tvorba dimerů (agregátů), která zapříčinila pokles intenzity fluorescence, byla demonstrována pomocí změřených absorpčních spekter. U vynášených poměru absorbancí



v závislosti na P/D bylo u fluorescenčních sond DAO a MB vycházeno z odborných článků. U sondy 4-Di-2-Asp nebyly v literatuře dimery popsány. Bylo vycházeno tedy z naměřených dat a pozorovaného maxima absorbance u předpokládaného agregátu. Tvorba dimerů byla také znázorněna pomocí samotných absorpčních spekter.

Bylo zjištěno, že při interakci ionogenních fluorescenčních sond s polystyrensulfonátem vykazovaly naměřené hodnoty absorbancí přítomnost dimerů. Na tuto skutečnost poukázaly jak hodnoty poměrů absorbancí dimeru (agregátu) ku monomeru, tak i jednotlivá spektra, u kterých bylo vidět pokles a vzrůst maxima jak dimerní tak i monomerní formy, v případě sondy 4-Di-2-Asp i posun maxim absorbancí k delším vlnovým délkám.

V případě interakcí s hyaluronanem již nebyly výsledky tak jednoznačné, jelikož jak u sondy 4-Di-2-Asp tak u MB bylo pozorováno, že absorpční spektra nemění svou polohu a tvar ale pouze intenzitu. V případě sondy MB byl rozsah poměru absorbance dimeru ku monomeru ve velmi malém rozsahu a u sondy 4-Di-2-Asp nemohl být vypočten, jelikož nedocházelo k vykreslení píku agregátu.

Koncentrace polyelektrolyty v bodě ekvivalence byly také použity při měření interakcí s tenzidem. Vzorky obsahovaly konstantní množství ionogenní fluorescenční sondy a také konstantní množství polyelektrolytu s rostoucím množstvím tenzidu CTAB. Interakce mezi systémem polyelektrolyt-fluorescenční sonda byly sledovány také pomocí měření emisních a absorpčních spekter.

Při interpretaci těchto experimentů byla uvažována tvorba dimerů či agregátů jiného typu. V případě, že ionogenní fluorescenční sonda tvoří dimery či agregáty na řetězci polyelektrolytu, je způsoben vzrůst intenzity fluorescence vytěsněním do roztoku a následným rozpadem na monomerní formu. Ionogenní fluorescenční sonda je nejdříve vytěšňována molekulami CTAB a po překročení jeho CMC i utvořenými micelami CTAB. Pokles intenzity fluorescence by byl způsoben opětovným utvářením dimerů (agregátů).

V průběhu diplomové práce bylo zjištěno, že ionogenní fluorescenční sondy jsou vhodné pro výzkum koloidních systémů, zejména pro výzkum syntetického polyelektrolytu – polystyrensulfonátu sodného a systémů, ve kterých je obsažen. Pro výzkum kyseliny hyaluronové se jeví použité fluorescenční sondy méně vhodnou volbou, jelikož při interakci s tímto polyelektrolytem nelze jednoznačně poukázat na tvorbu dimerů či agregátů. Obecně slabší interakce mezi fluorescenčními sondami a hyaluronanem mohla být způsobena působením sterického efektu, svinutím řetězce či velikostí solvatačního obalu, který bránil lepšímu přístupu sondy k řetězci hyaluronanu.

## 7 LITERATURA

- [1] NECAS, J., BARTOSIKOVA, L.: Hyaluronic acid (hyaluronan):a review. *Veterinarni medicina*, 2008, vol. 53, no. 8, s. 397-411
- [2] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, no. 1, s. 17-25
- [3] POGÁNY, P., KOVÁCS, A.: Theoretical study of hyaluronan oligosaccharides. *Structural chemistry*, 2010, vol. 21, no. 6, s. 1185-1194
- [4] *Structure and synthesis of hyaluronan* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <[http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n7/box/nrc1391\\_BX1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n7/box/nrc1391_BX1.html)>
- [5] HASCALL, V. C., LAURENT, T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* Glycoforum [online]. 1997, [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>
- [6] PETHRICK, R. A.: *Handbook of Polymer Research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites*. New York: NOVA PUBLISHERS, 2007. 459 s. ISBN 978-1-60021-652-0.
- [7] LIU, L., LIU, Y.: *Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges and perspectives* Microbial Cell Factories [online]. 2011, [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/pdf/1475-2859-10-99.pdf>>
- [8] ROHRICH, R. J., GHAVAMI, A, CROSBY M. A.: The role of hyaluronic acid Fillem (Restylane) in facial cosmetic Sumery: review and technical considerations. *Plastic and reconstructive surgery*, 2007, vol. 120, no. 6, s. 41-54
- [9] *Hyaluronic acid for the Ocular Surface* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <[http://www.eyecareeducators.com/site/hyaluronic\\_acid\\_for\\_the\\_ocular\\_surface.htm](http://www.eyecareeducators.com/site/hyaluronic_acid_for_the_ocular_surface.htm)>
- [10] *Sodium polystyrene sulfonate.svg* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Sodium\\_polystyrene\\_sulfonate.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Sodium_polystyrene_sulfonate.svg)>
- [11] *Sigma-Aldrich Poly(sodium 4-styrenesulfonate)* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/434574?lang=en&region=CZ>>
- [12] *Sodium Polystyrene Sulfonate powder (Major Pharmaceuticals)* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=65317>>

- [13] *Draselný iont a poruchy jeho homeostázy* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <<http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=2848>>
- [14] *Mikrobicidy* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <<http://www.aids-hiv.cz/mikrobicidy.html>>
- [15] MAUCK, C. K., WEINER, D. H.: Single and multiple exposure tolerance study of polystyrene sulfonate gel: a phase I safety and colposcopy study. *Contraception*, 2004, vol. 70, no. 1, s. 77-83
- [16] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 192 s. ISBN 80-7080-475-0.
- [17] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-X
- [18] *Aggregation amphiphiler Moleküle zu Mizellen, Doppelschichten und Vesikeln* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <[http://www.tu-chemnitz.de/physik/OSMP/Soft/ws0607\\_V10.pdf](http://www.tu-chemnitz.de/physik/OSMP/Soft/ws0607_V10.pdf)>
- [19] *Spherical polymer micelles: nanosized reaction vessels?* [online], [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <<http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/365/1861/2863/F1.expansion.html>>
- [20] *ThermoSpectronic: Basic UV-VIS Theory, Concepts and Applications* [online]. 2008, [cit. 2012-12-17]. Dostupné z: <<http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWeb%20Equipment%20PDFs/5B.%20UV%20VIS%20theory%20ThermoSpectric.pdf>>
- [21] *Basic UV/Visible Spectrophotometry* [online], [cit. 2012-12-17]. Dostupné z: <<http://www.biochrom.co.uk/download/72>>
- [22] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [23] *Introduction to Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV)* [online], [cit. 2012-12-17]. Dostupné z: <<http://www.le.ac.uk/spectraschool/sias/Introduction%20to%20UV-Vis%20Spectroscopy.pdf>>
- [24] SINICA A.: *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra* [online]. 2010, [cit. 2012-12-17]. Dostupné z: <[http://www.vscht.cz/anl/lach1/5\\_Foto.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf)>
- [25] SOMMER, L.: *Analytická spektrometrie I*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s.
- [26] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2004. 166 s. ISBN 80-246-0776-X

- [27] *The Fluorescence Phenomen* [online]. 2004, [cit. 2013-03-18]. Dostupné z: <[http://www.zeiss.com/C125716F004E0776/0/74E9C59C374EFCF2C12571770069E9ED/\\$File/Innovation\\_14\\_4.pdf](http://www.zeiss.com/C125716F004E0776/0/74E9C59C374EFCF2C12571770069E9ED/$File/Innovation_14_4.pdf)>
- [28] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. vyd. Baltimore: School of medicine (University of Maryland), 2006. 954 s. ISBN 0-387-31278-1.
- [29] *Principy fluorescenční spektroskopie* [online], [cit. 2013-03-18]. Dostupné z: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>>
- [30] *Vlastní a nevlastní fluorofory; vlastní luminiscence buněk, fluorescenční sondy a značky* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <[http://fotoskladka.tk/school/statnice/Vlastni\\_a\\_nevlastni\\_fluorofory.pdf](http://fotoskladka.tk/school/statnice/Vlastni_a_nevlastni_fluorofory.pdf)>
- [31] *Metoda live/dead jako monitorovací metoda kvality bioaugmentace aneb využití fluorescenční mikroskopie v bioremediační praxi* [online], [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <[http://www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/2012/10\\_grigel\\_ft.pdf](http://www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/2012/10_grigel_ft.pdf)>
- [32] *Rhodamine-labeled Antibodies* [online], [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <[http://www.kpl.com/catalog/categories.cfm?Catalog\\_ID=17&Category\\_ID=410](http://www.kpl.com/catalog/categories.cfm?Catalog_ID=17&Category_ID=410)>
- [33] *4-Di-2Asp* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D289>>
- [34] *4-(4-(Diethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/36806?lang=en&region=CZ>>
- [35] *Probes for Following Receptor Binding and Phagocytosis* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Endocytosis-Receptors-and-Ion-Channels/Probes-for-Following-Receptor-Binding-Endocytosis-and-Exocytosis.html>>
- [36] *DiO perchlorate* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=22066>>
- [37] *3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine Perchlorate* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<https://products.invitrogen.com/ivgn/product/D275?ICID=search-product>>
- [38] *FluoProbes DiI, DiD, DiO, DiR, DiA* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://www.interchim.fr/ft/4/46804A.pdf>>
- [39] *4-(4-(Dihexadecylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D3883>>

- [40] *Methylene Blue* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene\\_blue](http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue) >
- [41] *Methylene Blue Solution* [online], [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/77515?lang=en&region=CZ>>
- [42] *H and J aggregates* [online], [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <<http://www.dstuns.iitm.ac.in/teaching-and-presentations/teaching/undergraduate%20courses/cy306-structure-and-energetics-of-biomolecules/presentations/H-%20and%20J-%20Aggregates.pdf>>
- [43] MAGRESSI, L., PURVES, D., LICHTMAN, J. W.: Fluorescent Probes that Stain Living Nerve Terminals. *The Journal of Neuroscience*, 1987, vol. 7, no. 4, s. 1207-1214
- [44] MARQUES, M. J., SANTO NETO, H.: Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *The Journal of Anatomy*, 1998, vol. 192, no. 3, s. 425-430
- [45] DE PROOST, I., PINTELON, I., WILKINSON, W. J.: Purinergic signaling in the pulmonary neuroepithelial body microenvironment unraveled by live cell imaging. *The FASEB Journal*, 2009, vol. 23, no. 4, s. 1153-1160
- [46] *4-Di-2-Asp, Selective marker od neuroepithelial bodls in living lung slices od different animal species* [online]. [cit. 2012-11-07]. Dostupné z: <[http://www.focusonmicroscopy.org/2005/PDF/053\\_Pintelon.pdf](http://www.focusonmicroscopy.org/2005/PDF/053_Pintelon.pdf) >
- [47] *Probes for Followinf Receptor Binding, Endocytosis and Exocytosis* [online]. [cit. 2012-11-20]. Dostupné z: <<http://www.mobitec.de/probes/docs/sections/1601.pdf>>
- [48] *Velký lékařský slovník – choroidea* [online]. 2008, [cit. 2012-11-20]. Dostupné z: <<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/choroidea>>
- [49] RANCAN, F., TODOROVA, A.: Stability of polylactic acid particles and repase of fluorochromes upon topical application on human skin explants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, vol. 80, no. 1, s. 76-84
- [50] HONIG, M. G., HUME, R. I.: DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*, 2012, vol. 12, no. 9, s. 333-341
- [51] *Lipophilic tracers – DiI, DiO, DiD, DiA, and DiR* [online]. 2008, [cit. 2013-02-20]. Dostupné z: <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp00282.pdf>>
- [52] *Tracers for Membrane Labeling – Section 14.4* [online]. 2008, [cit. 2013-02-20]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular->

Probes-The-Handbook/Fluorescent-Tracers-of-Cell-Morphology-and-Fluid-Flow/Tracers-for-Membrane-Labeling.html#head3>

- [53] JOHNSON, J. K., CASAGRANDE, V. A.: Prenatal development of axon outgrowth and connectivity in the ferret visual system. *Visual Neuroscience*, 1993, vol. 10, no. 1, s. 117-130
- [54] SNIDER, W. D., ZHANG, L.: Interactions between Dorsal Root Axons and Their Target Motor Neurons in Developing Mammalian Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 1992, vol. 12, no. 9, s. 3494-3508
- [55] BHOWNIK, B. B., BASU, S., RAY, D.: Photophysical studies of 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine dye in model biological membranes and different solvents. *Chemistry and Physics of lipids*, 2001, vol. 109, no. 2, s. 175-183
- [56] TAFULO, P. A. R., QUIERÓS, R. B., GONZÁLES-AGUILAR, G.: On the „concentration-driven“ methylene blue dimerization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, vol. 73, no. 2, s. 295-300
- [57] JUNQUIERA, H. C., SEVERINO, D.: Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2002, vol. 4, no. 11, s. 2320-2328
- [58] *Velký lékařský slovník: kardiolipin* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <<http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/kardiolipin>>
- [59] *Apoptóza a nekróza* [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <<http://www.biomach.cz/biologie-bunky/apoptoza-nekroza>>
- [60] PETIT, J.-M., MAFTAH, A., RATINAUD, M.-H.: 10N-Nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem*, vol. 209, s. 267-273
- [61] STIBORSKÝ, Filip. *Srovnávací studie interakcí tenzidů s hyaluronanem a jinými polyelektrolyty*. FCH-DIP0626/2011. Dostupné z: <<http://hdl.handle.net/11012/4837>>
- [62] DEGREVE, L., CALIRI, A.: Geometric constraints in polymer chaos: analysis on the pearl-necklace model by Monte Carlo simulation. *Journal of molecular structure*, 1995, vol. 335, s. 123-127

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|   |  |
|---|--|
| DiO   | 3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanine perchlorát   |
| DiA   | 4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid  |
| 4-Di-2-Asp  | 4-(4-(Diethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium jodid  |
| HA  | kyseliny hyaluronová   |
| Da  | dalton, jednotka molekulové hmotnosti, používaná převážně v biochemii 1 Da = 1 g·mol <sup>-1</sup> |
| PAL   | povrchově aktivní látky  |
| CMC   | kritická micelární koncentrace   |
| CPP   | kritický agregační parametr  |
| UV  | ultrafialová část elektromagnetického záření   |
| VIS   | viditelná část elektromagnetického záření  |
| $\Phi_0$  | dopadající zářivý tok  |
| $\Phi$  | prošlý zářivý tok  |
| T   | transmitance   |
| A   | absorbance   |
| $\epsilon_\lambda$  | molární absorpční koeficient   |
| c   | molární koncentrace  |
| l   | délka optické dráhy  |
| $\lambda$   | vlnová délka   |
| M   | zkratka pro mol·l <sup>-1</sup>  |
| IR  | infračervená část elektromagnetického záření   |
| S <sub>0</sub> , S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub>                          | singletový stav příslušné energetické hladiny  |
| T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>   | tripletový stav příslušné energetické hladiny  |
| DiI   | 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorát                                  |
| MB  | methylenová modř   |
| DAO   | dodecylakridinová oranž  |
| PLA   | polymlečná kyselina  |
| PC  | fosfatidylcholin   |
| SDS   | dodecylsírán sodný   |
| CL  | kardiolipin  |
| CTAB  | cetyltrimethylamonium bromid   |
| P   | polymer – vazná místa  |
| D   | koncentrace barviva, fluorescenční sondy   |
| I <sub>F</sub>  | intenzita fluorescence   |
| A   | absorbance   |
| A <sub>max</sub>  | maximum absorbance   |
| A <sub>474</sub> , A <sub>493</sub> , A <sub>580</sub> , A <sub>665</sub> | absorbance při příslušné vlnové délce  |
| CAC   | kritická agregační koncentrace   |