

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

# FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

# ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE VE VÝZKUMU INTERAKCÍ HYALURONANU A KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE IN RESEARCH OF HYALURONAN-COLLOIDAL SYSTEMS INTERACTIONS

### ZKRÁCENÁ VERZE DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

Ing. Jakub Mondek

AUTHOR

ŠKOLITEL SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

**BRNO 2017** 

#### OBSAH

1	ÚV	OD	3				
2	SOL	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY4					
	2.1	2.1 Anizotropie fluorescence					
2.2 Přenos protonu v excitovaném stavu							
	13						
		2.3.1 Video-mikroreologie a dynamický rozptyl světla	13				
		2.3.2 FCS mikroreologie	14				
3	CÍL	CÍLE PRÁCE					
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 15						
	4.1	Charakterizace hydratačního obalu hyaluronanu pomocí 3-hydroxy-2-naftolové k	yseliny 15				
	4.2	Charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt	15				
	4.3	Mikroreologie pomocí časově-rozlišené fluorescenční korelační spektroskopie15					
5	DIS	SKUZE NEJVÝNAMĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	18				
	5.1 Charakterizace hydratačního obalu hyaluronanu pomocí 3-hydroxy-2-naftolové						
5.2 Charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt		Charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt	19				
		5.2.1 1-naftol v CTAB	20				
		5.2.2 1-naftol v Septonexu	21				
		5.2.3 Interakce polymer-tenzid	22				
	5.3	Mikroreologie pomocí časově-rozlišené fluorescenční korelační spektroskopie	25				
6	ZÁV	VĚR	29				
7	SEZ	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY					
8	ŽIV	ŽIVOTOPIS					
9	SEZ	SEZNAM PUBLIKACÍ					

# MÍSTO ULOŽENÍ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika

# 1 ÚVOD

Vybavení pro časově rozlišenou fluorescenci se v poslední době stalo nedílnou součástí laboratoří zabývajících se fluorescenční spektroskopií nebo například buněčným či molekulárním zobrazováním. Doba života je jednou z nejdůležitějších vlastností fluoroforu a díky pokročilým technologiím, a tedy i příznivější ceně instrumentace pro časově rozlišenou fluorescenci, respektive pro tzv. time-correlated single photon counting – neboli TCSPC – tedy detekci jediného fotonu, je tato metoda široce využívána nejen pro stanovení doby života fluoroforu.

Stacionární fluorescenci ovlivňuje vzdušný kyslík, koncentrace fluoroforu či výběr vlnové délky. Při měření časově rozlišené fluorescence můžeme tyto limitace obejít, protože doba života na výše zmíněných faktorech závislá není (kromě tedy vlnové délky při reakcích v excitovaném stavu). Samozřejmě bez stacionární fluorescence se žádný fluroescenční experiment neobejde, protože emisní spektrum patří k základním charakteristikám vzorku. Ale měření doby života nám poskytne další informace zkoumaného systému. Procesy v excitovaném stavu lze vidět sice i na emisním spektru vzhledem k tvorbě nového píku u větších vlnových délek. pyrenu, tvorba excimeru může být exciplexu Příkladem anthracenu а dimethylanilínu nebo přenos protonu v excitovaném stavu, ale díky měření doby života můžeme pozorovat změnu emisního spektra s časem. Také kinetiku deexcitačních procesů lze spočítat díky měření doby života. Pokud zvážíme rozdíl mezi stacionární a časově rozlišenou anizotropií, dostáváme se s měřením vyhasínání anizotropie k mnohem širšímu měřítku možností stanovení vlastností systémů. Můžeme například definovat rotační pohyb fluoroforu v prostředí, případně v organizovaném systému nebo difuzní koeficienty pohybu fluoroforu i sledovaného systému.

Hyaluronan je v dnešní době spojován především s lékařstvím jakožto látka pro efektivnější hojení ran nebo s kosmetikou jakožto látka vyhlazující vrásky. Nesmíme však opomenout úlohu hyaluronanu při vývoji nosičových systémů pro léčiva. Jelikož hyaluronan reaguje na CD-44 receptor rakovinných buněk, byl by skvělou jednotkou pro vyhledávání těchto receptorů v organismu. Z toho důvodu je hyaluronan spojován se širokým výzkumem nosičových systémů založených na hyaluronanu jakožto způsobu dopravy a nějakého nosiče (příkladem lze uvést tenzid, dendrimer či fosfolipid) pro solubilizaci léčiva. Samozřejmě ideální cestou je vytvoření polymerní micely, čímž by se pravděpodobně docílilo vysoké stability systému, ale v úvahu připadají i nekovalentní, například elektrostatické, interakce.

Otázkou ale je, jestli ovlivňuje hydratace hyaluronanu elektrostatické interakce s opačně nabitými systémy a jak tento fakt může ovlivnit zkoumaný systém. Fluorescenční měření otevírají cestu pro výzkum vlivu hydratace polymerů na interakce s dalšími systémy. Zejména časově-rozlišená fluorescence a pokročilé metody fluorescenčních technik nám mohou pomoci tyto informace odhalit.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Fluorescenční spektroskopie představuje jednu z nejvíce používaných metod pro studium různých systémů vzhledem k citlivosti fluorescence na změny prostředí, jako jsou polarita, viskozita nebo pH.

#### 2.1 ANIZOTROPIE FLUORESCENCE

Další důležitou oblast fluorescence při studiu hydratace polymerů a studiu interakcí mezi agregáty a polymery představuje anizotropie fluorescence, a to opět stacionární i časově-rozlišená anizotropie. Anizotropie představuje fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem. Excitovány jsou pouze ty molekuly, jejichž přechodový moment je paralelní s elektrickým vektorem excitačního záření. Tím pádem může být anizotropie fluorescence použita například pro určení viskozity mikroprostředí [1]. Nyní uvažujme hydrofilní polymer a hydrofilní fluorescenční sondu. V některých případech lze pozorovat různé hodnoty emise fluorescence nebo různé hodnoty anizotropie s rostoucí koncentrací polymeru. U některých roztoků polymerů můžeme vodu rozdělit na volnou vodu a na vodu vázanou u polymeru. Každá z nich má lehce jinou strukturu, což umožňuje rozpoznat, jestli se fluorescenční sonda například adsorbuje na polymer nebo zůstane ve volné vodě. Pal a spol. zkoumali emisi 3-hydroxy-2-naftolové kyseliny v přítomnosti hydrofilního polymeru poly N-vinyl-2-pyrrolidonu (PVP). Pozorovali zvýšení anizotropie fluorescence se zvyšující se koncentrací polymeru. Pomocí porovnání výsledků intenzity fluorescence, stacionární a časově-rozlišené anizotropie i výpočtem vazebných konstant usoudili, že voda vázaná u PVP se výrazně liší od volné vody [2]. Vazebnou konstantu lze tedy v tomto případě spočítat dvěma způsoby. U intenzity fluorescence lze použít modifikovanou Benesi-Hilderbrandovu rovnici [3]:

$$\frac{\left(F_{\infty} - F_{0}\right)}{\left(F_{X} - F_{0}\right)} = 1 + \frac{1}{K[L]},\tag{1}$$

kde  $F_0$  představuje intenzitu fluorescence emise fluorescenční sondy v absenci polymeru,  $F_x$  intenzitu fluorescence při střední koncentraci a  $F_\infty$  při koncentraci, kde proběhne kompletní interakce. *K* představuje vazebnou konstantu a *L* je koncentrace polymeru. Pokud tedy vyneseme závislost  $\frac{(F_\infty - F_0)}{(F_x - F_0)}$  na reciproké hodnotě koncentrace polymeru, získáme ze směrnice vazebnou konstantu.

Stacionární anizotropie měřená jako funkce koncentrace polymeru může být také použita pro výpočet vazebné konstanty. Je potřeba zjistit kvantové výtěžky fluorescence volné a vázané sondy, změřit anizotropii volné fluorescenční sondy při střední koncentraci polymeru a následně získat limitní hodnotu anizotropie. Následně lze vypočítat frakci vázané fluorescenční sondy podle následující rovnice:

$$F_b = \frac{\left(r - r_f\right)}{\left[\left(r - r_f\right)\right] + R\left(r_b - r_f\right)},\tag{2}$$

kde *r* představuje anizotropii při střední koncentraci polymeru,  $r_f$  anizotropii volné sondy a  $r_b$  vázané sondy. *R* představuje poměr kvantových výtěžků. Jelikož frakci volné sondy lze spočítat z  $F_f = 1 - F_b$ , pak z obou frakcí lze zjistit vazebnou konstantu [4]. Vazebné konstanty zjištěné pomocí stacionární fluorescence a anizotropie by se samozřejmě měly rovnat. Dále v případě PVP byly vazebné konstanty řádu 10<sup>4</sup>, rotační korelační čas byl mnohem menší než při srovnání s jinými polymery (albumin hovězího a lidského séra), z čehož plyne, že se sonda adsorbuje na povrchu polymeru [5].

Stejným způsobem zkoumali *Mallick a spol.* vazebnou konstantu reakce albuminu lidského a hovězího séra s 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H-indolo-[2,3-a] chinolizinem. Porovnáním vazebných konstant zjistili, že se fluorescenční sonda, která zároveň podstupuje intramolekulární přenos náboje, váže silněji k lidskému serum albuminu [6]. Vypočtené hodnoty zároveň podle dalších prací spadaly do tohoto typu komplexace [5], [7].

Stejně jako platí u stacionární a časově rozlišené fluorescence, i stacionární a časově-rozlišená anizotropie se liší kontinuálním ozařováním a sledováním anizotropie za určitý časový úsek a pozorováním vyhasínání anizotropie, které následuje po krátkém excitačním pulzu. Vyhodnocením měření časově-rozlišené anizotropie je rotační korelační čas. U sférické molekuly by vyhasínání anizotropie mělo být monoexponenciální neboli by z iterativní rekonvoluce měl být získán pouze jeden rotační korelační čas. Ovšem měření časově-rozlišené anizotropie v koloidních systémech bývá většinou multiexponenciální. Pokud budou molekuly fluoroforu nesférické nebo bude populace excitovaného stavu okupována molekulami, které budou v různých prostředích, dostaneme multiexponenciální vyhasínání anizotropie. V případě micel lze také získat multiexponenciální vyhasínání anizotropie, ale nemusí to být kvůli distribuci fluorescenční sondy ve vodné fázi a uvnitř micely. Pokud se poměr relativních amplitud rychlého a pomalého rotačního korelačního času liší o dvoj- až trojnásobek od poměru frakce volné a vázané sondy k micele (lze stanovit z vazebných konstant), pak je multiexponenciální vyhasínání anizotropie způsobeno rotační difuzí sondy vázané k micele [8]. Pozorované biexponenciální vyhasínání anizotropie může být připsáno dvěma druhům pohybu podle tzv. "wobbling-in-cone" modelu [9]. Tento model předpokládá, že fluorofor se pohybuje laterální difuzí po zakřiveném povrchu micely a rychlým kolíbavým pohybem (wobbling motion) v imaginárním kuželu, který je spojen s rotací micely. Pozorovaný pomalý  $(\varphi_2)$  a rychlý  $(\varphi_1)$  rotační korelační čas je spojen s časovou konstantou laterální difuze  $(\tau_L)$ , kolíbavého pohybu  $(\tau_w)$  a celkovou rotací micely  $(\tau_M)$  podle rovnic:

$$\frac{1}{\varphi_{1}} = \frac{1}{\tau_{W}} + \frac{1}{\tau_{L}} + \frac{1}{\tau_{M}}$$

$$\frac{1}{\varphi_{2}} = \frac{1}{\tau_{L}} + \frac{1}{\tau_{M}}$$
(3)

Podle výše zmíněného modelu lze křivku vyhasínání anizotropie popsat rovnicí:

$$r(t) = r_0 \left[\beta \exp\left(-\frac{t}{\varphi_2}\right) + (1-\beta) \exp\left(-\frac{t}{\varphi_1}\right)\right],\tag{4}$$

kde  $\beta = S^2$ . Parametr S představuje prostorové omezení pohybu sondy uvnitř micely a může nabývat hodnot  $0 \le S^2 \le 1$ . S může být také použit pro lokalizaci fluorescenční sondy v micele. Pokud platí, že S = 0, pak je pohyb sondy izotropický. Jestli se ale |S|=1, pak je pohyb zcela omezen. Jelikož jádro micely tvoří tekuté uhlovodíky, sonda nacházející se v jádru micely by měla hodnotu S = 0 a kolíbavý pohyb by byl izotropický. Kdežto při S blížící se jedné bude pohyb ve velké míře omezen a sonda se bude nacházet v palisádové vrstvě micely [10]. Další možností, jak zjistit pozici fluorescenční sondy, je zhášení fluorescence. Deumié a spol. zkoumali pozici derivátů pyrenu pomocí zhášení fluorescence deriváty jódu (Obr. 1). Každý z příslušných derivátů by měl dosáhnout do jiné části erytrocytové membrány a podle účinnosti zhášení lze poznat, ve které části membrány se jednotlivé deriváty pyrenu nachází [11]. Lokalizace fluorescenční sondy nebo léčiva pomocí zhášení sloučeninami jódu se dále využívalo v micelách nebo fosfolipidových membránách [11], [12]. Využívá se však i dalších zhášečů pro lokalizaci molekul v různých agregátech [13].



Obr. 1 Schématické zobrazení pyrenových derivátů, zhášečů a jejich předpokládané pozicei ve fosfolipidové dvojvrstvě [11]

#### 2.2 PŘENOS PROTONU V EXCITOVANÉM STAVU

Přenos protonu v excitovaném stavu, a to intermolekulární i intramolekulární, představuje jeden z nejcitlivějších procesů pro studium hydratace mnoha různých systémů. Mechanismus přenosu protonu v excitovaném stavu v micelárním prostředí může být popsán například následujícím schématem [14]:

Schéma 1 Schéma kinetiky přenosu protonu v excitovaném stavu

Ve Schéma 1  $(A^*...H_3O^+)$  reprezentuje rozčleněný pár na povrchu micely. Rozčleněná reprotonace, charakterizována rychlostní konstantou  $k_{rec}$ , soutěží s rychlostní konstantou disociace rozčleněného páru  $(k_{diss})$  a s vyhasínáním excitované molekuly  $A^*$  do základního stavu  $(k_A)$ . Mechanismus popisující Schéma 1 může být přepsán ve smyslu diferenciální rovnice:

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t} \begin{bmatrix} \mathrm{A}\mathrm{H}^{+} \\ \mathrm{A}\cdots\mathrm{H}^{+} \\ \mathrm{A} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & k_{\mathrm{rec}} & 0 \\ k_{\mathrm{PT}} & -Y & k_{\mathrm{p}} \begin{bmatrix} \mathrm{H}^{+} \end{bmatrix}_{\mathrm{w}} \\ 0 & k_{\mathrm{diss}} & -Z \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \mathrm{A}\mathrm{H}^{+} \\ \mathrm{A}\cdots\mathrm{H}^{+} \\ \mathrm{A} \end{bmatrix},$$
(5)

kde

$$X = k_{\rm PT} + k_{\rm AH^+} \approx k_{\rm PT}$$
  

$$Y = k_{\rm rec} + k_{\rm diss} + k_{\rm A}$$
  

$$Z = k_{\rm p} \left[ {\rm H^+} \right]_{\rm w} + k_{\rm A}$$
(6)

Pokud disociace rozčleněného páru je nevratná, může se zanedbat  $k_p [H^+]_w$ , takže pro *Z* získáme rovnici  $Z = k_p [H^+]_w + k_A \approx k_A$ . Disociace rozčleněného páru je nevratná, pokud pH vzorku přesáhne hodnotu 3 [14]. Nakonec lze všechny potřebné rychlostní konstanty vypočítat podle následujících rovnic:

$$X = \frac{R\lambda_3 + \lambda_2}{R+1}$$

$$Y = \lambda_3 + \lambda_2 - X$$

$$k_{PT} = X - k_{AH^+} \approx X \quad \text{, kde z relativních amplitud se } R = \frac{A_3}{A_2} \text{ a } \lambda_3 = \frac{1}{\tau_3}, \lambda_2 = \frac{1}{\tau_2} \qquad (7)$$

$$k_{rec} = \frac{XY - \lambda_3 \lambda_2}{k_{PT}}$$

$$k_{diss} = Y - k_A - k_{rec}$$

Diferenciální rovnice 5 předpokládá existenci triexponenciální vyhasínací křivky, kde jednotlivé doby života by měly patřit protonované formě fluorescenční sondy, rozčleněnému páru a deprotonované formě fluorescenční sondy. Pokud ale uvažujeme, že Schéma 1 určuje přítomnost tří kineticky relevantních objektů (tedy neutrální formu, rozčleněný pár a aniontovou formu), pak by měla křivka vyhasínání neutrální formy vykazovat tetraexponenciální funkci a aniontová forma by měla vykazovat triexponenciální funkci. Ve skutečnosti ale nad pH větší jak 3 neprobíhá zpětná reakce A<sup>\*</sup>, takže pro vyhasínání při emisní vlnové délce neutrální i aniontové formy se očekává triexponenciální křivka vyhasínání.

Výše je již zmíněný případ využití 3-hydroxy-2-naftolové kyseliny (3HNA) při studiu hydratace poly-N-vinyl-2-pyrrolidonu. 3HNA podstupuje intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu (ESIPT) [2]. V prostředí jiných použitých polymerů nedocházelo ke zvýšení ESIPT emise se zvyšující se koncentrací polymeru. Zkoumali tedy mikroprostředí fluorescenční sondy v prostředí PVP-voda a tyto výsledky srovnávali se směsí rozpouštědel acetonitril-toluen. Z anizotropie, rotačních korelačních časů a hypsochromního posunu emisních spekter usoudili, že se fluorescenční sonda 3HNA sorbuje na polymer a je obklopena vodou vázanou na polymer [2].



Schéma 2 Zobrazení 3HNA v jeho neutrální a aniontové formě v základním a excitovaném stavu

Intramolekulárního přenosu protonu lze také využít jako senzoru. Například *Maity a spol.* zkoumali interakci mezi albuminem hovězího a lidského séra a 3-hydroxy-2naftolovou kyselinou a zjistili, že lze 3HNA použít jako senzor pro serum albuminy vzhledem ke zvýšení kvantového výtěžku a doby života v prostředí albuminu při srovnání s vodou. Vazebná konstanta interakce 3HNA s albuminy byla v řádu 10<sup>5</sup> a rotační korelační časy ukazovaly omezenější pohyb [15]. Interakce 3HNA se serum albuminy byla využita i pro studium přenosu energie ze singletového stavu proteinu do ESIPT singletového stavu 3HNA [16]. Dále při tvorbě komplexu 3HNA se zirkonem a  $\beta$ -cyklodextrinem se zvýší intenzita fluorescence a dochází k hypsochromnímu posunu excitační vlnové délky a emisní vlnová délka se posune batochromně. Tato studie *Canady-Canady* a *Rodriguez-Cacerese* vznikla za účelem detekovat 3HNA v říčních tocích, protože 3HNA dráždí kůži, může způsobit poškození zraku a je potenciální teratogen [17].

Das a spol. použili 2-(2'-furyl)-3-hydroxychromon (FHC) pro studium intramolekulárního přenosu protonu v micelárních systémech [10]. Zkoumali vliv hydratace micel na intramolekulární přenos protonu FHC v závislosti na hydrofilní skupině tenzidu a velikosti řetězce hydrofobní části. Zjistili, že intramolekulární přenos protonu je extrémně citlivý na hydrataci micel, s čímž souvisí i náboj hydrofilní části micely. Bylo zjištěno, že čím rychlejší byl přenos protonu (nízká intenzita fluorescence u 420 nm a vysoká u 540 nm), tím méně hydratované byly micely. Nejrychlejší přenos protonu se odehrával v kationtových micelách, protože hydrofilní část micely CTAB či TTAB obsahuje hydrofobní methylové skupiny, které brání většímu přístupu molekul vody. To způsobí, že intramolekulární vodíkové vazby FHC nejsou ovlivněny intermolekulárními vodíkovými vazbami s molekulami vody ve Sternově vrstvě. U SDS je efekt přesně opačný. Protože sulfoniová skupina SDS zajišťuje silnou hydrataci Sternovy vrstvy, je FHC ovlivněno intermolekulárními vodíkovými vazbami a přenos protonu je v těchto micelách nejpomalejší. Dalším faktorem ovlivňujícím dynamiku přenosu protonu v FHC byl náboj micely. Protože FHC nese záporný náboj, elektrostatická interakce mezi kationtovou palisádovou vrstvou micely a FHC způsobila urychlení přenosu protonu. Jelikož micely SDS nesou, stejně jako FHC, záporný náboj, následným odpuzováním dojde ovlivnění intramolekulární vodíkové k vazbv intermolekulárními vodíkovými vazbami, což vede ke zpomalení dynamiky přenosu protonu. Vzhledem k poly (etylen oxidovému) řetězci neiontových micel lze popsat hydrataci přibližně na půl cesty mezi kationtovými a aniontovými micelami. Snižuje-li se délka řetězce, snižuje se i rychlost přenosu protonu ve všech typech micel. Kratší řetězec má za následek, že je micela méně hustě uspořádaná, čímž umožní silnější hydrataci všech druhů micel, a to vede ke snížení rychlosti přenosu protonu



Obr. 2 Nahoře: a) Iontová b) neiontová micela. Dole: Schéma nevratného přenosu protonu v excitovaném stavu [10]

Pro zkoumání hydratace pomocí intermolekulárního přenosu protonu v excitovaném stavu se využívá také fluorescenční sondy 1-naftolu. Neutrální forma naftolu má maximum emise při 350 nm a aniontová forma při 450 nm [18]. V nepřítomnosti vody převládá u 1-naftolu emisní pík neutrální formy, ale vody podstupuje v přítomnosti neutrální forma naftolu přenos protonu v excitovaném stavu a dominantním píkem se stává pík při 450 nm, tedy aniontová forma. Kumar a Mishra použili 1-naftol pro studium hydratace polyvinyl alkoholu (PVA). Po umístění PVA filmu do vody byla zaznamenávána emisní spektra každých 15 s, kde byl vidět pokles neutrálního píku u 342 nm se současným nárůstem aniontového píku u 464 nm. Zároveň byl vypozorován izoemisní bod, který značí rovnováhu mezi dvěma stavy fluorescenční sondy s rostoucí aniontovou formou na úkor neutrální formy. Pomocí fluorescenčních měření, kalorimetrických měření a použití modelu pro botnání hydrogelu usoudili, že se 1-naftol adsorbuje na vázané vodě polymeru a navrhli 1-naftol jako fluorescenční senzor pro specifickou detekci vázané vody v PVA hydrogelech [19].

Fluorescenčních měření 1-naftolu využili Pal a spol. pro studium vodních klastrů v hydrofobním rozpouštědle. Předpokladem bylo, že voda bude formovat

v hydrofobním rozpouštědle nanoskopické útvary a s přibývajícím množstvím vody budou tyto útvary růst a budou solubilizovat stále větší množství 1-naftolu. Solubilizace fluorescenční sondy by se měla projevit na emisních spektrech naftolu. Z emisních spekter 1-naftolu zjistili, že snižování intenzity fluorescence u 350 nm a vzájemný nárůst intenzity fluorescence u 450 nm je důsledkem tvorby stále větších vodních klastrů v dioxanu. Při zastoupení vody v dioxanu 79 % byla provedena časově-rozlišená měření. Bylo měřeno vyhasínání fluorescence při různých vlnových délkách, z nichž bylo následně sestaveno časově-rozlišené emisní spektrum (TRES). Z TRES byla patrná reakce v excitovaném stavu. V čase 0 ns je vidět pouze jeden pík značící neutrální formu naftolu, ale s časovým postupem se objevuje druhý pík, který představuje přenos protonu v excitovaném stavu a formování aniontu naftolu. Intenzita tohoto nového píku dále roste, z čehož je možné vypočítat kinetiku tvorby naftolového iontu. Z vyhasínání fluorescence bylo dále zjištěno, že doba života delší komponenty (kratší patří přenosu protonu) se dále zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou (z 2,4 ns na 10 ns). Doba života se zvyšuje, protože neutrální molekuly naftolu, které jsou stabilizované solvatací, musí překonat vyšší solvatační energetickou bariéru kvůli reakci v excitovaném stavu (Obr. 3). Ve vodě dochází k deprotonaci neutrálního naftolu za 35 ps [20], kdežto ve směsi vodadioxan (79 %) za 220 ps. Zpomalení reakce má pravděpodobně 2 důvody. Jedním je lokální koncentrace molekul vody v blízkosti excitované molekuly naftolu. Aby došlo k přenosu protonu v excitovaném stavu, musí být okolo sondy asi 30-50 molekul vody [21]. Toto číslo bude ve vodních klastrech v dioxanu pravděpodobně menší, proto je ESIPT reakce pomalejší. Druhým důvodem je pomalejší reorganizace molekul vody do klastrů než v samotné vodě. Dále byla studována závislost teploty na proces solvatace. Bylo zjištěno, že zvýšení teploty zrychlilo solvatační proces, protože se kvůli vyšší teplotě narušily některé vodíkové vazby, což mělo za následek tvorbu menších vodních klastrů [22].



Obr. 3 Schématické znázornění solvatace v excitovaném stavu 1-naftolu při přenosu protonu [22]

Fayer a spol. studovali přenos protonu a vodné prostředí v nafionových membránách palivových článků a v reverzních micelách aerosolu OT pomocí stacionární a časově-rozlišené fluorescence sondy pyraninu (1-hydroxy-3,6,8pyrentrisulfonová kyselina - HPTS) a metoxy derivátu HPTS - MPTS. Pomocí emisních spekter a měřením doby života dospěli k závěru, že vodné prostředí nafionu je podobné vodnému mikroprostředí reverzních micel AOT. Díky přenosu protonu byli schopní zkoumat strukturu vody v závislosti na různém stupni hydratace. Zjistili, že se vodní struktura mění na rozhraní vodné a hydrofobní fáze. Voda na rozhraní je mnohem méně mobilní než voda uvnitř reverzní micely (tzv. bulk water). Pokud se fluorescenční sonda dostane do vodného prostředí na rozhraní, dojde k redukci přenosu protonu v excitovaném stavu. Pokud je nafion i reverzní micela AOT méně hydratovaná, sníží se její velikost a míra přenosu protonu díky tomu, že v dosahu jsou pouze molekuly vody u rozhraní. Použití metoxy formy HPTS (MPTS) bylo stěžejní při měření časově-rozlišené anizotropie, protože MPTS nepodstupuje v excitovaném stavu přenos protonu a jeho umístění v požadovaném systému by mělo být stejné, jako tomu bylo u HPTS. Při nízké hydrataci byla rotační difuze omezená s malou dobou vyhasínání a značnou zbytkovou anizotropií. Zvyšování hydratace vedlo k vymizení zbytkové anizotropie a rotační dynamika byla téměř stejná jako v čisté vodě [23].

Přenosu protonu v excitovaném stavu lze také využít v dalších koloidních systémech [24] cyklodextrinech [25] nebo při interakci polymeru a tenzidu [26]. Zásadní práce týkající se přenosu protonu v excitovaném stavu 1-naftolu v micelách vznikla v laboratořích okolo skupiny Kankana Bhattacharyyi a spol. [24] Jak již bylo známo, ESPT proces je výrazně zpomalen ve směsi vody a alkoholu a v čistém alkoholu se na emisních spektrech ukazuje pouze neutrální pík naftolu, takže je kompletně zabráněno deprotonaci této sondy [27]. Pokud se naftol solubilizuje v micelách, měla by se změnit i dynamika přenosu protonu. Ve vodě bude pozorován pouze pík při 450 nm, tedy emisní pík aniontu. Při solubilizaci 1-naftolu do micel dojde ke změně prostředí okolí naftolu a pozorujeme zvýšení intenzity emise neutrálního píku na úkor aniontu naftolu. Dále ukázali, že dynamika přenosu protonu bude jiná v různých tenzidech. V micelách CTAB narostla intenzita emise u 360 nm 20krát a u 460 nm 6krát oproti vodě. U Tritonu X-100 narostla intenzita neutrální formy (360 nm) 90krát a intenzita aniontové formy (460 nm) 1,5krát oproti vodě. U SDS micel narostla intenzita neutrální formy 66krát, ale intenzita aniontové formy dvakrát poklesla.

Pomocí časově-rozlišené fluorescence zjistili, že se doba života obou forem naftolu mění s druhem micel a že není ustavena rovnováha mezi neutrální a aniontovou formou naftolu v excitovaném stavu, když jsou jeho molekuly vázány v micelách. V CTAB je podle časově-rozlišených měření (nebyla naměřena žádná krátká doba života odpovídající neutrální formě) pouze aniontová forma naftolu. I když by micely CTAB měly obsahovat nejméně molekul vody, je v tomto prostředí

pouze emise aniontové formy. Tvorba aniontové formy je přisuzována vyhasínání neutrální formy naftolu a vysoké koncentraci hydroxylových iontů v bezprostřední blízkosti micely. V Tritonu X–100 byla zaznamenána emise obou forem naftolu, protože emisní spektra vykazovala 2 píky a doba života aniontu se protáhla na 14 ns. Toto pozorování se shoduje s pozorováním přenosu protonu v naftolu ve směsích voda–alkohol [27]. U SDS přiřazují emisi z micel pouze neutrální formě a emisi aniontové formy z vody, protože jakmile je aniont vytvořen, okamžitě je odpuzen z micely SDS do vody. Co se týká interakcí tenzidu a polymeru, lze pomocí ESPT zkoumat i tyto interakce. Příkladem může být interakce SDS a hydroxypropyl celulózy [26]. Jakmile bylo dosaženo kritické agregační koncentrace, došlo k výraznému snížení dynamiky přenosu protonu, takže došlo ke zvýšení emisního píku neutrálního naftolu. Koncentrace, při které došlo k nárůstu intenzity fluorescence NpOH, byla nižší než CMC SDS.

Využití ESPT procesu při interakci polymeru a tenzidu ukázali Sahu a spol. také při interakci CTAB a lysozymu [28]. Jako fluorescenční sondu použili pyranin. Pomocí intenzity fluorescence neutrálního naftolu dokázali stanovit CMC CTAB a následně kritickou agregační koncentraci CTAB v prostředí lysozymu, která byla nižší jak CMC samotného CTAB. Díky kinetickým výpočtům ještě ukázali, že lysozym ovlivňuje rychlostní konstanty deprotonace, rekombinace a disociace rozčleněného páru. Rychlostní konstanty všech procesů byly vyšší než v samotném CTAB. Výsledky tedy ukazují, že mikroprostředí v agregátu CTAB-lysozym je odlišné od mikroprostředí okolí sondy v CTAB. Dynamiku přenosu protonu pyraninu využil Ghosh a spol. při studiu supramolekulárního útvaru vzniklého z triblokového kopolymeru a cetyltrimethyl amonium chloridu (CTAC) [29]. Stejně jako v předchozím případě stacionární i časově-rozlišená fluorescence ukázali změnu v intenzitě fluorescence či dobách života v různých prostředích. Rychlostní konstanty v příslušných agregátech byly opět výrazně odlišné od čisté vody, což značí rozdíl v polaritě mikroprostředí okolí sondy. Rychlostní konstanta deprotonace v supramolekulárním útvaru se liší od rychlostní konstanty deprotonace v CTAC, ale rozdíl není tak velký jako v předchozím případě, což značí menší ovlivnění mikroprostředí kopolymerem než v případě lysozymu a CTAB.

#### 2.3 PASIVNÍ MIKROREOLOGIE

Mikroreologické techniky, především videomikroreologie, jsou hojně využívány v různých oblastech výzkumu, a to především díky své schopnosti nedívat se na vzorek jako na celek, jako v případě klasické reologie (i když často jsou mikroreologická měření použita jako doplňková ke klasické reologii [30]), ale jelikož je možné určit viskoelastické vlastnosti uvnitř vzorku. Další výhodou této metody je menší náročnost na objem vzorku.

#### 2.3.1 Video-mikroreologie a dynamický rozptyl světla

Jak je již zmíněno výše, videomikroreologie představuje nejrozšířenější metodu pro mikroreologické měření, zatímco DLS se používá pouze u transparentních

vzorků, případně je potřeba se ujistit, že začleněné částice jsou právě ty, na kterých bude probíhat rozptyl působícího paprsku, a že podmínka jednonásobného rozptylu světla bude zachována. Jelikož není snadné tuto podmínku naplnit např. v biologických systémech, DLS se pro mikroreologii příliš nevyužívá.

Nicméně videomikroreologii i dalším technikám jako DLS se věnuje přehledový článek od Thomase Moschakise, které shrnuje mikroreologii potravinových gelů a emulzí [30]. Přehledový článek shrnuje použití mikroreologických technik např. při studiu gelace pectinu [31], měření viskozity medu a porovnávání s klasickou reologií [32] nebo studiu mikoheterogenního prostředí a agregace lipozomů [33].

Další přehledový článek od Schulze a spol. přiblíží vykonaný výzkum v oblasti mikroreologie hydrogelů [34] nebo práce Weihse a spol. přiblíží důležitost mikroreologie ve výzkumu mezibuněčného prostředí [35]. Další rozsáhlý přehledový článek se věnuje mikroreologickým technikám použitým pro studium komplexních kapalin (tekuté krystaly, proteiny, koloidy atd.) [36].

#### 2.3.2 FCS mikroreologie

Jak již bylo zmíněno několikrát, o videomikroreologii vyšla spoustu publikací a pro účel této práce si stačí shrnout použitelnost metody formou přehledových článků. Nicméně FCS mikroreologie je pravý opak. FCS se příliš nepoužívá pro studium mikroreologie, možná pro finanční náročnost dané přístrojové techniky nebo pro málo informací o tom, jak FCS mikrereologii měřit a vyhodnocovat.

Zásadní práce popisující metodu FCS mikroreologie je publikace od Rathgeber a kol. [37]. Porovnávali výsledky měření u vodných roztoků vysokomolekulárního polyethylenglykolu získané pomocí DLS, video-mikroreologie a FCS mikroreologie. Výsledky mikroreologických měření porovnávali také s konvenčními reologickými experimenty za použití klasického rotačního reometru. Z hlediska rozsahu MSD je FCS srovnatelná se standardními laserovými metodami a DLS. Na rozdíl od ostatních mikroreologických metod poskytuje FCS mnohem větší frekvenční rozsah. Navíc pozorované částice nejsou závislé na rozptylu světla, protože u FCS jsou pozorovány pouze fluorescenční částice. Tato práce nicméně nepopisuje pouze výhody či nevýhody jednotlivých metod při měření stejného vzorku. Tato práce slouží také jako návod pro způsob měření či vyhodnocení autokorelační funkce a její převod na MSD.

Další práce zabývající se přímo FCS mikroreologií je od skupiny okolo Gernota Guigase a kol. [38] Pozorovali difuzní vlastnosti fluorescenčně značných zlatých nanočástic v cytoplazmě a jádru živých buněk. Ze získaných autokorelačních křivek byli schopni získat závislosti MSD a byli také schopni určit komplexní modul pružnosti pro oba buněčné kompartmenty. Díky této technice také popsali rozdíly ve viskoelastické odezvě a anomální difuzi u buněk před a po vystavení osmotickému stresu.

Jak je zmíněno výše, i když ještě není FCS rozšířené pro měření mikroreologie, i tak na tomto poli jeví velký potenciál. Nicméně FCS se především používá pro

určení difuzních koeficientů, koncentrací fluoroforů, charakterizaci interackí fluoroforů a množství dalších aplikací. Využitelnost FCS na poli kolodiní vědy a živých systémů je shrunta v těchto dvou přehledových článcích [39], [40].

## **3** CÍLE PRÁCE

Cílem předložené dizertační práce je nastudovat téma časově-rozlišená fluorescence se zaměřením na interakce hyaluronanu a koloidních systémů. Navrhnout experimenty pro charakterizaci hydratace hyaluronanu a jeho vliv na interakce s koloidními systémy. Dalším cílem bylo navrhnout způsob zpracování dat fluorescenční korelační spektroskopie pro použití v pasivní mikroreologii a zejména pro studium pasivní mikroreologie gelů.

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 4.1 CHARAKTERIZACE HYDRATAČNÍHO OBALU HYALURONANU POMOCÍ 3-HYDROXY-2-NAFTOLOVÉ KYSELINY

Hydratační obal hyaluronanu byl zkoumám pomocí fluorescenčních sond 1-naftolu, HPTS a 3HNA. Pro charakterizaci hyaluroanu byla použita metoda stacionární fluorescence a metoda TCSPC, tedy časově-rozlišená fluorescence. Jednotlivé vazebné konstanty byly vypočítány pomocí Benesi-Hildebrandovi metody (kapitola 2.1).

#### 4.2 CHARAKTERIZACE INTERAKCÍ POLYMER-TENZID POMOCÍ ESPT

Na základě dílčích experimentů byla, pro charakterizaci vlivu hyaluronanu na opačně nabitý tenzid, vybrána fluorescenční sonda 1-naftol a tenzidy CTAB a Septonex. Výzkum byl prováděn pomocí stacionární a časově-rozlišené fluorescence.

#### 4.3 MIKROREOLOGIE POMOCÍ ČASOVĚ-ROZLIŠENÉ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

Měření probíhala na přístroji MicroTime 200 od společnosti Picoquant s imerzním mikroskopem Olympus s objektivem s vodní imerzí. Malé množství vzorku (okolo 30 mL) bylo umístěno na krycí sklíčko držáku a vzorek byl ozářen laserem o specifické vlnové délce (510 nm pro fluorescenčně značené 100 nm částice a 470 nm pro fluorescenčně značené částice s velikostí 30 nm). Fluorescenční signál byl usměrněn přes objektiv, dichroické zrcátko a clonku do dělících věží, kde byl signál rozdělen na dva  $\tau$ -SPAD detektory, aby mohla být provedena kroskorelace.

Korelační funkce byla získána kroskorelací dvou nezávislých signálů kvůli rozdělení signálu 50% zrcátkem. Korelační funkce G(t) byla vypočítána jako [37]:

$$G(t) = \frac{\langle I_1(t') | I_2(t+t') \rangle}{\langle I_1(t') \rangle \langle I_2(t') \rangle}$$
(8)

kde  $I_1$  a  $I_2$  představují intenzitu fluorescence prvního a druhého detektoru. Pokud budeme předpokládat, že lze fluktuace v intenzitě fluorescence převést na fluktuace v koncentraci, může být rovnice 8 přepsána jako [37]

$$G(t) = \frac{\iint \text{PSF}(\vec{r}) \text{PSF}(\vec{r}) \langle \delta c_T(\vec{r}, t=0) \delta c_T(\vec{r}', t) \rangle d\vec{r} d\vec{r}'}{\left[ \bar{c}_T \int \text{PSF}(\vec{r}) d\vec{r} \right]^2}$$
(9)

kde  $PSF(\vec{r})$  značí rozptylovou funkci (point spread function) a  $c_t$  představuje koncentraci fluoroforu. Pokud má rozptylová funkce Gaussovský tvar, ozářený objem (efektivní objem) může být určen pomocí vzorku se známým difuzním koeficientem podle následující rovnice [41]:

$$G(t) = \frac{1}{V\bar{c}_{T}} \left(1 + \frac{4}{w_{xy}^{2}} Dt\right)^{-1} \left(1 + \frac{4}{w_{z}^{2}} Dt\right)^{-1/2}$$
(10)

Jmenovatelé v závorkách rovnice 10 představují rozměry efektivního objemu v kolmém ( $w_{xy}$ ) a rovnoběžném ( $w_z$ ) směru vůči směru laserového paprsku. Určení efektivního objemu (V) představuje důležitou část FCS měření. Nesprávná hodnota efektivního objemu vede ke špatným hodnotám difuzních koeficientů (D) a koncentrací určených proložením naměřených dat rovnicí 10. Z mikroreologického hlediska má nesprávná hodnota efektivního objemu vliv na tvar závilosti MSD na čase. Příkladem může být závislost MSD na čase pro 100 nm částice ve vodě (Obr. 4), kde lze pozorovat rozdíl mezi výše zmíněnou závislostí pro správně a nesprávně určený efektivní objem v porovnání s teoretickou hodnotou vypočítanou podle rovnice 11:

$$MSD = 6Dt \tag{11}$$

kde *t* představuje korelační čas. Difuzní koeficient je možné vyjádřit přes Einstein-Stokesovu rovnici a rovnice 11 pak nabývá tvaru:

$$MSD = \frac{k_B \cdot T}{\pi \cdot \eta \cdot d_C} \cdot t \left[ m^2 \right]$$
(12)

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta, T termodynamická teplota,  $\eta$  dynamická viskozita disperzního prostředí a  $d_c$  představuje průměr sledovaných částic. Pokud máme Newtonskou kapalinu a známe dynamickou viskozitu disperzního prostředí a průměr sledovaných částic, můžeme sestavit MSD v závislosti na korelačním čase.

Určení efektivního objemu je možné pomocí tří metod. Skenováním 100 nm částic, měřením korelační funkce fluoroforu s přesně známou koncentrací nebo měřením korelační funkce fluoroforu se známým difuzním koeficientem. V této práci byla pro kalibraci efektivního objemu zvolena poslední ze zmíněných metod, tedy vzorek se známým difuzním koeficientem – rodamin 6G. Müller a kol. určili difuzní koeficient rodaminu 6G pomocí dvouohniskové FCS při 25°C na hodnotu  $414\pm5\,\mu\text{m}^2/\text{s}$  [42]. Pokud vezmeme v úvahu změnu difuzního koeficientu s teplotou, která činí 2,6 % na stupeň [43], při 23°C bude hodnota difuzního koeficientu rodaminu 6G 392.5µm²/s. Proložením korelační funkce rodaminu 6G rovnicí 10 byla získána hodnota efektivního objemu  $V_{eff} = 0.831 \pm 0.036$  fL s rozměry  $w_{xy} = 0.265 \mu$ m pro rozměr kolmý vůči směru laserového paprsku a  $w_z = 2.125 \mu$ m pro rozměr rovnoběžný vůči směru laserového paprsku. Kalibrace byla dále testována měřením difuzního koeficientu 100 nm částic, u nichž byl pomocí dynamického rozptylu světla zjištěn difuzní koeficient o hodnotě  $D = 4.03 \pm 0.03 \mu$ m²/s. Pomocí FCS byl změřen difuzní koeficient s hodnotou  $D = 4.01 \pm 0.04 \mu$ m²/s, což představuje dobrou shodu s DLS měřením.



Obr. 4 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě při správném a špatném určení efektivního objemu

Jelikož difuzní koeficient je ve vztahu s MSD podle rovnice 11, můžeme rovnici 10 psát jako:

$$G(t) = \frac{1}{\overline{N}} \left( 1 + \frac{2}{3w_{xy}^2} MSD \right)^{-1} \left( 1 + \frac{2}{3w_z^2} MSD \right)^{-1/2}$$
(13)

Rovnice 13 může být vyřešena analyticky, kdy je skrz kubickou rovnici vyjádřeno MSD:

$$MSD = \frac{1}{3w_{xy}^4 w_z^2} x^3 + \left(\frac{8}{9w_{xy}^2 w_z^2} + \frac{4}{9w_{xy}^4}\right) x^2 + \left(\frac{4}{3w_{xy}^2} + \frac{2}{3w_z^2}\right) x + 1 - \frac{1}{\overline{N}^2 G(t)^2} = 0 (14)$$

Řešením rovnice 14 je vždy získán pouze jeden reálný kořen, který je možné použít pro zobrazení závislosti MSD na čase. Všechny výpočty byly prováděny v programu MATLAB.

# 5 DISKUZE NEJVÝNAMĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

#### 5.1 CHARAKTERIZACE HYDRATAČNÍHO OBALU HYALURONANU POMOCÍ 3-HYDROXY-2-NAFTOLOVÉ KYSELINY

Interakce 3HNA a PVP, respektive BSA byly již prokázány dříve a věnuje se jim část kapitoly 2.1 v literární rešerši. Výzkum interakce 3HNA a hyaluronanu by měl především pomoci k pochopení struktury hydratačního obalu hyaluronanu.

Hyaluronan ve vodných roztocích tvoří specifické překrývající se domény, které vytvářejí síť stabilizovanou vodíkovými vazbami, vodními můstky a hydrofobními interakcemi [44]. Právě výše zmíněné interakce spolu s polárními vlastnostmi hyaluronanu, jsou důvodem vysokého zadržování vody. V literatuře se dokonce tvrdí, že právě vysoká hydratace hyaluronanu je jednou z jeho nejdůležitějších biologických funkcí [45]. Nicméně v další literatuře se objevuje tvrzení, že není nic moc zajímavého na chování hyaluronanu v roztoku. Jinými slovy, že hyaluronan nepokrývá souvislý hydratační obal, nýbrž velké vodní klastry vázané k hyaluronanu nebo uvězněné uvnitř řetězců hyaluronanu, které mohou být tím důvodem, proč hyaluronan tvoří vysoce viskózní roztoky i v malých koncentracích [46].

Při pozorování ESIPT emise 3HNA v prostředí hyaluronanu nelze určit žádný specifický trend. Intenzita fluorescence, respektive závislost  $[F_{\infty} - F_0]/[F_X - F_0]$  na reciproké hodnotě koncentrace hyaluronanu kolísá, stejně tak kolísají hodnoty anizotropie v závislosti na koncentraci hyaluronanu. Sice nebylo dosaženo takových koncentrací jako v případě PVP, nicméně při koncentraci hyaluronanu 15 g/L je již roztok vysoce viskózní. Pokud budeme uvažovat záporný náboj hyaluronanu ve vodném roztoku a záporný náboj 3HNA v excitovaném stavu, můžeme usoudit, že v excitovaném stavu bude repulze nábojů 3HNA a karboxylových skupin hyaluronanu natolik vysoká, že se 3HNA hydratačnímu obalu hyaluronanu nepřiblíží. Pokud by ale hyaluronan měl mít masivní hydratační obal, i nízkou vazebnou konstantu by mělo být možno určit. Z tohoto důvodu byl hyaluronan srovnán s jiným, známým polymerem obsahujícím karboxylovou skupinu, a to s karboxymethyl celulózou. Na rozdíl od hyaluronanu se u KMC objevila rostoucí závislost  $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$  na reciproké koncentraci KMC a pomocí Benesi-Hildebrandovy metody bylo možno stanovit vazebnou konstantu, která měla hodnotu  $K = 4.37 \cdot 10^3 \,\mathrm{M}^{-1}$ .



Obr. 5 Závislost  $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$  na reciproké koncentraci HyA a KMC monitorující ESIPT emisi 3HNA (30 µmol/L)

Při měření doby života 3HNA v prostředí hyaluronanu bylo zjištěno, že se doba života 3HNA s rostoucí koncentrací hyaluronanu nemění a vyhasínání fluorescence je stále monoexponenciální. Stejně jako u stacionární fluorescence se zdá, že se 3HNA nenaváže na hydratační obal hyaluronanu, spíše to opět vypadá, že převládá repulze nábojů. Při srovnání s KMC je ale vidět, že 3HNA může interagovat s molekulami vody vázanými k polymeru, který obsahuje karboxylovou skupinu. Po přidání KMC do roztoku se změnil tvar vyhasínací křivky a tato křivka byla popsána biexponenciální funkcí. Sice hodnoty relativního zastoupení delší doby života (tedy doby života vázané sondy k polymeru) nedosahovaly hodnot určených pro PVP nebo BSA, ale i s 15% zastoupením vázané sondy je patrné, že se 3HNA dokáže navázat na KMC i přes značnou repulzi nábojů. To neplatí pro hyaluronan, kde se po přidání polymeru k 3HNA nezměnil počet dob života a se zvyšující se koncentrací hyaluronanu nedochází ke zvyšování doby života. To potvrzují data ze stacionární fluorescence, že se voda k hyaluronanu váže buď v určitých klastrech a na určitých místech, nebo jsou vodní klastry zachycené uvnitř řetězců hyaluronanu

#### 5.2 CHARAKTERIZACE INTERAKCÍ POLYMER-TENZID POMOCÍ ESPT

Tato kapitola se zabývá deprotonací v excitovaném stavu a jejím využití pro výzkum interakcí hyaluronanu a tenzidů. Účelem je zjistit použitelnost ESPT v koloidních systémech a zaměřit se na citlivost ESPT na přítomnost molekul vody, což by mělo určit, jakým způsobem ovlivňuje hydratace hyaluronanu interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary.

#### 5.2.1 1-naftol v CTAB

Na Obr. 6 je vidět, že data z měření s pyrenem (stanovení CMC CTAB) korelují s měřením s 1-naftolem. Dále graf ukazuje, že intenzita fluorescence neutrální formy naftolu roste v závislosti na koncentraci tenzidu. Zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu značí omezení deprotonace v excitovaném stavu, což znamená solubilizaci 1-naftolu do vznikajících micel tenzidu. To také znamená, že CMC může být vypočítána také pomocí sondy 1-naftolu.

Z Obr. 6 plyne, že se 1-naftol solubilizuje v micelách, ale neříká nic o tom, v jakých místech micely by se sonda mohla rozpouštět. To dále napoví emisní spektra naftolu. Fluorescenční sonda se může vázat v různých částech micely, a to na jejím povrchu, ve Sternově vrstvě nebo v hydrofobním jádře micely. Emisní spektrum 1-naftolu v CTAB ukázalo, že i v koncentracích za kritickou micelární koncentrací převažuje aniontová forma 1-naftolu nad neutrální, takže se nebude solubilizovat v hydrofobním jádře micel. Hydrofobní jádro micely je v podstatě tvořeno kapalnými uhlovodíky, takže ESPT by, v případě solubilizace sondy v jádře, byl výrazně omezen nebo úplně zastaven, jak je tomu například v prostředí methanolu, což by mělo za následek převahu píku neutrální formy naftolu nad aniontovou. Z tohoto pozorování plyne, že se 1-naftol v CTAB pravděpodobně nachází ve Sternově vrstvě, a proto převažuje aniontová forma 1-naftolu ve srovnání s neutrální formou. S tímto zjištěním koresponduje také měření časově rozlišené fluorescence, respektive výpočet rychlostní konstanty deprotonace. Rychlostní konstanta se snižuje v závislosti na tvorbě micel a nakonec rychlostní konstanta deprotonace v micelách dosahuje hodnot okolo 1,7 ns<sup>-1</sup>. To znamená, že rychlostní konstanta nedosahuje tak nízkých hodnot jako v případě směsi methanol-voda, takže se nenachází v blízkosti nebo uvnitř jádra micely.



Obr. 6 Závislost intenzity neutrální formy naftolu ( $\lambda = 350 \,\mathrm{nm}$ ) a EmPI na koncentraci tenzidu

Vzhledem k pozici 1-naftolu v micele se naftol jeví jako ideální kandidát pro výzkum vlivu hydratace (hydratačního obalu) na prostředí uvnitř micely, protože by se naftol mohl nacházet právě na výše zmíněném rozhraní.

#### 5.2.2 1-naftol v Septonexu

Na Obr. 7 je vidět, že data z měření s pyrenem korelují s měřením s 1-naftolem (pro srovnání jsou v grafu i data pro CTAB). Dále graf ukazuje, že intenzita fluorescence neutrální formy naftolu roste v závislosti na koncentraci tenzidu. Zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu značí omezení deprotonace v excitovaném stavu, což znamená solubilizaci 1-naftolu do vznikajících micel tenzidu.



**Obr. 7** Závislost intenzity neutrální formy naftolu ( $\lambda = 350$  nm) na koncentraci tenzidu

V případě 6 mM Septonexu převažuje neutrální forma naftolu nad aniontovou a je vidět, že emisní spektrum 1-naftolu v 6 mM Septonexu má prakticky stejný tvar jako emisní spektrum 1-naftolu ve směsi methanol-voda. V Septonexu se tedy 1-naftol pravděpodobně nachází na rozmezí Sternovy vrstvy a hydrofobního jádra, neboli v místech, kde je méně molekul vody, což brání přenosu protonu. Nemůžeme tvrdit, že se 1-naftol nachází absolutně v hydrofobním jádře micely, protože intenzita fluorescence aniontové formy je stále výrazná. V případě, že by se NpOH nacházel v hydrofobním jádře Septonexu, aniontová forma by zcela vymizela.

Z výše uvedených dat plyne, že Septonex může být použit jako další tenzid pro výzkum vlivu hydratace hyaluronanu na jeho interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary.

#### 5.2.3 Interakce polymer-tenzid

V literatuře je interakce tenzidů a polyelektrolytů již popsána. Předpokladem tedy bylo, že před kritickou micelární koncentrací bude možné pozorovat zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu u kritické agregační koncentrace a zároveň by se měla kritická micelární koncentrace snížit. Po přidání hyaluronanu o koncentraci 7 mg/L do roztoku tenzidu je vidět, že intenzita fluorescence neutrální formy 1-naftolu se začíná zvyšovat přibližně ve stejných koncentracích jako při absenci hyaluronanu (Obr. 8), takže to vypadá, že k žádné interakci hyaluronanu a CTAB nedochází. Při srovnání s PSS můžeme pozorovat zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu u koncentrace 2.10<sup>-5</sup> mol/L, což představuje kritickou agregační koncentraci. Dále je vidět druhé zvýšení intenzity fluorescence u koncentrace tenzidu 3.10<sup>-4</sup> mol/L, což představuje kritickou micelární koncentraci v přítomnosti PSS. V tomto srovnání bychom mohli říct, že hyaluronan v nízké koncentraci s CTAB neinteraguje, takže se netvoří žádné agregáty. Nicméně po vynesení závislosti excitačního polaritního indexu (ExPI) pyrenu na koncentraci CTAB je vidět prudký pokles ExPI u koncentrace  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L, což značí tvorbu agregátů hyaluronanu a CTAB. Zároveň lze pozorovat snížení hodnoty kritické micelární koncentrace na hodnotu 5.10<sup>-4</sup> mol/L kvůli posunu inflexního bodu sigmoidní závislosti k nižším hodnotám. Pokud by k žádné interakci nedocházelo, hodnota CMC by byla přibližně  $8 \cdot 10^{-4}$  mol/L a především by nedošlo ke snížení ExPI jeden řád před CMC.

Porovnáním normalizované intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy naftolu v závislosti na koncentraci CTAB byl zjištěn rozdíl mezi průběhem závislosti neutrální a aniontové formy na koncentraci CTAB. Intenzita fluorescence aniontové formy má první maximum okolo koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/L a druhé okolo  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Závislost aniontové formy 1-naftolu na koncentraci CTAB koreluje s měřením, které bylo provedeno s pyrenem. Přitom intenzita fluorescence neutrální formy 1-naftolu by se měla měnit stejně jako intenzita fluorescence aniontové formy kvůli zjevné solubilizaci naftolu v agregátech hyaluronanu a CTAB. Jelikož není pozorována žádná změna intenzity fluorescence neutrálního naftolu před kritickou micelární koncentrací, bude naftol ovlivněn větším zastoupením molekul vody v micelárním prostředí neboli větší hydratací Sternovy vrstvy.



Obr. 8 a) Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm). b) Závislost normalizované intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy 1naftolu na koncentraci CTAB

U Septonexu byla situace podobná jako v případě CTAB (Obr. 9). Hodnota kritické micelární koncentrace se nezměnila s přidáním hyaluronanu při měření intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu. Jak se ale již ukázalo u CTAB, po přidání syntetického PSS, který má větší nábojovou hustotu než hyaluronan, došlo k výraznému zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu (NpOH) okolo koncentrace 2.10<sup>-5</sup> mol/L, což značí kritickou agregační koncentraci systému PSS-Septonex. K dalšímu zvýšení intenzity fluorescence NpOH došlo u koncentrace 3.10<sup>-4</sup> mol/L, což je připisováno tvorbě agregátů PSS-Septonex a volným micelám. Jako kontrolní měření v případě hyaluronanu byla opět použita fluorescenční sonda pyren. U koncentrace 4.10<sup>-5</sup> mol/L došlo k poklesu ExPI, takže k tvorbě agregátů hyaluronanu a Septonexu dochází již před kritickou micelární koncentrací, ale

molekuly 1-naftolu jsou pravděpodobně opět ovlivněny větším zastoupením molekul vody v micelárním prostředí.



Obr. 9 Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).

Jelikož se charakteristiky fluorescence neutrální formy naftolu v obou tenzidech v přítomnosti hyaluronanu a PSS liší, nebude důvodem jen zastoupení molekul vody ve Sternově vrstvě micely, ale pravděpodobně hydratace jednotlivých polymerů. PSS se podle předpokladu jeví jako polymer, který nemá hydratační vrstvu, takže neovlivňuje vnitřní prostředí micel. Kdežto hyaluronan by jistou hydratační vrstvu mít měl, případně by měl obsahovat alespoň vodní klastry vázané k hyaluronanu. Tyto vodní klastry by mohly zasahovat dovnitř Sternovy vrstvy a ovlivnit tak molekuly 1-naftolu.

Rychlostní konstanta deprotonace 1-naftolu ve 2 mM CTAB se oproti vodě snížila skoro dvanáctkrát kvůli solubilizaci 1-naftolu v micelách. Hodnota rychlostní konstanty je podobná hodnotě  $k_{pt}$  ve směsi methanol-voda, kde byla aniontová forma výrazně potlačena. Rychlostní konstanta deprotonace v prostředí HyA a PSS se u kritické agregační koncentrace liší nepatrně. Jakmile se ale koncentrace tenzidu dostane ke kritické micelární koncentraci v přítomnosti polymeru, liší se rychlostní konstanty deprotonace více jak desetkrát. Naftol solubilizovaný v CTAB-PSS agregátech měl rychlost deprotonace podobnou jako v 2 mM CTAB nebo ve směsi methanol-voda. Kdežto naftol solubilizovaný v CTAB-hyaluronan agregátech měl rychlost deprotonace 13,25 s<sup>-1</sup>. Takto vysoká hodnota rychlosti deprotonace představuje značné ovlivnění prostředí okolo molekul 1-naftolu. Jakmile je CMC překročena, rychlost deprotonace se mnohonásobně zpomalí. Pravděpodobně dochází ke tvorbě větších agregátů, kde hydratace hyaluronanu nebo vodní klastry na něj navázané nemají takový vliv na molekuly 1-naftolu. Rychlost deprotonace

ve 2 mM CTAB v absenci hyaluronanu má navíc téměř dvakrát nižší hodnotu než v 2 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu. I tato skutečnost značí nemalé ovlivnění hyaluronan-CTAB agregátů.

V případě 2 mM Septonexu se také několikanásobně snížila hodnota rychlostní konstanty deprotonace 1-naftolu kvůli solubilizaci 1-naftolu v micelách Septonexu. Po přidání PSS k 0,02 mM a 0,3 mM Septonexu klesla hodnota k<sub>pt</sub> více než 4krát. Jasně to značí solubilizaci molekul fluorescenční sondy do agregátů vzniklých před kritickou micelární koncentrací. U hyaluronanu byla situace opačná. V prostředí 0.05 mM Septonexu, tedy při koncentraci tvorby agregátů, byla rychlost deprotonace stejná jako v případě absence tenzidu. V 0,5 mM Septonexu následně klesla rychlostní konstanta deprotonace také dvojnásobně, ale stále je hodnota podobná rychlosti deprotonace v absenci Septonexu. Ve 2 mM Septonexu již rychlostní konstanta deprotonace klesla na hodnotu srovnatelnou se 2 mM Septonexem v prostředí PSS. Jak je již výše popsáno, u 0,04 mM a 0,5 mM Septonexu v prostředí hyaluronanu dochází ke tvorbě agregátů. Takto vysoké rychlostní konstanty deprotonace mohou být vysvětleny právě ovlivněním prostředí v okolí molekul 1-naftolu, tedy zásahem hydratace hyaluronanu do Sternovy vrstvy micel. Pokud srovnáme CTAB a Septonex s koncentrací za CMC v prostředí hyaluronanu můžeme pozorovat rozdíl v rychlostní konstantě deprotonace. Z rozdílu těchto hodnot vyplývá, že hyaluronan více ovlivňuje vnitřní prostředí CTAB nebo se molekuly naftolu nachází hlouběji v micelách, takže je hydratace hyaluronanu nemůže takovou měrou ovlivnit jako v micelách CTAB. Hodnota k<sub>pt</sub> pro CTAB je 1,5krát větší než pro Septonex a navíc má  $k_{pt}$  v Septonexu v prostředí hyaluronanu podobnou hodnotu jako v prostředí Septonexu a PSS a zároveň i CTAB a PSS

#### 5.3 MIKROREOLOGIE POMOCÍ ČASOVĚ-ROZLIŠENÉ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

V předchozí kapitole bylo ukázáno, že FCS i DLS mohou být použity pro měření mikroreologie. Jak ale ukazuje Obr. 10, v roztocích polymerů se MSD určené pomocí FCS a DLS s rostoucí koncentrací více odchyluje. Největší rozdíl panuje u nejkoncentrovanějšího vzorku, kde u MSD určeného pomocí DLS nelze najít viskoelastickou závislost (data jsou zašumněná). U koncentrovaných roztoků dochází k rozptylu nejen na polystyrenových částicích, ale i na polymerním klubku, které znemožní určení MSD polystyrenových částic. U zředěných roztoků se jako důvod odchylek u DLS nabízí vliv rozptylu na řetězcích polymeru, kde není ovlivnění MSD tak značné jako u koncentrovaných roztoků a v podstatě se MSD určené pomocí DLS shodují s MSD určenými pomocí FCS. Z výše popsaného tedy plyne, že pro koncentrované roztoky polymeru (případně i gely) nebude metoda DLS vhodná, protože bude ovlivněna rozptylem na řetězcích či klubcích polymeru, kdežto FCS sleduje pouze difundující fluorescenční částice.

Viskoelastické vlastnosti jsou patrnější s rostoucí koncentrací a lze pozorovat předpokládaný nárůst viskozity opět s rostoucí koncentrací. Nejvýraznější změnu oproti teoretické hodnotě pro vodu (byla použita pro srovnání s roztoky hyaluronanu, protože tuto teoretickou hodnotu pro rozpouštědlo nesmí závislosti MSD překročit – měření by nedávalo smysl) představuje samozřejmě nejkoncentrovanější vzorek. Na průběhu MSD křivky pro roztok o koncentraci 10 g/L je patrné, že se průměrně po dobu pozorování po nějaký čas částice nehýbaly a prodíraly se polymerním klubkem. I to může značit změnu konformace polymeru z nataženého řetězce na polymerní klubko. Tato úvaha vychází z předchozího výzkumu, kde jsme již zkoumali pomocí videomikroreologie změnu konformace hyaluronanu a ta se začíná měnit okolo 5 g/L [48].



Obr. 10 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice v roztocích vysokomolekulárního (1500 kDa) hyaluronanu měřená pomocí DLS a FCS

V předchozí kapitole bylo zmíněno, že při použití 30 nm částic je stále prostor pro zvyšování koncentrace polymeru, aniž by byly při měření pozorovány v podstatě nehybné částice.



Obr. 11 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích

částic v různě koncentrovaných Obr. 11 zobrazuje pohyb roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu s rostoucí koncentrací hyaluronanu. Z grafu je patrný typický posun jednotlivých závislostí k nižším hodnotám MSD kvůli zvyšující se koncentraci hyaluronanu, a tedy rostoucí viskozity roztoků. Tento posun je doprovázen změnou ve viskoelastických vlastnostech hyaluronanu. V roztocích hyaluronanu o koncentraci 1 g/l a 3 g/l není 30 nm částicím nijak významně bráněno, což se projevuje tím, že nelze pozorovat žádné významné zakřivení těchto dvou závislostí. Spíše lze pozorovat rovnoběžnou závislost s teoretickými hodnotami pro vodu. To znamená, že vlivem posunu jednotlivých závislostí k nižším MSD mají tyto vzorky vyšší viskozitu, ale řetězce polymeru netvoří žádnou významnou překážku pro fluorescenční částice. Od koncentrace 5 g/l se v MSD závislostech začínají více projevovat viskoelastické vlastnosti jednotlivých vzorků. S dále rostoucí koncentrací hyaluronanu se viskoelastická složka projevuje čím dál větší měrou.

Výrazný viskoelastický projev je způsoben právě přechodem řetězců polymeru z nataženého řetězce na polymerní klubko. Výsledky FCS nanoreologie potvrzují výsledky zkoumání změny konformace hyaluronanu pomocí videomikroreologie [49]. Důležitým faktem je, že roztoky hyaluronanu tvoří vysoce viskózní roztoky při nízkých koncentracích, což představuje důvod, proč byl hyaluronan pro vývoj této metody vybrán (vysoká viskozita a neměnný index lomu). Přesně takovým případem je hyaluronan o koncentraci 20 g/l, což představuje pouze 2% roztok hyaluronanu. Při této nízké koncentraci má hyaluronan již konzistenci gelu a pomocí jiných metod je velmi obtížné mikroprostředí uvnitř gelu definovat. Dále také stojí za zmínku, že 2% hyaluronan je velmi obtížné měřit pomocí klasické videomikroreologie, protože 1 mm částice se v takovém prostředí téměř nehýbou a takové pozorování v mikroreologii nemá smysl. V takovém případě se musí použít externí síly, aktivní mikroreologie, aby se částice mohly pohybovat. Nicméně z výše popsaných pozorování plyne, že pomocí FCS a 30 nm částic můžeme pozorovat pasivní mikroreologii částic i v prostředí podobnému gelu, případně přímo hydrogelu.

#### Nanoreologie hydrogelů

Předchozí kapitoly popisovaly pohyb fluorescenčně značených částic o různé velikosti částic, různé molekulové hmotnosti použitého polymeru a různé koncentraci polymeru. Z těchto pozorování vyplynulo, že pro výzkum mikroprostředí hydrogelů se jeví nejlépe 30 nm fluorescenčně značené částice, které byly dále použity pro hydrogely.



Obr. 12 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích a v hydrogelu

Samotný hylauronan o koncentraci 20 g/L vykazuje konzistenci podobnou gelu. Nicméně u koncentrovaného roztoku hyaluronanu jde o propletené řetězce polymeru a u hydrogelu hyaluronanu jde o síť vzniklou interakcí polymeru a tenzidu o opačném náboji. Mikroprostředí roztoku hyaluronanu a hydrogelu se bude tedy lišit a 30 nm částice budou procházet prostředím rozdílně. Obr. 12 znázorňuje rozdíl pohybu mezi různě koncentrovanými roztoky hyaluronanu a hydrogelem hyaluronanu. U roztoků hyaluronanu s rostoucí koncentrací je možné pozorovat posun křivek vlivem rostoucí viskozity a viskoelastické složky, jako to bylo popsáno v kapitole výše. Nicméně nanoreologie hydrogelu vykazuje typický průběh závislosti MSD na čase pro hydrogel. V nízkých časech roste MSD lineárně v závislosti na čase a tato oblast znázorňuje mikroviskozitu prostředí okolí částic. Červený rámeček na Obr. 12 znázorňuje zpomalený pohyb částic, které se prodírají

hydrogelovou strukturou. Jakmile se částice opět mohou volně pohybovat, MSD roste rychleji.



Obr. 13 Srovnání MSD v závislosti na čase pro hydrogel hyaluronanu a gely připravené chemickou metodou (Alginát a PSS)

Na Obr. 12 bylo ukázáno, že 30 nm částice mohou být použity pro studium hydrogelů hyaluronanu, které byly připraveny fyzikální interakcí polymeru a tenzidu s opačnými náboji. Obr. 13 ukazuje použití nanoreologie v hydrogelech, které jsou připraveny chemickou metodou. Křivky se liší podle toho, v jakém mikroprostředí se částice pohybují a jak je hustá síť, na kterou částice narážejí. V případě chemicky připravených gelů se také projevil zpomalený pohyb částic při průchodu gelovou sítí, což naznačuje, že pasivní nanoreologie je použitelná i v chemicky připravených gelech.

# 6 ZÁVĚR

Časově-rozlišená fluorescence představuje ve spektroskopii velmi přínosnou metodu pro charakterizaci nejrůznějších systémů. I když je tato práce zaměřená právě na časově-rozlišenou fluorescenci, tak bez stacionární fluorescence by tuto práci nebylo možné realizovat. Kombinací obou technik lze získat komplexní představu o zkoumaném systému.

Cílem této dizertační práce bylo zvolit vhodnou fluorescenční metodu a charakterizovat a diskutovat hydratační obal hyaluronanu a jeho vliv na interakce s opačně nabitými tenzidy. Dalším cílem bylo využít pokročilé fluorescenční techniky pro vývoj mikroreologie na fakultě chemické VUT, a to zejména pro studium pasivní mikroreologie gelů.

Pro charakterizaci hydratačního obalu hyaluronanu byla zvolena časově-rozlišená metoda TCSPC spolu se stacionární fluorescencí. Na základě výše zmíněných

experimentů byla diskutována struktura hydratačního obalu hyaluronanu. O hyaluronanu a jeho schopnosti vázat vodu není pochyb. Nicméně existuje diskuze, jestli se okolo hyaluronanu nachází souvislý hydratační obal anebo je voda vázaná ve vodních klastrech. Výše zmíněná data získaná pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescence naznačují, že hyaluronan nemá žádný monstrózní hydratační obal, ale že se voda k hyaluronanu váže buď v určitých klastrech a na určitých místech, nebo jsou vodní klastry zachycené uvnitř řetězců hyaluronanu. I když hyaluronan nejspíš nedisponuje tolik diskutovaným hydratačním obalem, tak pomocí stejných fluorescenčních metod bylo ukázáno, že voda vázaná k hyaluronanu ovlivňuje i vnitřní prostředí systémů, se kterými hyaluronan interaguje.

Další zvolenou metodou v této dizertační práce byla opět technika TCSPC, ale tentokrát ve formě fluorescenční korelační spektroskopie. Tato metoda dovoluje pozorování difuze jednotlivých molekul, čehož bylo využito při studiu mikroreologie. Mikroreologie je metoda zavedená na fakultě chemické VUT, ale konvenční mikroreologické metody mají některé nevýhody, které bylo možné obejít pomocí FCS. Původním záměrem bylo využít FCS mikroreologii pro porovnání s asi nejrozšířenější metodou, a to videomikroreologií. Nakonec se ze srovnání dvou metod stal vývoj samostatné metody nanoreologie, a to právě díky vysoké citlivosti fluorescenční korelační spektroskopie a možnostem výzkumu pasivní nanoreologie v gelových systémech.

O hyaluronanu a interakcích hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy bylo již napsáno mnoho, nicméně tato práce poodhaluje další část v širokém spektru možností těchto systémů. Naproti tomu kombinace fluorescenční korelační spektroskopie a mikroreologie rozšířená není, i když v sobě skrývá ohromný potenciál. Tato práce slouží jako odrazový můstek pro další výzkum nejrůznějších systémů pomocí pasivní FCS mikro(nano)reologie, jelikož uplatnění této metody může být obrovské.

# 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOMAROMY-HILLER, G.; VONWANDRUSZKA, R., Anisotropy changes of a fluorescent probe during the micellar growth and clouding of a nonionic detergent. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996, 177, (1), 156-161
- [2] PAL, A.; SUNDAR MAITY, S.; SAMANTA, S.; SAHA SARDAR, P.; GHOSH, S., Interaction of the excited state intramolecular proton transfer probe 3-hydroxy-2naphthoic acid with poly N-vinyl-2-pyrrolidone polymer in water: An insight into the water structure in the binding region. Journal of Luminescence 2010, 130, (11), 1975-1982
- [3] BENESI, H. A.; HILDEBRAND, J. H., A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* 1949, 71, (8), 2703-2707
- [4] LAKOWICZ, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third ed.; Springer: New York, 2006; p 954
- [5] PAL, B.; BAJPAI, P. K.; BASU BAUL, T. S., Binding of 5-(2'carboxyphenyl)azoquinolin-8-ol to bovine serum albumin: a spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2000, 56, (12), 2453-2458
- [6] MALLICK, A.; HALDAR, B.; CHATTOPADHYAY, N., Spectroscopic Investigation on the Interaction of ICT Probe 3-Acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H Indolo-[2,3-a] Quinolizine with Serum Albumins. The Journal of Physical Chemistry B 2005, 109, (30), 14683-14690
- [7] FENG, X.-Z.; LIN, Z.; YANG, L.-J.; WANG, C.; BAI, C.-l., Investigation of the interaction between acridine orange and bovine serum albumin. *Talanta* 1998, 47, (5), 1223-1229.
- [8] LESSING, H. E.; VON JENA, A., Rotational diffusion of dyes in micellar media from transient absorption. *Chemical Physics* 1979, 41, (3), 395-406.
- [9] KAWATO, S.; KINOSITA Jr, K.; IKEGAMI, A., Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques. *Biochemistry* 1977, 16, (11), 2319-2324.
- [10] DAS, R.; DUPORTAIL, G.; RICHERT, L.; KLYMCHENKO, A.; MÉLY, Y., Sensing Micelle Hydration by Proton-Transfer Dynamics of a 3-Hydroxychromone Dye: Role of the Surfactant Headgroup and Chain Length. *Langmuir* 2012, 28, (18), 7147-7159.
- [11] DEUMIÉ, M.; El BARAKA, M.; Quinones, E., Fluorescence quenching of pyrene derivatives by iodide compounds in erythrocyte membranes: an approach of the probe location. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1995, 87, (2), 105-113.
- [12] BOLDYREV, I. A.; ZHAI, X.; MOMSEN, M. M.; BROCKMAN, H. L.; BROWN, R. E.; MOLOTKOVSKY, J. G., New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes. *Journal of Lipid Research* 2007, 48, (7), 1518-1532.
- [13] BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M., Localization of dipyridamole molecules in ionic micelles: Effect of micelle and drug charges. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1995, 1238, (1), 57-62.

- [14] GIESTAS, L.; YIHWA, C.; LIMA, J. C.; VAUTIER-GIONGO, C.; LOPES, A.; MAÇANITA, A. L.; QUINA, F. H., The Dynamics of Ultrafast Excited State Proton Transfer in Anionic Micelles<sup>†</sup>. *The Journal of Physical Chemistry A* 2003, 107, (18), 3263-3269.
- [15] MAITY, S. S.; SAMANTA, S.; SARDAR, P. S.; PAL, A.; DASGUPTA, S.; GHOSH, S., Fluorescence, anisotropy and docking studies of proteins through excited state intramolecular proton transfer probe molecules. *Chemical Physics* 2008, 354, (1-3), 162-173.
- [16] SARDAR, P. S.; SAMANTA, S.; MAITY, S. S.; DASGUPTA, S.; GHOSH, S., Energy transfer photophysics from serum albumins to sequestered 3-hydroxy-2-naphthoic acid, an excited state intramolecular proton-transfer probe. *Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112, (11), 3451-3461.
- [17] CANADA-CANADA, F.; RODRIGUEZ-CACERES, M. I., Spectrofluorimetric determination of 3-hidroxy-2-naphthoic acid by use of its ternary complex with zirconium (IV) and beta-cyclodextrin: Application to determination in river water. *Journal of Fluorescence* 2007, 17, (1), 23-28.
- [18] WEBB, S. P.; YEH, S. W.; PHILIPS, L. A.; TOLBERT, M. A.; CLARK, J. H., Ultrafast excited-state proton transfer in 1-naphthol. *Journal of the American Chemical Society* 1984, 106, (23), 7286-7288.
- [19] KUMAR, A. C.; MISHRA, A. K., 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol. *Talanta* 2007, 71, (5), 2003-2006.
- [20] EDWARD, J. T., Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *Journal of Chemical Education* 1970, 47, (4), 261.
- [21] KNOCHENMUSS, R.; LEUTWYLER, S., Proton transfer from 1-naphthol to water: Small clusters to the bulk. *The Journal of Chemical Physics* 1989, 91, (2), 1268-1278.
- [22] RAKSHIT, S.; SAHA, R.; VERMA, P. K.; PAL, S. K., Role of Solvation Dynamics in Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in Nanoscopic Water Clusters Formed in a Hydrophobic Solvent. *Photochemistry and Photobiology* 2012, 88, (4), 851-859.
- [23] SPRY, D. B.; GOUN, A.; GLUSAC, K.; MOILANEN, D. E.; FAYER, M. D., Proton Transport and the Water Environment in Nafion Fuel Cell Membranes and AOT Reverse Micelles. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129, (26), 8122-8130.
- [24] MANDAL, D.; PAL, S. K.; BHATTACHARYYA, K., Excited-State Proton Transfer of 1-Naphthol in Micelles. *The Journal of Physical Chemistry A* 1998, 102, (48), 9710-9714.
- [25] MONDAL, S. K.; ROY, D.; SAHU, K.; SEN, P.; KARMAKAR, R.; BHATTACHARYYA, K., Hydration dynamics of 4-aminophthalimide in a substituted β-cyclodextrin nanocavity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005, 173, (3), 334-339.
- [26] DUTTA, P.; HALDER, A.; MUKHERJEE, S.; SEN, P.; SEN, S.; BHATTACHARYYA, K., Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in a Hydroxypropylcellulose/Sodium Dodecyl Sulfate System. *Langmuir* 2002, 18, (21), 7867-7871.

- [27] LEE, J.; ROBINSON, G. W.; WEBB, S. P.; PHILIPS, L. A.; CLARK, J. H., Hydration dynamics of protons from photon initiated acids. *Journal of the American Chemical Society* 1986, 108, (21), 6538-6542.
- [28] SAHU, K.; ROY, D.; MONDAL, S. K.; KARMAKAR, R.; BHATTACHARYYA, K., Study of protein-surfactant interaction using excited state proton transfer. *Chemical Physics Letters* 2005, 404, (4–6), 341-345.
- [29] GHOSH, S.; DEY, S.; MANDAL, U.; ADHIKARI, A.; MONDAL, S. K.; BHATTACHARYYA, K., Ultrafast Proton Transfer of Pyranine in a Supramolecular Assembly: PEO-PPO-PEO Triblock Copolymer and CTAC. *The Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111, (48), 13504-13510.
- [30] MOSCHAKIS, Thomas. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. Current Opinion in Colloid. 2013, 18, (4), 311-323.
- [31] VINCENT, R. R., D. N. PINDER, Y. HEMAR a M. A. K. WILLIAMS. Microrheological studies reveal semiflexible networks in gels of a ubiquitous cell wall polysaccharide. Physical Review E. 2007, 76(3), -. DOI: 10.1103/PhysRevE.76.031909. ISSN 1539-3755.
- [32] COHEN, Itai a Daphne WEIHS. Rheology and microrheology of natural and reducedcalorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. Journal of Food Engineering. 2010, 100(2), 366-371. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.04.023. ISSN 02608774
- [33] CRIELAARD, B.J., A. YOUSEFI, J.P. SCHILLEMANS, C. VERMEHREN, K. BUYENS, K. BRAECKMANS, T. LAMMERS a G. STORM. An in vitro assay based on surface plasmon resonance to predict the in vivo circulation kinetics of liposomes. Journal of Controlled Release. 2011, 156(3), 307-314. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.023. ISSN 01683659.
- [34] SCHULTZ, Kelly M. a Eric M. FURST. Microrheology of biomaterial hydrogelators. Soft Matter. 2012, 8(23), 6198-. DOI: 10.1039/c2sm25187f. ISSN 1744-683x.
- [35] WEIHS, Daphne, Thomas G. MASON a Michael A. TEITELL. Bio-Microrheology: A Frontier in Microrheology. Biophysical Journal. 2006, 91(11), 4296-4305. DOI: 10.1529/biophysj.106.081109. ISSN 00063495
- [36] WAIGH, Thomas Andrew. Advances in the microrheology of complex fluids. Reports on Progress in Physics. 2016, 79(7), 074601-. DOI: 10.1088/0034-4885/79/7/074601. ISSN 0034-4885.
- [37] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. Langmuir. 2009, 25(11): 6368-6376. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463
- [38] GUIGAS, Gernot, Claudia KALLA a Matthias WEISS. Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. Biophysical Journal. 2007, 93(1), 316-323. DOI: 10.1529/biophysj.106.099267. ISSN 00063495.
- [39] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. Current Opinion in Colloid. 2012, 17(6), 377-387. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. ISSN 13590294.

- [40] MACHÁŇ, Radek a Thorsten WOHLAND. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. FEBS Letters. 2014, 588(19), 3571-3584. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.056. ISSN 00145793.
- [41] VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2001; p 381
- [42] MÜLLER, C. B., A. LOMAN, V. PACHECO, F. KOBERLING, D. WILLBOLD, W. RICHTERING a J. ENDERLEIN. Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. EPL (Europhysics Letters). 2008, 83(4): 46001-. DOI: 10.1209/0295-5075/83/46001. ISSN 0295-5075.
- [43] DERTINGER, Thomas, Victor PACHECO, Iris VON DER HOCHT, Rudolf HARTMANN, Ingo GREGOR a Jörg ENDERLEIN. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. ChemPhysChem. 2007, 8(3): 433-443. DOI: 10.1002/cphc.200600638. ISSN 14394235
- [44] DAVIES, A., J. GORMALLY, E. WYN-JONES, D.J. WEDLOCK a G.O. PHILLIPS. A study of hydration of sodium hyaluronate from compressibility and high precision densitometric measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1982, 4(7): 436-438. DOI: 10.1016/0141-8130(82)90091-5. ISSN 01418130.
- [45] KUČERÍK, J., A. PRŮŠOVÁ, A. ROTARU, K. FLIMEL, J. JANEČEK a P. CONTE. DSC study on hyaluronan drying and hydration. *Thermochimica Acta*. 2011, 523(1-2): 245-249. DOI: 10.1016/j.tca.2011.04.034. ISSN 00406031.
- [46] RINAUDO, Marguerite. Polyelectrolyte properties of a plant and animal polysaccharide. *Structural Chemistry*. 2009, 20(2): 277-289. DOI: 10.1007/s11224-009-9426-z. ISSN 1040-0400. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s11224-009-9426-z
- [47] KARGEROVÁ, A., M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 106(1-2): 453-459. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.020. ISSN 01448617
- [48] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. Carbohydrate Polymers. 2016, 137, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617.
- [49] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. Langmuir. 2014, 30(29): 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463.

# 8 ŽIVOTOPIS

Jméno:	Ing. Jakub Mondek			
Adresa:	U Norkárny 138, 790 81 Česká Ves			
Datum narození:	14. 05. 1987			
Tel:	+420736779649			
E-mailová adresa:	mondekj5@gmail.com			
Vzdělání:				
2012 - 2017	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální chemie,			
	doktorské studium			
2010 - 2012	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální a spotřební			
	chemie, magisterské studium			
2007 - 2010	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální a spotřební			
	chemie, bakalářské studium			
2003 - 2007	Gymnázium Jeseník, Komenského 281, 790 01 Jeseník			
Stáže:				

8/2010 - 2/2011	Universidáde	Técnica	de	Lisboa,	Instituto	Superior
	Técnico, ERASMUS program					

#### Přednášky na mezinárodních konferencích

Chemie je život 2012 (Brno, Česká Republika)

XIII. Pracovního setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2013

Škola molekulové spektrometrie 2013 (Brno, Česká Republika)

XIV. Pracovního setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2014

Chemistry and life 2015 (Brno, Česká Republika)

Chemie je život 2015 (Brno, Česká Republika)

The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence 2015 (Würzburg, Německo)

#### Poster na mezinárodních konferencích

International Soft Matter Conference (Roma, Italy) 2013 5th International Conference on Nanomaterials (Brno, Czech Republic) 2013 International Symposium on Luminescence Spectrometry (Rhodes, Greece) 2014 6th International Conference on Nanomaterials (Brno, Czech Republic) 2014 1st European Conference on Pharmaceutics (Rheim, France) 2015 7th International Conference on Nanomaterials (Brno, Czech Republic) 2015 20th European Symposium on Polymer Spectroscopy (Dresden, Germany) 2016

#### Vedoucí bakalářské práce

Petra Kábrtová	Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie					
Veronika Richterová	Deprotonace v excitovaném stavu jako metodika charakterizace koloidních systémů					
Konzultant bakalářsk	é práce					
Jana Bačová	Studium kinetiky přenosu protonu v excitovaném stavu v systému polymer-tenzid					
Jan Kotouček	Fluorescence ve výzkumu hydrofilních polymerů					
Konzultant diplomove	é práce					
Petra Ucekajová	Technika anisotropie a časově rozlišené anisotropie ve výzkumu koloidních systémů					
Jan Kotouček	Charakterizace koloidních částic pomocí deprotonace v excitovaném stavu za použití pokročilých fluorescenčních technik					
Petra Kábrtová	Pokročilé mikroreologické techniky ve výzkumu hydrogelů					
Pedagogická činnost						
2013	Praktikum z fyzikální chemie II					
2013 - 2014	Chemická informatika I					

# 9 SEZNAM PUBLIKACÍ

#### Články v časopise

MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. Langmuir. 2014, 30(29): 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la502011s

MONDEK, Jakub a Miloslav PEKAŘ. The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration. Carbohydrate Polymers. 2015, 129, 168-174. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.060. ISSN 01448617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715003768

MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. Polymer Degradation and Stability. 2015, 120: 107-113. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012. ISSN 01413910. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391015300239

SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. Polymer Degradation and Stability. 2015, 111: 257-262. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005. ISSN 01413910. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391014004388

SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. Carbohydrate Polymers. 2016, 137, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010814

#### Příspěvky na mezinárodních konferencích

MONDEK, J.; MRAVEC, F. Time-Resolved Fluorescence in Hyaluronan-Surfactant Interactions. In *Studentská konference Chemie je život*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. p. 387-393. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. Kinetic Study of Excited State Proton Transfer Probe 1-Naphthol in Hyaluronan- Surfactant System. In *XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. p. 119120. ISBN: 978-80-7375-757-1.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. Excited-State Proton Transfer Study in Potential Hyaluronan- Surfactant Drug Nanocarriers. In *NANOCON 2013 Conference proceedings*. 2013. p. 1-7. ISBN: 978-80-87294-44- 4.

MONDEK, J.; SIMULESCU, V.; PEKAŘ, M. New Kinetic Models in Biopolymer Degradation: Long- Term Study of Hyaluronan Samples. In *XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. 2014. p. 99-102. ISBN: 978-80-210-6842-1.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. From Micro to Nanorheology: Basic Principles of Microrheology Measurements with Fluorescence Correlation Spectroscopy. In *Nanocon 2014: Conference Proceedings*. Tanger Ltd., 2014. p. 1-5. ISBN: 978-80-87294-55- 0.

HNYLUCHOVÁ, Z.; MONDEK, J.; PEKAŘ, M. DLS Microrheology of biopolymer solution, Probe size effect. In *Nanocon 2014 Conference Proceedings*. 1. 2014. p. 1-5. ISBN: 978-80-87294-55-0.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. Comparison of Microrheological Measurements by Three Techniques. In *Chemie je život: Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. p. 337-342. ISBN: 978-80-214-5078-3.

MONDEK, J.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Binding of Surfactant to Polyelectrolyte in Non-Standard Conditions - Fluorescence Study. In *Chemistry and Life 2015*. *Czech Chemical Society Symposium Series*. 2015. p. 110-113. ISBN: 978-80-214-5228- 2. ISSN: 2336-7210.

MONDEK, J.; SIMULESCU, V.; KALINA, M.; PEKAŘ, M. The Self- Degradation of Hyaluronan. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2015*. 2015. p. 276-282. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

#### Abstrakty na mezinárodních konferencích

MRAVEC, F.; STŘONDALOVÁ, H.; HALASOVÁ, T.; MONDEK, J. Interaction between amphiphilic fluorescent probes and biopolymer. Strasbourg: University of Strasbourg, 2011. p. 233-233.

MONDEK, J.; MRAVEC, F. *Time-Resolved Fluorescence in Hyaluronan-Surfactant Interactions*. Studentská konference Chemie je život: Sborník abstraktů. Purkyňova 464/118, 61200 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. p. 117-117. ISBN: 978-80-214-4545- 8.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *Hyaluronan-CTAB Interactions Studied by Excited-State Proton Transfer*. Sapienza Universita di Roma: 2013. p. 18-18.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. Aggregation of Hyaluronan and Surfactant Studied by Fluorescence Cross- Correlation Spectroscopy. ISLS 2014- RODOS. 2014. p. 1 (1 s.).

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. The Use of Excited-State Proton Transfer in Observation of The Interaction of Potential Hyaluronan- Surfactant Drug Nanocarriers. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery. 2015. p. 1-2.

MONDEK, J.; DOSKOČIL, L.; SZEWIECZKOVÁ, J.; ENEV, V.; WASSERBAUER, J. Using the analytical centrifuge to characterize of magnetic particles. CEITEC PHD RETREAT. 2015. p. 105-105. ISBN: 978-80-210-7825-3.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; KÁBRTOVÁ, P.; PEKAŘ, M. The Advantage of Microrheology Measurements Performed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy - Comparison with Video Microrheology and Dynamic Light Scattering. The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence. 2015. p. 68-68.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. *Nanorheology of Hyaluronan Solutions*. Nanocon 2015 - Proceedings of Abstracts. 2015. p. 117-117. ISBN: 978-80-87294-59-8.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *FCS nanorheology of biopolymeric hydrogels - a novel approach to study passive rheology of hydrogels*. 20th European Symposium on Polymer Spectroscopy - Book of abstracts. 2016. p. 1 (1 s.). ISBN: 978-3-9816007-4-2

#### ABSTRAKT

Cílem předložené dizertační práce bylo studium pokročilých fluorescenčních technik a jejich využití v problematice koloidních soustav, respektive systémů hyaluronan-tenzid a hydrogelových systémů založených na hyaluronanu. Časově-rozlišená fluorescence spolu se stacionární fluorescencí byly použity pro studium hyaluronanových systémů za účelem určení vlivu hydratace hyaluronanu na jeho interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary pomocí fluorescenčních sond podstupujících deprotonaci v excitovaném stavu. Nejdříve byly diskutovány různé fluroescenční sondy podstupující deprotonaci v excitovaném stavu, z nichž byla vybrána jedna jako vhodný kandidát pro další experimenty. Na základě citlivosti deprotonace v excitovaném stavu vybrané fluorescenční sondy 1-naftolu byl určen vliv hyaluronanu na vnitřní prostředí micel a zároveň byla, na základě těchto experimentů, diskutována struktura hydratačního obalu hyaluronanu.

Další část předložené dizertační práce se věnovala metodě fluorescenční časověrozlišené korelační spektroskopie a vývoji metody nanoreologie. Pomocí vytvořeného skriptu v softwaru MATLAB byly převedeny získané korelační funkce na střední posun fluorescenčně značených částic. Nejprve bylo potvrzeno, že fluroescenční korelační spektroskopie může být použita pro mikroreologická měření, a to srovnáním s již známými metodami videomikroreologie a mikroreologie pomocí dynamického rozptylu světla. Následně byla vyvinuta metoda nanoreologie a bylo diskutováno její použití pro studium pasivní nanoreologie v hydrogelových systémech založených na hyaluronanu. Na základě diskutovaných experimentů byla optimalizována metoda mikroreologie, respektive nanoreologie pomocí fluroescenční korelační spektroskopie až k použitelnosti této metody pro studium gelů.

# KLÍČOVÁ SLOVA

Časove-rozlišená fluorescence, deprotonace v excitovaném stavu, hydratace, hyaluronan, fluorescenční korelační spektroskopie, mikroreologie, nanoreologie, hydrogel

### ABSTRACT

The aim of the doctoral thesis was to study advanced fluorescence techniques and its use in colloids or hyaluronan-surfactant systems and hydrogels based on hyaluronan, respectively. Steady-state and time-resolved fluorescence were used to study excited state proton transfer fluroescen probes in hyaluronan-surfactant systems to asses the influence of hyaluronan hydration to its interactions with oppositely charged surfactants. Firstly, different excited state proton transfer fluorescence probes were discussed to choose the most suitable candidate for next research. The influence of hyaluronan on inner environment of micells was determined based on the sensitivity of excited state proton transfer of chosen fluorescence probe 1-naphtol and, based on above mentioned experiments, the structure of hyaluronan hydration shell was discussed.

The next part of doctoral thesis was focused on fluorescence lifetime correlation spectroscopy and on the development of method of nanorheology. Measured correlation functions were transformed to mean square displacement with developed MATLAB script. Firstly, the fluorescence method was compared with well described methods such as videomicrorheology and dynamic light scattering to asses the reliability of fluorescence correlation spectroscopy in microrheology. Secondly, nanorheology method was developed and its use in passive nanorheology of hyaluronan hydrogels was discussed. Based on mentioned experiments, the fluorescence correlation spectroscopy and nanorheology methods were optimized to use the methods in hydrogel research.

### **KEY WORDS**

Time-resolved fluroescence, excited state proton transfer, hydration, hyaluronan, fluorescence correlation spectroscopy, microrheology, nanoreology, hydrogel