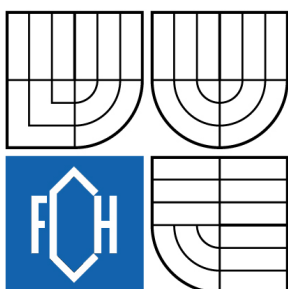


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘENOS ENERGIE VE STUDIU HYDROFOBNIÍCH DOMÉN KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

ENERGY TRANSFER AND HYDROPHOBIC DOMAINS IN COLLOIDAL SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

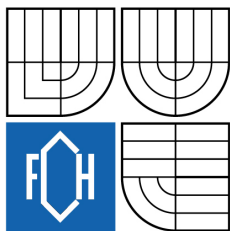
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. PETRA KUČEROVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0310/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Petra Kučerová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce:	doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Přenos energie ve studiu hydrofobních domén koloidních systémů

Zadání diplomové práce:

Rešerše na téma využití přenosu energie ve studiu agregačních a asociativních procesů v koloidních roztocích biopolymerů.

Návrh experimentů zaměřených na studium přenosu energie v koloidních roztocích na bázi hyaluronanu a vlivu fyzikálně-chemických podmínek.

Realizace a vyhodnocení experimentů. Zhodnocení výsledků z hlediska stability systémů, které bude možno využít v cílené distribuci léčiv.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Petra Kučerová
Student(ka)

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byl studován rezonanční přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v roztoku tetradecyltrimethylamoniumbromidu (TTAB) a vliv přidavku nativního a modifikovaného hyaluronanu na účinnost přenosu. Bylo zjištěno, že přidavek nativního hyaluronanu podporuje účinnost přenosu energie při nižších koncentracích fluoresceinu a přidavek modifikovaného hyaluronanu ovlivňuje maximální hodnotu dosažené účinnosti.

Při stanovování hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC) bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu výrazně ovlivnil hodnotu CMC TTAB, data naznačují nejen tvorbu micel, ale také tvorbu agregátů hyaluronanu s TTAB.

Pomocí zhášení fluorescence pyrenu cetylpyridiniumchloridem (CPC) byla vypočtena agregační čísla TTAB a TTAB s přidavkem nativního či modifikovaného hyaluronanu. Bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu do roztoku TTAB mění hodnotu průměrného agregačního čísla. Pomocí zhášení fluorescence bylo také zkoumáno, zda dochází k výměně rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami TTAB a jaký má přidavek modifikovaného hyaluronanu vliv na tuto výměnu. Výsledkem experimentu bylo, že za daných podmínek k výměně rozpuštěné látky nedochází ani v samotném TTAB ani v TTAB s přidavkem modifikovaného hyaluronanu.

ABSTRACT

In this thesis resonance energy transfer between perylene and fluorescein in tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) solution was studied. The influence of addition of native or modified sodium hyaluronate on resonance energy transfer was also investigated. The addition of native sodium hyaluronate supports energy transfer at lower fluorescein concentrations and the addition of modified sodium hyaluronate influences the maximal value of energy transfer effectivity.

Strong influence on the critical micelle concentration (CMC) values with the addition of sodium hyaluronate during CMC of TTAB determination was investigated. The data indicates not only micelles formation, but also formation of aggregates of sodium hyaluronate with TTAB.

Aggregation numbers of TTAB with addition of native and modified sodium hyaluronate by the quenching of pyrene by cetylpyridinium chloride (CPC) was investigated. The addition of sodium hyaluronate into the solution of TTAB changes the average mean aggregation number. Solute exchange between micelles of TTAB and the influence of addition of modified sodium hyaluronate on this exchange was also investigated. No solute exchange between micelles in TTAB and in TTAB with added modified sodium hyaluronate was discovered during this experiment.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, rezonanční přenos energie, zhášení fluorescence, perylen fluorescein, pyren, agregační číslo, micely

KEYWORDS

Fluorescence, resonance energy transfer, quenching of fluorescence, pyrene, fluorescein, pyrene, aggregation number, micelles

KUČEROVÁ, P. *Přenos energie ve studiu hydrofobních domén koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 66 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. a svému konzultantovi Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za pomoc při řešení problémů a za dostatečné množství trpělivosti.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Tenzidy	11
2.1.1 Struktura a vlastnosti tenzidů	11
2.1.2 Micely	12
2.2 Hyaluronan	13
2.2.1 Historie a chemická struktura	13
2.2.2 Polymerní struktura a struktura v roztoku	13
2.2.3 Uspořádaná struktura v roztoku	14
2.2.4 Metabolismus hyaluronanu a jeho viskoelastické vlastnosti	15
2.3 Molekulová absorpční spektrometrie v UV – VIS oblasti	15
2.4 Fluorescenční spektroskopie	16
2.4.1 Kvantový výtěžek fluorescence	16
2.4.1.1 Stanovení kvantových výtěžků fluoroforů	17
2.4.2 Fluorescenční sondy	18
2.4.3 Rezonanční přenos energie	18
2.4.3.1 Försterova formulace dipól – dipólového přenosu ve velké vzdálenosti	19
2.4.3.2 Určování vzdáleností pomocí RET na supramolekulární úrovni	20
2.4.4 Zhášení, Stern-Volmerova kinetika	22
2.4.4.1 Dynamické (kolizní) zhášení	24
2.4.4.2 Statické zhášení, rozsah efektivního zhášení	24
2.4.4.3 Statické zhášení, tvorba nefluoreskujícího komplexu	25
2.4.4.4 Současné statické a dynamické zhášení	25
2.4.5 Rozdíly mezi přenosem energie a zhášením	27
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
3.1 Rezonanční přenos energie	29
3.2 Zhášení	30

4. MATERIÁLY A METODY	32
4.1 Použité chemikálie	32
4.1.1 Příprava zásobních roztoků fluoroforů	32
4.1.2 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB	32
4.1.3 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB v přítomnosti nativního hyaluronanu	33
4.1.4 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB v přítomnosti modifikovaného hyaluronanu	33
4.1.5 Příprava vzorků pro určení CMC	33
4.1.6 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB	34
4.1.7 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB v přítomnosti nativního hyaluronanu	34
4.1.8 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB v přítomnosti modifikovaného hyaluronanu	34
4.1.9 Příprava vzorků pro stanovení výměny rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami	34
4.2 Měření absorpčních a fluorescenčních spekter	35
4.3 Vyhodnocení	35
4.3.1 Korekce intenzity fluorescence	35
4.3.2. Vyhodnocení účinnosti přenosu energie	36
4.3.3 Stanovení agregačního čísla	36
4.3.4 Stanovení kritické micelární koncentrace	37
4.3.5 Stanovení výměny rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami	38
4.3.6 Stanovení chyby měření	38
4.4 Vlastnosti použitých fluoroforů	39
4.4.1 Perylen	39
4.4.3 Fluorescein	39
4.4.4 Pyren	39

5. VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1 Přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v TTAB	40
5.1.1 Vliv přídavku HA na účinnost přenosu energie v TTAB	44
5.1.2 Vliv molární hmotnosti hyaluronanu na účinnost přenosu energie v TTAB	45
5.1.3 Vliv přídavku derivátu hyaluronanu ACHX1 na účinnost přenosu energie v TTAB	46
5.1.4 Vliv přídavku derivátu hyaluronanu ACHX2 na účinnost přenosu energie v TTAB	47
5.2 Stanovení kritické micelární koncentrace TTAB v přítomnosti nativního a modifikovaného hyaluronanu	48
5.3 Stanovení agregačního čísla TTAB ve vodném roztoku	49
5.3.1 Vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo TTAB	50
5.3.2 Vliv přídavku derivátu ACHX1 na agregační číslo TTAB	51
5.3.4 Výměna rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami TTAB a vliv přídavku modifikovaného hyaluronanu na tuto výměnu	53
6. ZÁVĚR	55
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
9. SEZNAM PŘÍLOH	64
10. PŘÍLOHY	65

1. ÚVOD

Koloidní roztoky jsou roztoky, které obsahují částice o velikosti v rozmezí 1–1000 nm. Mezi tyto roztoky řadíme i roztoky tenzidů, popřípadě biopolymerů. Tenzidy jsou amfifilní molekuly, které snižují povrchové napětí kapalin.

Látky, které obsahují hydrofobní a hydrofilní domény, jsou schopny organizovat se ve vodě. Agregáty, které vytvářejí nazýváme micely. Většina vlastností micelárního systému vyplývá z jeho schopnosti inkorporovat do své struktury široký výběr molekul, například léčiva.

V současné době je zvyšován zájem o nalezení léčby proti rakovině. Chemoterapie, která se nejčastěji využívá má hodně vedlejších účinků na lidský organizmus a není moc dobře snášena. Proto je snaha vyvinout nosičový systém léčiv tak, aby byl dobře snášen a působil jen tam, kde má. Pro výběr vhodného systému pro distribuci léčiv je důležité, aby daná molekula, která agregáty vytváří a je schopná nést léčivo, byla co nejvíce biokompatibilní a biodegradovatelná. Jednou takovou molekulou je biopolymer, zvaný hyaluronan, který je přítomen v mnoha částech lidského těla, ať už jde o klouby, kůži nebo synoviální tekutinu.

Zájem o hyaluronan v poslední době vzrostl díky jeho asociativním vlastnostem a jeho potenciální aplikaci v kosmetice, farmacii a medicíně. Nemodifikovaná kyselina hyaluronová našla důležité uplatnění v chirurgii a dávkování léčiv. Derivatizací hyaluronanu lze přizpůsobit fyzikálně chemické vlastnosti podle požadovaných aplikací [1, 2]. Díky jeho biokompatibilitě a reologickým vlastnostem roste využití hyaluronanu jako součást synteticky vyrobených matric pro „scaffolding“ tkání [3].

Změny v metabolismu hyaluronanu, jeho distribuce a funkce byly dokumentovány při mnoha nemocech jako je artritida, imunitní a zánětlivé poruchy, pulmonární a cévní nemoci nebo rakovina [4, 5]. Jedna z nejúspěšnějších medicínských aplikací je léčení osteoartritidy [6]. Vzhledem k tomu, že biologické funkce hyaluronanu závisí na jeho molekulové hmotnosti, byl zkoumán efekt dvou hyaluronanů s různými molekulovými hmotnostmi na osteoartritidu a traumatickou artritidu [7]. Hodně rozšířená aplikace hyaluronanu je v oftalmologii například při operaci šedého zákalu [8].

Dva nejdůležitější receptory hyaluronanu v lidském těle jsou CD44 [9], který je umístěný na povrchu buňky a RHAMM [10], který zprostředkovává pohyblivost hyaluronanu. Různé tumory, např. epitheliální, střevní, žaludeční, tumor vaječníku a akutní leukémie, mají velký počet receptorů CD44 a RHAMM. V důsledku toho tyto buňky vykazují zvýšené vázání a internalizaci hyaluronanu. Mechanismus vázání hyaluronanu na receptor CD44 dosud není objasněn, ale uvádí se, že CD44 obsahuje speciální vazebné místo pro hyaluronan [9].

Vysoká specifita tumoru k interakcím receptoru CD44 s hyaluronanem a vysoká biokompatibilita hyaluronanu inspirovala k vytvoření konjugátu hyaluronanu s cytotoxinem k cílené léčbě tumoru. Konjugace nízkomolekulárního hyaluronanu s cytotoxickými léky jako je paclitaxel, doxorubicin, mitomycin C a máselná kyselina byla již popsána v literatuře. Konjugace hyaluronanu s paclitaxelem využívá dihydrazidovou vazbu ke karboxylovým skupinám hyaluronanu a ukázalo se, že se tento konjugát dostane do rakovinné buňky pomocí CD44 receptorů řízených endocytózou, kde následně došlo k uvolnění aktivního léku [11, 12].

Mitomycin C byl k hyaluronanu připojen amidovou vazbou mezi lékem a karboxylovými skupinami polymeru. Tento konjugát projevuje vynikající účinky při potlačování metastáz rakoviny [13]. Byla studována směs esterů hyaluronanu s kyselinou retinovou a máselnou pro léčbu akutní promyelocytické leukémie [14].

V této práci se snažíme zjistit, zda v tenzidických systémech dochází k přenosu energie a jaký je vliv přídatku nativního a modifikovaného hyaluronanu do tohoto systému na přenos energie. Díky tomu je možné získat informace o chování micelárních systémů bez a v přítomnosti hyaluronanu. Pokud bude docházet k přenosu energie, bude možné zjistit vzdálenost dvou fluoroforů a při zvolení vhodné dvojice fluoroforů bude možné odhadnout velikost agregátů, které tenzid vytvoří. Možnost studovat vliv přídatku nativního či modifikovaného hyaluronanu na vliv na velikost agregátů může být určující pro schopnost solubilizace daného systému. Pomocí splývání micel bude možné odhadnout jak je systém schopen „udržet“ solubilizovanou látku uvnitř micel, což může být určující vlastnost pro cílenou distribuci léčiv.

2. TEORETICKÁ ČÁST

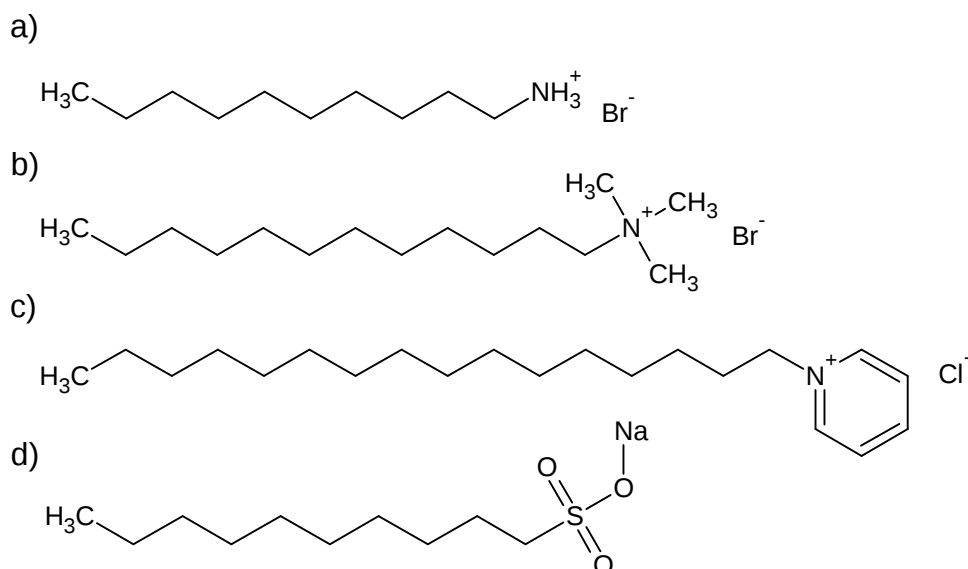
Tato kapitola se zabývá teoretickými poznatky, které jsou důležitými podklady pro tuto práci. Na jejím začátku se zabýváme tenzidy, jakožto modelovým systémem, poté samotným hyaluronanem a měřicí metodou, tedy molekulovou absorpční a emisní spektroskopií. Poslední část této kapitoly se zabývá rezonančním přenosem energie, zhášením a rozdílem v mechanismu mezi nimi.

2.1 Tenzidy

Povrchově aktivní látky, které dále vykazují čistící, emulgační a smáčecí účinky nazýváme tenzidy. U těchto sloučenin jsou pozorovány vlastnosti podobné vlastnostem biologických membrán a jsou pozorovány také katalytické účinky.

2.1.1 Struktura a vlastnosti tenzidů

Tenzidy mění energetické poměry na fázovém rozhraní, což se projevuje snížením povrchového napětí kapalin a adsorpcí monomeru tenzidu na fázovém rozhraní. Tyto sloučeniny mají asociační schopnosti, při určité koncentraci jejich monomery asociují za vzniku větších agregátů-micel. Této koncentraci se říká kritická micelární koncentrace. Základní vlastnosti tenzidů jsou dány jejich amfifilní strukturou s asymetrickým dipolárním charakterem. V molekule tenzidu je vždy lokalizována polární a nepolární část různého charakteru. Podle náboje se obvykle tenzidy dělí na ionogenní a neionogenní.



Obrázek 1: a) decylamonium bromid, b) dodecyltrimethylamonium bromid, c) cetylpyridinium chlorid, d) dodecylsulfát sodný

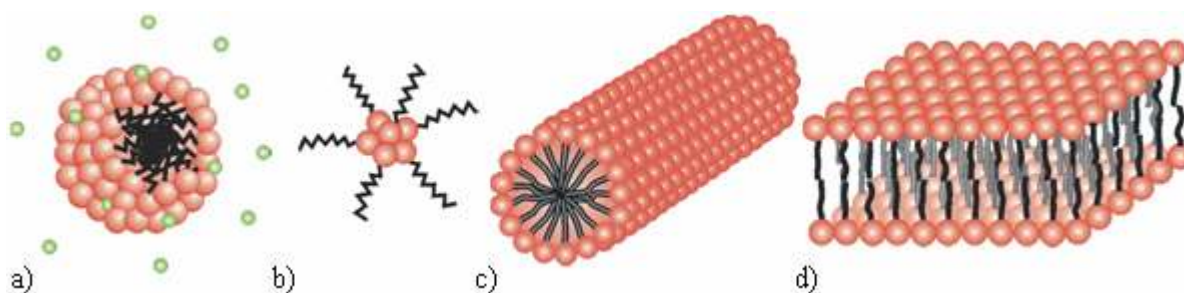
Ionogenní tenzidy jsou například decylamoniumbromid, dodecyltrimethylamoniumbromid (DTAB), tetradecyltrimethylamoniumbromid (TTAB), cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), dodecylsulfát sodný (SDS), dodekanoát sodný, 3-(dodecyldimethylamonio)-1-propansulfonát nebo 1-(trimethylamonio)tetradekanoát.

Neionogenní tenszidy jsou polyoxyethylen(3)dekanol, polyoxyethylen(9,5)oktylfenol (Triton X-100) a polyoxyethylen(23)dodekanol (Brij 35). Na obrázku 1 můžeme vidět přehled několika výše jmenovaných tenszidů.

2.1.2 Micely

Micely vytvářejí amfifilní molekuly, tedy molekuly obsahující polární „head-group“ a jeden nebo víc dlouhých nepolárních „tail-groups“. Polární část je hydrofilní a nepolární část je hydrofobní. Tvorba micel probíhá tak, že se v polárním rozpouštědle izolují hydrofobní konce tenszidů a v nepolárním rozpouštědle hydrofilní.

Kritická koncentrace tvorby micel (CMC) je koncentrace tenszidu, při níž dochází k nasycení povrchu a začínají se tvořit micely. Při koncentracích vyšších než je CMC, jsou micely stabilní. CMC je daná zejména strukturou tenszidu a je pro každý tenszid charakteristická. Je ovlivněna především teplotou a vlastnostmi rozpouštědla. CMC neionogenních tenszidů bývá zpravidla nižší než CMC ionogenních. Agregací číslo (N_{ag}) je počet molekul tenszidu, které tvoří micelu. Většinou se jeho hodnota pohybuje v rozmezí 10–100. Třetí charakteristickou veličinou je micelární hmotnost, která vyjadřuje hmotnost jednoho molu micel.



Obrázek 2: a) klasická micela, b) obrácená micela, c) válcovitá micela, d) laminární micela [15]

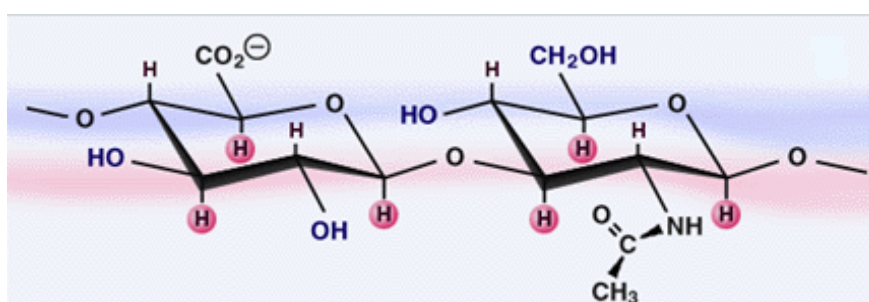
Na obrázku 2 můžeme vidět některé typy micel. Klasické micely vznikají z ionogenních tenszidů v polárních rozpouštědlech a jádra těchto micel jsou tvořena hydrofobními uhlovodíkovými řetězci (vlastnosti kapalného uhlovodíku). Vedle sférických micel bývají pozorovány i micely cylindrické, hexagonální a laminární.

2.2 Hyaluronan

Hyaluronan je přítomný v pojivových tkáních a hraje zásadní roli v mnoha biologických procesech jako je hydratace tkáně, organizace proteoglykanů v extracelulární matrix a diferenciace buněk.

2.2.1 Historie a chemická struktura

V roce 1934 se Karlu Meyerovi a jeho asistentovi podařilo izolovat nový glykosaminglykan, který obsahoval kyselinu močovou a aminocukr, ale žádný sulfoester. Tuto sloučeninu nazvali kyselina hyaluronová. Dnes se jí obecně říká hyaluronan, protože *in vivo* existuje v iontové formě jako polyanion.



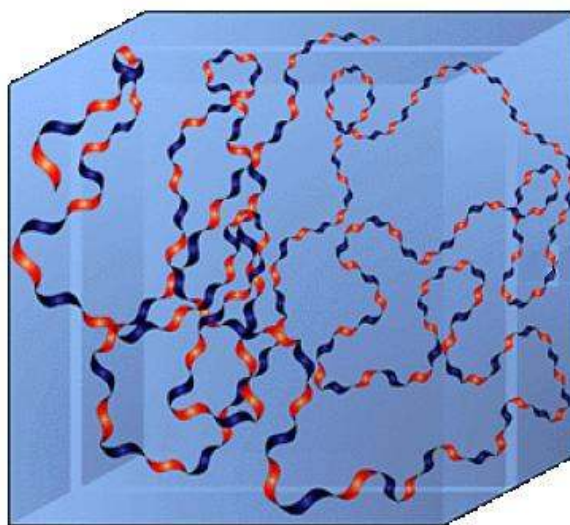
Obrázek 3: Chemická struktura hyaluronanu [16]

Struktura hyaluronanu je tvořena dvěma sacharidovými jednotkami, které jsou spojeny střídajícími se beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickými vazbami. Její zakreslení můžeme vidět na obrázku 3. Červeně jsou zvýrazněny axiální vodíky, které jsou zodpovědné za nepolární charakter části hyaluronanu (viz červené pozadí). Modrým pozadím je označená polární část molekuly.

2.2.2 Polymerní struktura a struktura v roztoku

Enzymy syntetizující hyaluronan vytvářejí široké lineární polymery s opakující se disacharidovou strukturou hyaluronanu a střídavým přídavkem glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu. Počet opakujících se disacharidových jednotek v kompletní molekule může dosáhnout 10 000 a více, molární hmotnost je kolem 4 milionů g mol^{-1} . Molekula o 10 000 disacharidových jednotek může mít délku až 10 μm .

Páteř molekuly hyaluronanu je ve fyziologickém roztoku vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, interních vodíkových vazeb a interakcemi s rozpouštědlem.



Obrázek 4: Struktura hyaluronanu v roztoku [16]

Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, relativně hydrofobní části, čímž vytváří zkroucenou stuhovitou strukturu (viz obr. 4). Světle modrá krychle reprezentuje doménu klubka v roztoku. Střídající se modré a červené části molekuly reprezentují stuhovitou strukturu s modrými (hydrofilními) a červenými (hydrofobními) částmi.

Důsledky doménové struktury hylauronanu jsou velmi zajímavé a důležité. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem do vnitřku domény. Avšak velké molekuly, jako jsou proteiny jsou částečně vyřazeny z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti v roztoku.

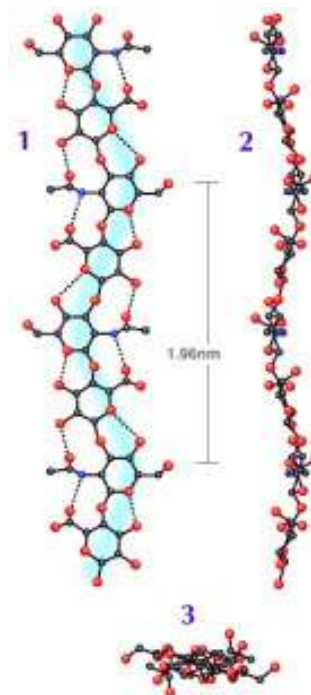
Síť hylauronanu v doméně ponechává menší prostor pro molekuly, které jsou větší. To vede k pomalejší difúzi makromolekul sítě a k jejich nižším koncentracím v síti v porovnání s úseky tvořenými okolním hylauronanem. Řetězce hylauronanu se v roztoku neustále pohybují a díky tomu se mění velikost efektivních průniků v síti. Statisticky existují všechny velikosti pórů, jen s různou pravděpodobností, což principiálně znamená, že všechny molekuly mohou projít hylauronovou sítí, ale s různými stupni zpomalení, které závisí na jejich hydrodynamických objemech.

2.2.3 Uspořádaná struktura v roztoku

Řetězce hylauronanu obsahují dva typy vazeb. První, sacharidové jednotky, relativně udržují svůj tvar. Mezi těmito rigidními jednotkami existují glykosidické vazby, které se k sobě vážou přes kyslík. Na každém glykosidickém můstku existuje několik možných konfigurací. Když vynásobíme tuto možnost počtem můstků v dlouhém řetězci dostaneme velmi vysoký počet tvarů molekuly. Uspořádání molekuly vypadá jako kdyby bylo náhodné, ale není.

Struktura je dvojnásobná spirála (ne dvojšroubovice, která obsahuje dva řetězce), ve které velmi důležitou roli hraje i voda. Tato jakoby pásková struktura ukazuje mírná zakřivení jak v průmětu, tak i v prostorové projekci viz obrázek 5.

Význam této sekundární struktury je, že dvojité spirála obsahuje rozsáhlou hydrofobní část o velikosti osmi uhlíkových atomů, což je zhruba stejná velikost, jakou má kyselina oktanová. Takže hylauronan má vlastnosti vysoce hydrofilního materiálu a zároveň obsahuje hydrofobní domény charakteristické pro lipidy. Molekula je tedy amfifilní.



Obrázek 5: Struktura hylauronanu; 1- průmět, 2- prostorová projekce, 3- pohled podél osy dvojnásobné spirály [16]

2.2.4 Metabolismus hyaluronanu a jeho viskoelastické vlastnosti

Metabolismus hyaluronanu je vysoce dynamický. Některé buňky, jako jsou chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan během doby života tkáně. Syntéza je obvykle v rovnováze s rozkladem, přičemž v tkáni zůstává konstantní koncentrace hyaluronanu. Metabolické studie říkají, že poločas rozpadu molekuly hyaluronanu v chrupavce je obvykle 2–3 týdny. Poločas rozpadu hyaluronanu v krvi je však velmi krátký, jen několik minut.

V některých případech v buňkách převládá syntéza nebo rozklad hyaluronanu. Například v buňkách kožní vrstvy převažuje syntéza před rozkladem.

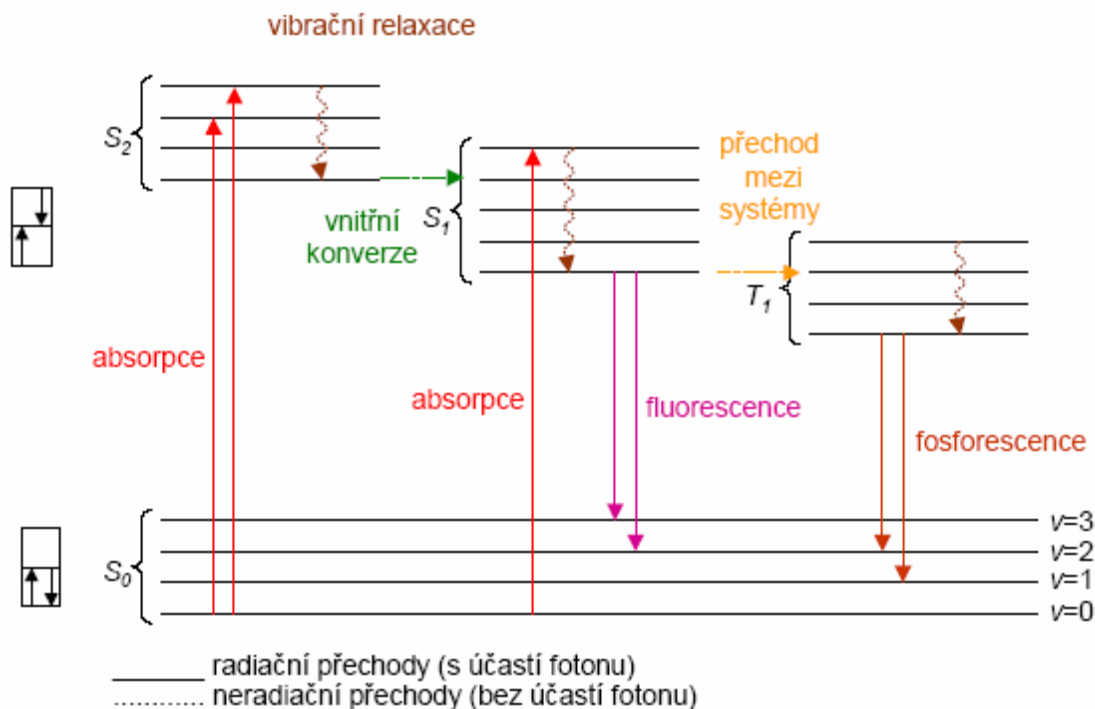
Koncentrace hyaluronanu v tkáních je často vyšší než se očekává, když jednotlivé molekuly udržují jejich rozbalené doménové struktury. Ve většině případů je hyaluronan organizován do extracelulární matrix pomocí specifických interakcí s ostatními makromolekulami v matrix. Vysokomolekulární hyaluronan ve vysokých koncentracích může tvořit zapletené molekulární sítě díky sterickým interakcím a vlastní asociaci mezi a uvnitř jednotlivých molekul. Ten druhý případ se objevuje, pokud úsek hydrofobní části vyztužené páteře molekuly interaguje reversibilně s hydrofobním povrchem na srovnatelném úseku jiné molekuly nebo v jiné části té samé molekuly. Tyto sítě vykazují jiné vlastnosti než izolované molekuly hyaluronanu. Můžou klást odpor rychlému, krátce trvajícimu toku sítí a tím vykazují elastické vlastnosti, které mohou šířit různé síly uvnitř sítě. Na druhou stranu, pomalý, dlouhotrvající tok tekutiny může částečně separovat a srovnat molekuly, přičemž povoluje pohyb a projev viskózních vlastností molekul.

2.3 Molekulová absorpční spektrometrie v UV – VIS oblasti

Tato metoda patří mezi nejstarší a nejoblíbenější fyzikálně-chemické metody. Je přesná, rychlá, citlivá a experimentálně nenáročná [17]. Molekulová absorpční spektrometrie sleduje absorpci elektromagnetického záření v UV a VIS oblasti, tedy v rozsahu od 200 do 800 nm. Při absorpci záření v UV nebo VIS oblasti spektra, dojde k elektronovému přechodu valenčního elektronu. Známe několik typů přechodů. Přechody dovozené – ze základní singletové do excitované singletové hladiny; $\epsilon_{\max} \approx 10^4\text{--}10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Přechody spinově zakázané – málo pravděpodobné přechody ze základní singletové do excitované tripletové hladiny; $\epsilon_{\max} \approx 10^0 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Přechody symetricky zakázané $\epsilon_{\max} \approx 10^2 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; vibrace jader molekuly vede k diferenci v rozdělení elektronů a tím ke změně dipólového momentu molekuly a přechodu elektronů. Za absorpci záření v UV-VIS je odpovědná funkční skupina v molekule a označuje se jako chromofor.

2.4 Fluorescenční spektroskopie

Při absorpci světelného kvanta molekulou dojde ke změně elektronové konfigurace na konfiguraci odpovídajícího excitovaného stavu. Může dojít k vytvoření jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů. Singletový stav (S_1), kde jsou spiny obou



Obrázek 6: Jablonskiho diagram

elektronů antiparalelní (spin elektronu se během přechodu nemění) a tripletový stav (T_1), kde jsou spiny obou elektronů paralelní. Pokud se molekula zbaví přebytečné energie emisí světla, hovoříme o luminiscenci. Luminiscenční jevy jsou definovány na základě multiplicity excitovaného stavu, který emituje. Pokud dochází k emisi ze singletového stavu, jedná se o fluorescenci, pokud dojde k mezisystémovému přechodu a následně k emisi záření, jedná se o fosforescenci (viz obr. 6). Fluorescence je proces velmi rychlý ($k_F \sim 10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$) a spinově „dovolený“ díky zachování multiplicity. Delší doba života fosforescence je přímý následek „zakázaného“ zářivého přechodu z tripletového stavu na stav singletový, jelikož se mění multiplicita.

2.4.1 Kvantový výtěžek fluorescence

Kvantový výtěžek fluorescence Φ_F je podíl excitovaných molekul, které se vrátí do základního stavu s vyzářením fotonů. Jinými slovy je to podíl počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. S použitím doby života záření můžeme kvantový výtěžek definovat:

$$\Phi_F = \frac{\tau_S}{\tau_r} \quad (1)$$

kde τ_S je doba života excitovaného stavu S_1 a τ_r je zářivá doba života. Díky náhodné odchylce může kvantový výtěžek být úměrný době života excitovaného stavu například

v případě dynamického zhášení nebo teplotních rozdílů. Typický příklad, kdy kvantový výtěžek fluorescence není zasažen změnami doby života excitovaného stavu je vytvoření komplexu v základním stavu, který nefluoreskuje (statické zhášení).

Je velmi dobře známo, že kyslík zháší fluorescenci (i fosforescenci), ale jeho efekt na kvantový výtěžek a dobu života silně závisí na povaze sloučeniny a média. Například sloučeniny s dlouhou dobou života (například pyren) jsou citlivé na přítomnost kyslíku. Oproti tomu ve viskózním médiu není zhášení kyslíkem příliš účinné. Zhášení kyslíkem se můžeme vyvarovat tím, že necháme roztokem bublat dusík nebo argon.

2.4.1.1 Stanovení kvantových výtěžků fluoroforů

Kvantové výtěžky se většinou určují podle fluorescenčního standardu, tzn. sloučeniny, která má známý kvantový výtěžek a ideálně splňuje určitá kritéria (např. dostupné v čisté formě, fotochemicky stálé, vysoký kvantový výtěžek, apod.). K minimalizaci nepřesností se vybírá standard, který se excituje při stejné vlnové délce jako sloučenina a emisní spektrum pokrývá stejný rozsah. Přehled standardů najdeme v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled standardů k určení kvantového výtěžku [18]

Rozsah (nm)	Sloučenina	Teplota (°C)	Rozpouštědlo	Kvantový výtěžek
270–300	Benzen	20	Cyklohexan	0,05 ± 0,02
300–380	Tryptofan	25	Voda, pH 7,2	0,14 ± 0,02
300–400	Naftalen	20	Cyklohexan	0,23 ± 0,02
315–480	2-aminopyridin	20	0,1 M H ₂ SO ₄	0,60 ± 0,05
360–480	Anthracen	20	Ethanol	0,27 ± 0,03
400–500	9,10-difenylnthracen	20	Cyklohexan	0,90 ± 0,02
400–600	Chinin sulfát dihydrát	20	0,5 M H ₂ SO ₄	0,546
600–650	Rhodamin 101	20	Ethanol	1,00 ± 0,02
600–650	Krystalová violet	20	Methanol	0,54 ± 0,03

Fluorescenční spektra zředěných roztoků ($A < 0,05$) sloučeniny a standardu musí být pořizována za stejných podmínek (např. citlivost detektoru fluorimetru). Dále se musí kontrolovat teplota, protože kvantový výtěžek je závislý na teplotě. Pokud je použito různé rozpouštědlo pro standard a pro sloučeninu, je potřeba zahrnout index lomu.

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \cdot \frac{\text{Grad}_x}{\text{Grad}_{ST}} \cdot \frac{n_{R_x}^2}{n_{R_{ST}}^2} \quad (2)$$

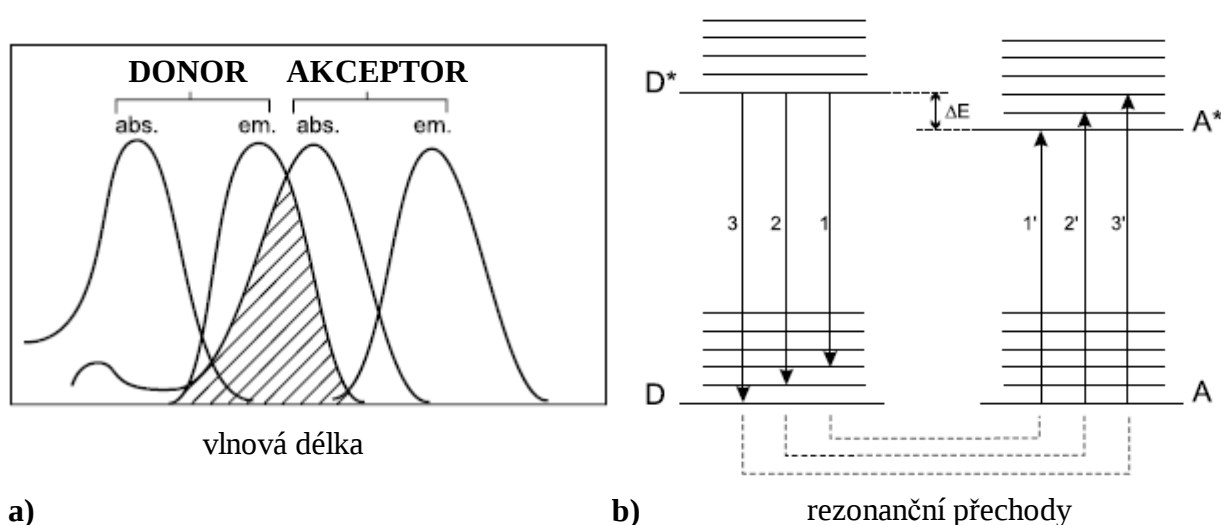
kde Φ_x představuje hledaný kvantový výtěžek, Φ_{ST} je kvantový výtěžek standardu, n_{R_x} je index lomu rozpouštědla, ve kterém se nachází stanovovaná látka, $n_{R_{ST}}$ je index lomu rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěn standard a Grad_x a Grad_{ST} jsou směrnice přímkové části závislosti $F_{\text{int}} = f(A)$ pro stanovovanou látku a pro standard

2.4.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Existují sondy citlivé na polaritu, změnu pH nebo třeba na viskozitu okolního prostředí.

2.4.3 Rezonanční přenos energie

Studium rezonančního přenosu energie je technika, která pomáhá řešit fotofyzikální procesy a poslední dobou nabývá stále většího ohlasu. Je jednoduše založena na přenosu energie, který je závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru, a její aplikace nacházejí široké



Obrázek 7: Spektrální překryv donoru a akceptoru, b) Energie vibračních přechodů donoru a akceptoru [18]

pole působnosti. Díky její citlivosti na vzdálenost se tato metoda stala efektivním prostředkem k měření vzdálenosti v měřítku nanometrů a ke zkoumání molekulových interakcí.

Přenos energie se uskutečňuje zářivými a nezářivými mechanismy. K zářivému (triviálnímu) přenosu energie dochází, když excitovaná molekula donoru emituje záření, které je následně reabsorbováno molekulou akceptoru.

K excitaci nezářivým přenosem energie (RET – resonance energy transfer) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie tedy nedochází k emisi světla donorem.

Nezářivý přenos excitační energie vyžaduje interakci mezi molekulou donoru a akceptoru. Přenos nastává, pokud se emisní spektrum donoru překrývá s absorpčním spektrem akceptoru (Obr. 7a) tak, aby některé vibrační přechody měly prakticky stejnou energii, jako odpovídající přechody v akceptoru. Takové přechody jsou spřažené, neboli rezonanční (obr. 7b).

Rychlostní konstanta přenosu energie je závislá na rozsahu překrytí emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, kvantovém výtěžku donoru, vzájemné orientaci

přechodových dipól momentů donoru a akceptoru a na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem.

2.4.3.1 Försterova formulace dipól – dipólového přenosu ve velké vzdálenosti

Förster odvodil následující vztah pro rychlostní konstantu přenosu jak z klasických úvah, tak i na základě kvantové mechaniky:

$$k_T^{dd} = k_D \cdot \left[\frac{R_0}{r} \right]^6 = \frac{1}{\tau_D^0} \cdot \left[\frac{R_0}{r} \right]^6 \quad (3)$$

kde k_D je rychlostní konstanta emise donoru, τ_D^0 jeho doba života bez přenosu, r je vzdálenost mezi donorem a akceptorem (za předpokladu, že se během života donoru nemění) a R_0 je kritický Försterův poloměr, tedy vzdálenost, při které jsou přenos a spontánní rozklad excitovaného stavu donoru stejně pravděpodobné. Jeho výpočet ze získaných spektroskopických dat je následný:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D^0}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (4)$$

kde κ^2 je orientační faktor, Φ_D^0 je fluorescenční kvantový výtěžek donoru bez přenosu energie, n je průměrný index lomu média, I_D je normalizované spektrum donoru tak, že $\int_0^\infty I_D(\lambda)d\lambda = 1$, a ϵ_A je molární absorpční koeficient akceptoru. Po zjednodušení získáme:

$$R_0 = 0,2108 \left[\kappa^2 \Phi_D n^{-4} \int_0^\infty I_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \right]^{\frac{1}{6}} \quad (5)$$

Orientační faktor κ^2 nabývá hodnot od 0 (v případě, že jsou přechodové momenty kolmé) do 4 (v případě, že přechodové momenty leží na stejné přímce). Pokud jsou přechodové momenty rovnoběžné, $\kappa^2 = 1$.

Pokud se molekuly mohou volně otáčet rychlostí, která je o mnoho vyšší než rychlost deexcitace donoru, průměrná hodnota orientačního faktoru je 2/3, v rigidním médiu je jeho hodnota 0,476.

Účinnost přenosu je spojena s poměrem $\left(\frac{r}{R_0} \right)$:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0} \right)^6} \quad (6)$$

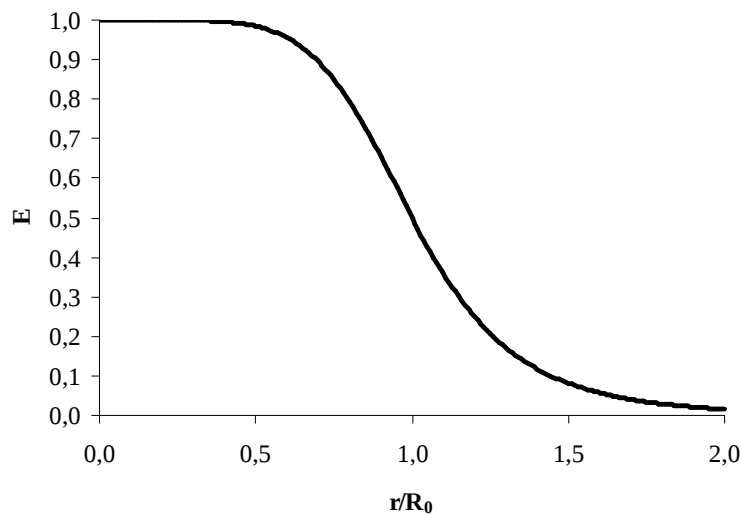
50% účinnost je v případě, že vzdálenost mezi donorem a akceptorem je rovna Försterovu poloměru. Účinnost přenosu může být zapsána také v této formě:

$$E = 1 - \frac{\tau_D}{\tau_D^0} = 1 - \frac{I}{I_0} \quad (7)$$

kde τ_D^0 a τ_D jsou délky života v excitovaném stavu donoru bez a v přítomnosti akceptoru a I a I_0 jsou intenzity fluorescence donoru v přítomnosti akceptoru a bez ní.

2.4.3.2 Určování vzdáleností pomocí RET na supramolekulární úrovni

Försterův rezonanční přenos energie může být použit jako „spektroskopické pravítko“ pro vzdálenosti v rozmezí 10–100 Å. Vzdálenost mezi donorem a akceptorem by měla být během doby života donoru konstantní a větší než 10 Å, aby se zamezilo interakcím na krátké vzdálenosti.



Obrázek 16: Průběh účinnosti přenosu energie při různých poměrech vzdálenosti donoru a akceptoru ku kritickému poloměru R_0

Předpokládejme případ, kdy se donor i akceptor může volně otáčet rychlostí vyšší než je rychlost přenosu energie, takže orientační faktor κ^2 je 2/3. Vzdálenost mezi donorem a akceptorem tedy může být určena pomocí stacionárního měření přes hodnotu účinnosti přenosu (viz vztah 6):

$$r = \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} \cdot R_0 \quad (8)$$

Mohou být použity tři stacionární metody, pomocí kterých je možné určit účinnost přenosu energie.

1) Pokles fluorescence donoru

Přenos způsobí pokles kvantového výtěžku donoru. Účinnost přenosu je dána:

$$E = 1 - \frac{\Phi_D}{\Phi_D^0} \quad (9)$$

kde Φ_D^0 a Φ_D jsou kvantové výtěžky donoru bez a v přítomnosti akceptoru. Vzhledem k tomu, že lze získat pouze relativní kvantové výtěžky, jediná pozorovací vlnová délka je postačující a druhá je vybrána tak, že akceptor neemituje. Díky tomu vztah 9 může být vyjádřen pomocí absorbancí při excitační vlnové délce donoru λ_D a intenzit fluorescence donoru bez a v přítomnosti akceptoru:

$$E = 1 - \frac{A(\lambda_D)}{A_D(\lambda_D)} \cdot \frac{I_D(\lambda_D; \lambda_D^{em})}{I_D^0(\lambda_D; \lambda_D^{em})} \quad (10)$$

Faktor A/A_D vychází z polovičního příspěvku akceptoru k celkové absorpci při excitační vlnové délce. Je třeba věnovat pozornost vnitřnímu filtračnímu efektu způsobenému absorpcí akceptoru při emisní vlnové délce donoru.

2) Porovnání absorpčního a excitačního spektra

Korigované excitační spektrum reprezentuje vztah:

$$I_A(\lambda, \lambda_A^{em}) = C\Phi_A[A_A(\lambda) + A_D(\lambda)E] \quad (11)$$

kde C je konstanta (přístrojový faktor). Absorpční spektrum je definováno:

$$A(\lambda) = A_A(\lambda) + A_D(\lambda) \quad (12)$$

V případě úplného přenosu ($E = 1$) jsou tato spektra po normalizaci na stejnou výšku identická. Pokud je hodnota E nižší než 1, excitační pás odpovídající donoru je relativně nižší než absorpční pás. Porovnání absorpčního a excitačního spektra může být provedeno při dvou vlnových délkách λ_D a λ_A odpovídajících absorpčním maximům donoru a akceptoru. Pokud donor vůbec neabsorbuje při λ_A , můžeme napsat:

$$E = \frac{A_A(\lambda_A)}{A_D(\lambda_D)} \cdot \left[\frac{I_A(\lambda_D, \lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A, \lambda_A^{em})} - \frac{A_A(\lambda_D)}{A_A(\lambda_A)} \right] \quad (13)$$

3) Zvýšení fluorescence akceptoru

Intenzita fluorescence akceptoru je v případě přenosu energie zvýšena. Porovnání intenzity fluorescence bez přítomnosti přenosu poskytuje účinnost:

$$E = \frac{A_A(\lambda_D)}{A_D(\lambda_D)} \cdot \left[\frac{I_A(\lambda_D, \lambda_A^{em})}{I_A^0(\lambda_D, \lambda_A^{em})} - 1 \right] \quad (14)$$

Absorbance akceptoru při (λ_D) je hodně malá a tedy těžko měřitelná, proto může docházet k velkým chybám při výpočtech E .

První metoda se zdá být víc přímá než druhá a třetí, nicméně nemůže být použita v případě velmi nízkého kvantového výtěžku donoru.

Časově rozlišená emise poskytuje přímé informace o rychlostní konstantě bez problémů, které vyplývají z vnitřního filtračního efektu.

2.4.4 Zhášení, Stern-Volmerova kinetika

Stern Volmerova rovnice je základní rychlostní rovnice zhášení fluorescence. Většinou je do grafu vynášena závislost poměru intenzit na koncentraci zhášeče (Stern-Volmerova závislost), pokud je závislost lineární, směrnice přímky je hodnota Stern-Volmerovy konstanty. Pokud je známá doba života excitovaného stavu bez přítomnosti zhášeče, je pak možné vypočítat rychlostní konstantu zhášení k_q .

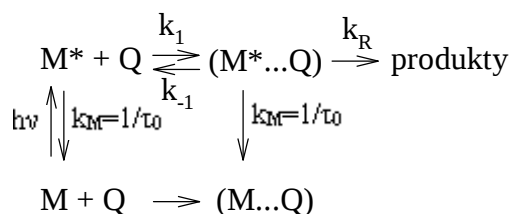
Rychlostní konstanta k_q je uvažována jako časově nezávislá.

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (15)$$

kde I_0 a I jsou intenzity fluorescence bez a v přítomnosti zhášeče a K_{SV} je Stern-Volmerova konstanta. Tato konstanta vyjadřuje citlivost fluoroforu ke zhášeči. Má nízkou hodnotu např. v micelách nebo v jiném prostředí, kde není možný kontakt fluoroforu a zhášeče.

Bylo rozpoznáno několik případů, ve kterých intermolekulární procesy zahrnují soutěž mezi excitovanou molekulou (M^*) a zhášečem (Q).

- 1) Existuje velký nadbytek Q , to znamená, že existuje vysoká pravděpodobnost, že M^* a Q jsou v době excitace tak blízko, že jejich vzájemná interakce je velmi významná. Pak je potřeba vzájemného přiblížení obou molekul během doby života excitované molekuly. Pokud je pravděpodobnost toho, že se zhášeč nachází ve vzdálenosti, kdy může reagovat s M^* menší než 1, tato situace odpovídá statickému zhášení.
- 2) Zhášeč není v nadbytku, nicméně není možné přiblížení M^* a Q během doby excitovaného stavu, protože doba života excitovaného stavu je příliš krátká nebo je příliš viskózní médium. Zhášení se tedy projeví jen pokud je vzájemná interakce významná i ve vzdálenostech větší než je kolizní. To je případ nezářivého přenosu energie na dlouhé vzdálenosti a vyskytuje se u molekul, které mají vzájemnou vzdálenost větší než 8 nm.
- 3) Zhášeč není v nadbytku, ale je možné přiblížení M^* a Q během doby života excitovaného stavu. Tento bimolekulární proces je kontrolován difúzí a typ tohoto zhášení je dynamické zhášení. Při vyšších koncentracích zhášeče se mimo dynamické zhášení může objevit i statické. Schéma dynamického zhášení můžeme vidět na obrázku 8.



Obrázek 8: Reakční schéma dynamického zhášení [18]

Pokud Q je stejná sloučenina jako M (samozhášení bez tvoření produktů), komplex (MM*) se nazývá excimer (nebo excitovaný dimer) a má své vlastní fluorescenční spektrum a dobu života.

Kinetická analýza schématu na obrázku číslo 8 rozlišuje tři hlavní případy:

1) $k_R \gg k_1[Q]$, $k_{-1}, \frac{1}{\tau_0}$: bimolekulární proces je limitovaný difúzí: $k_q = k_1$, rychlostní

konstanta difúze je vyjádřena Smoluchowského rovnicí:

$$k_1 = 4\pi NR_c D \quad (16)$$

kde R_c je nejkratší kontaktní vzdálenost (v cm), D je vzájemný difúzní koeficient a N je $N_A/1000$. Nejkratší kontaktní vzdálenost se většinou počítá jako součet poloměrů obou molekul (R_M pro sondu a R_Q pro zhášec). Vzájemný difúzní koeficient je součet dvou translačních difúzních koeficientů vyjádřený Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D = D_M + D_Q = \frac{kT}{f\pi\eta} \left(\frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_Q} \right) \quad (17)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, η je viskozita média, a f je koeficient, který má hodnotu 6 pro kulovité a 4 pro ploché hraniční podmínky.

Difúzní koeficient má ve většině rozpouštědel při pokojové teplotě hodnotu řádově $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Pokud mají R_M a R_Q řádově stejné hodnoty, pak rychlostní konstanta difúze je přibližně rovna $8RT/3\eta$.

2) $k_R \ll k_1[Q]$, $k_{-1} \gg \frac{1}{\tau_0}$: rovnováhy se dosáhne především tvorbou produktů

3) k_R má stejnou řádovou hodnotu nebo nižší než ostatní rychlostní konstanty: k_q je menší než k_1 a může být napsána vztahem:

$$k_q = p \cdot k_1 \quad (18)$$

kde p je pravděpodobnost setkání a reakce párů (často nazývaná účinnost).

Pro reakce kontrolované difúzí je třeba zdůraznit, že získaná hodnota rychlostní konstanty zhášení je časově závislá. Ve skutečnosti, excitované fluorofory M^* , které jsou blízko zhášeče Q , v době excitace reagují v průměru kratší dobu, než ty co jsou od sebe vzdálenější, protože jejich vzájemné přiblížení vyžaduje delší čas než začne reakce. Důležitý následek toho je, že křivka poklesu fluorescence na úplném začátku po pulzní excitaci, je tímto ovlivněna. Tyto přechodné efekty nejsou významné při nižších koncentracích zhášeče v kapalných rozpouštědlech, ale při vyšších koncentracích zhášeče či viskózním rozpouštědle už jsou znatelné.

2.4.4.1 Dynamické (kolizní) zhášení

Dynamické zhášení je popsáno Stern-Volmerovou rovnicí, viz vztah 15. Pokud víme, že zhášení je čistě dynamické, pak převrácená hodnota konstanty K_{SV} odpovídá koncentraci zhášeče, kdy je účinnost zhášení 50%.

Zda je zhášení dynamické lze zjistit měřením časově rozlišené fluorescence. Pokud platí rovnost $\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$, lze říci, že jde o dynamické zhášení.

2.4.4.2 Statické zhášení, rozsah efektivního zhášení

Pokud M^* a Q nemění v prostoru svoji vzájemnou polohu během doby života excitovaného stavu M^* (viskózní média, rigidní matrice), navrhl Perrin model, který pokládá zhášení za úplné, pokud je zhášeč situován ve sféře efektivního zhášení, která má objem V_q situovaný vedle flouoroforu M . Pokud je zhášeč mimo tuto sféru, nemá na M žádný vliv. Nicméně intenzita fluorescence klesne po přidání Q , ale úbytek fluorescence po pulzní excitaci zůstane nepoznamenán. Pravděpodobnost, že se zhášeč nachází v tomto objemu vystihuje Poissonovo rozdělení:

$$P_n = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} \cdot e^{-\langle n \rangle} \quad (19)$$

kde $\langle n \rangle$ je průměrný počet zhášečů v objemu V_q , $\langle n \rangle = V_q N_A [Q]$, přičemž N_A je Avogadrovo číslo a V_q je efektivní sféra zhášení. Pravděpodobnost, že se v tomto objemu nenachází žádný zhášeč:

$$P_0 = e^{-\langle n \rangle} \quad (20)$$

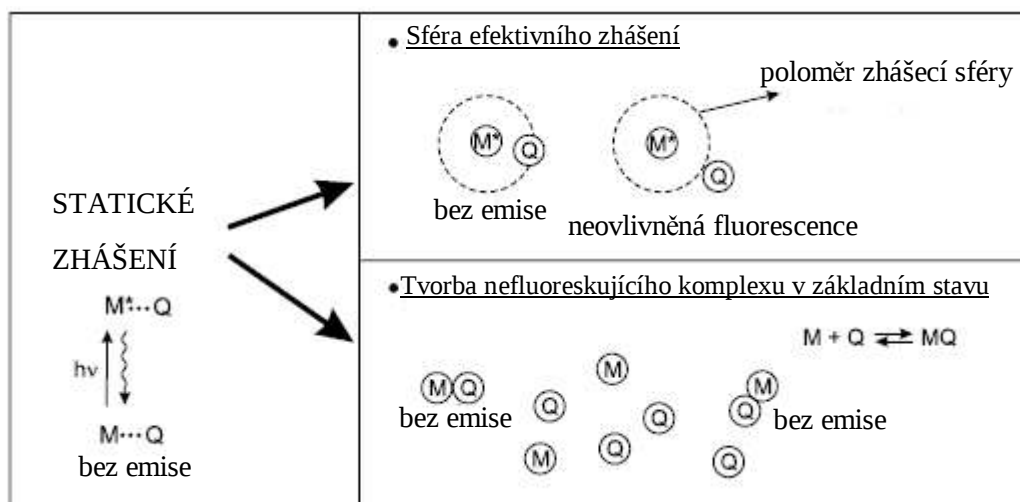
Protože intenzita fluorescence je úměrná P_0 , Perrinův model přechází v

$$\frac{I_0}{I} = \exp(V_q N_A [Q]) \quad (21)$$

Oproti Stern-Volmerově rovnici závislost není lineární, ale vykazuje zakřivení při vyšších koncentracích zhášeče. Při nižších koncentracích zhášeče je graf lineární stejně jako v případě Stern-Volmerovy rovnice. Vynesením závislosti poměru intenzit proti koncentraci zhášeče dostaneme V_q .

2.4.4.3 Statické zhášení, tvorba nefluoreskujícího komplexu

Pokud dochází k tvorbě nefluoreskujícího komplexu, doba života excitovaného stavu, na rozdíl od dynamického zhášení, zůstane nezměněná. Intenzita fluorescence roztoku klesá s rostoucí koncentrací zhášedce, ale pokles fluorescence po excitaci pulzem zůstane nezměněný. Chinony, hydrochinony, puriny a pyrimidiny jsou známy tím, že způsobují statické zhášení. Rozdíl mezi oběma zmíněnými modely statického zhášení je zakreslen na obrázku 17.



Obrázek 17: Dva typy statického zhášení: na horním obrázku je znázorněna sféra efektivního zhášení, na spodním obrázku je uveden případ tvorby nefluorescentního komplexu [29]

Za předpokladu, že intenzita fluorescence je úměrná koncentraci (ve zředěných roztocích), je možné napsat tento vztah:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s [Q] \quad (22)$$

Stejně jako ve Stern-Volmerově vztahu (viz vztah 15) dostaneme lineární závislost, ale nedochází zde ke změnám doby života excitovaného stavu, kdežto u dynamického zhášení ano. V některých případech může tvorbou takového komplexu dojít ke změnám v absorpčním spektru. Pokud se ale toto nestane, interakce bude spíše nespecifická a tudíž je model sféry efektivního zhášení vhodnější.

2.4.4.4 Současné statické a dynamické zhášení

Může dojít současně ke statickému i dynamickému zhášení. To se projeví v odchylkách linearity závislosti I_0/I na koncentraci zhášedce.

Napřed předpokládejme případ statického zhášení, kdy dochází k tvorbě nefluoreskujícího komplexu. Poměr I_0/I získaný z dynamického zhášení je potřeba vynásobit poměrem fluoreskujících molekul (těch, které nejsou součástí komplexu). Po určitých úpravách je možné vztah vystihující poměr zapsat takto:

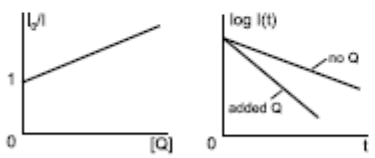
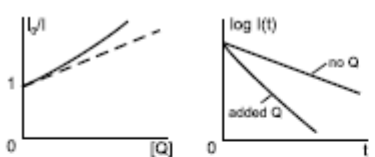
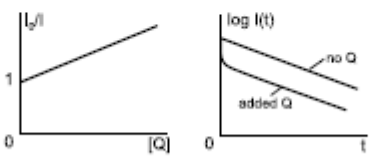
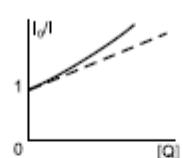
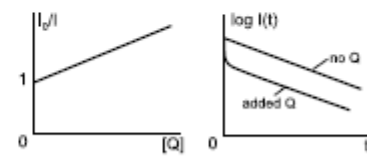
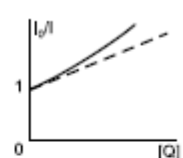
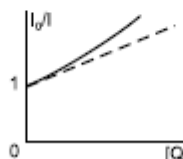
$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_{sv} + K_s)[Q] + K_{sv} K_s [Q]^2 \quad (23)$$

Očekává se tedy zakřivení směrem nahoru. Konstanty K_{SV} a K_S lze získat proložením závislosti nebo z grafu, kdy výraz $[(I_0/I)-1]/[Q]$ je funkcí koncentrace zhášedce. Tato závislost by měla být lineární.

Pokud uvažujeme model efektivní sféry zhášení, místo vztahu 23 dostaneme:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \exp(V_q N_A [Q]) \quad (24)$$

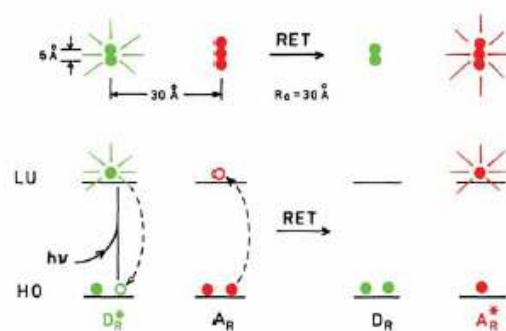
Tato rovnice popisuje například zhášení kyslíkem. Zakřivení směrem nahoru může být také způsobeno přechodnými efekty, stejně jako u dynamického zhášení. Obrázek 18 shrnuje různé případy zhášení dohromady s možnými důvody odchylek od linearit Stern-Volmerovy rovnice.

DYNAMICKÉ ZHÁŠENÍ	STATICKÉ ZHÁŠENÍ	
kolizní proces $\frac{I_0}{I} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q]$ STERN-VOLMER $K_{SV} = k_q \tau_0$  + přechodné efekty 	sféra efektivního zhášení $\frac{I_0}{I} = \exp(V_q N_A [Q])$  + dynamické zhášení $\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \exp(V_q N_A [Q])$ 	tvorba nefluorescentního komplexu $\frac{I_0}{I} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + K_S[Q]$  + dynamické zhášení $\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q])$ 
Dynamické zhášení (s přechodnými efekty) + statické zhášení $\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \frac{\exp(V_q N_A [Q])}{Y}$ 		

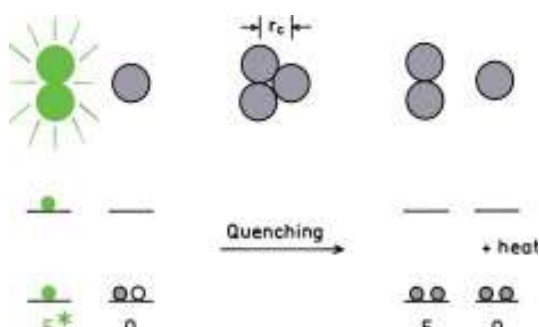
Obrázek 18: Rozdíly mezi dynamickým a statickým zhášením [29]

2.4.5 Rozdíly mezi přenosem energie a zhášením

Jakýkoli proces, který způsobuje úbytek fluorescence může být považován za zhášení. Zhášení je výsledek ztráty energie fluoroforu ve formě tepla. Rezonanční přenos energie snižuje intenzitu fluorescence donoru a dochází k přenosu energie k akceptoru, který může a nemusí být fluorescentní. Na obrázku 9 je zakresleno schéma přenosu energie. Fluorofor má dva elektrony v nejvýše obsazených molekulových orbitalech (HOMO). Absorpcí světla přejde jeden elektron do nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO). Pokud dojde



Obrázek 9: Schéma mechanismu RET [19]



Obrázek 10: Schéma mechanismu zhášení [19]

k přenosu energie, excitovaný elektron donoru se vrátí do základního stavu a současně se excituje elektron akceptoru.

Na obrázku 10 je schematicky zakresleno zhášení fluorescence. Aby došlo ke zhášení, je potřebný kontakt fluoroforu a zhášedce, aby spolu mohly interagovat elektronové oblaky obou molekul. Pokud nastane kontakt mezi excitovaným fluoroforem a zhášedcem, excitovaný elektron se vrátí zpátky do základního stavu. Fluorofor nemůže emitovat a

energie je vyzářena ve formě tepla. Důležitý poznatek je, že zatímco k zhášení dochází v důsledku interakcí fluoroforu a zhášedce na krátkou vzdálenost, tedy musí se potkat, k přenosu energie dochází dipólovými interakcemi na delší vzdálenosti, tzv. interakce prostorem.

Co se týče účinnosti přenosu energie nebo zhášení, tak k výpočtu je použit stejný parametr, doba života fluoroforu (donoru) a rychlostní konstanta přenosu energie nebo rychlostní konstanta zhášení.

Účinnost přenosu energie je dána vztahem:

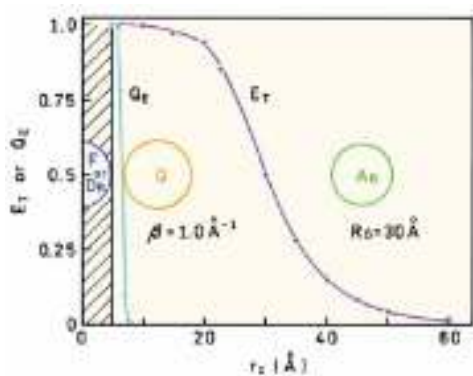
$$E_T = \frac{k_T(r)}{\frac{1}{\tau_D} + k_T(r)} \quad (25)$$

kde k_T je rychlostní konstanta přenosu energie vyjádřená vztahem 6. Účinnost zhášení je dána obdobným vztahem:

$$E_Q = \frac{k_E(r)}{\frac{1}{\tau_D} + k_E(r)} \quad (26)$$

kde k_E je rychlostní konstanta zhášení vyjádřená:

$$k_E(r) = A \cdot e^{-\beta \cdot (r-r_c)} \quad (27)$$



Obrázek 11: Porovnání vlivu vzdálenosti na účinnosti zhášení, resp. přenosu energie [19]

kde r je vzdálenost středů fluoroforu a zhášedce, r_c je nejkratší vzdálenost molekulárního kontaktu. A je konstanta, u které se předpokládá hodnota $\sim 10^{-13} \text{ s}^{-1}$. Hodnota β bývá obvykle kolem 1 Å^{-1} . Vztahy 3 a 6 nám ukazují jak zhášení a přenos energie závisí na vzdálenostech. Na obrázku 11 jsou vyneseny závislosti účinností zhášení popř. přenosu energie na vzdálenosti. Z tohoto obrázku je patrný rozdíl mezi zhášením a přenosem energie z hlediska vlivu vzdálenosti na účinnost.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V této kapitole jsou shrnuty současné poznatky zkoumané problematiky získané pomocí internetové a literární rešerše. Je zde přehled současného využití metody rezonančního přenosu energie a zkoumání přenosu energie v micelárních systémech a vliv jejich na vlastností na tento přenos. Dále kapitola obsahuje využití zhášení fluorescence v koloidních systémech.

3.1 Rezonanční přenos energie

Rezonanční přenos energie je využíván zejména k určení vzdáleností v biomolekulách a supramolekulárních shlucích [18, 20–25]. Poskytuje informace o vzdálenostech v rozmezí 10–100 Å [26]. Protože hlavní charakteristika přenosu energie spočívá ve vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, většina studií rezonančního přenosu energie se zabývá strukturální charakterizací membránových systémů [27].

Interakce komponent, které se vyskytují na povrchu buněk jsou ovlivněny přesnou konformací molekul. Změny konformací mohou být kontrolovány metodou rezonančního přenosu energie s vysokou přesností.[20–22, 28, 29].

Tato metoda je velice přesná, neinvazivní a umožňuje monitorovat hodně aspektů funkcí hormonálních receptorů, které jsou důležité pro kontrolu signálu transdukce endokrinních cest. Fluorescenční rezonanční přenos energie se může použít k vyhodnocení odpovědi na speciální hormonální podněty v reálném čase. Metoda umožňuje studovat membránové proteiny a je také významný nástroj k zjištění funkcí proteinů [30]. Je také značně rozšířená ve využití ke studiu struktury, konformace, prostorové distribuce a shlukování komplexních proteinů [28].

Jako důsledek rezonančního přenosu energie je fotodynamická činnost, které se často využívá při léčbě rakoviny [28, 31]. Kinetika elektronové energie na delší vzdálenost mezi molekulárními sondami, které jsou rozptýleny nebo chemicky navázány na mikroheterogenní systém, jako jsou micely, polymerní klubka v roztoku, mikroemulze, je uznávána jako účinný nástroj k prozkoumání morfologie mikroheterogenního systému stejně dobře jako interakce mezi rozpuštěnou látkou a prostředím na molekulární úrovni [28, 32, 33].

Analýza úbytku fluorescence umožňuje získat parametry jako je průměrné agregační číslo [33, 34], rychlostní konstanta intramicelárního zhášení a rychlostní konstanty spojené s vazbou sondy a zhášeče k micle [34].

V poslední době se rezonanční přenos energie využívá pro mnoho aplikací například detekce DNA a průzkum procesů v živých buňkách [35].

Dále se přenos energie zkoumá v tenzidických systémech [23, 28, 29, 33–44], studuje se vliv normálních a reverzních micel [23, 37–40], vliv náboje tenzidu na přenos energie [41, 43] a vliv koncentrace tenzidu [25, 26, 40]. Díky změnám účinnosti přenosu energie mezi dvěma stejnými fluorofory v různě nabitých tenzidech lze odhadnout umístění fluoroforů v systému [43].

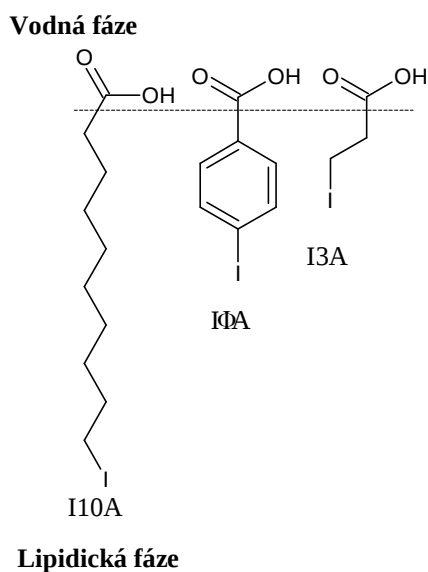
3.2 Zhášení

Zhášení funguje pouze tehdy, když jsou fluorofor a zhášec v kontaktu nebo jsou od sebe vzdáleny méně, než jsou např. rozměry buňky. Lze tedy pomocí zhášení určit umístění fluoroforů v membránách [45]. Pyren a jeho deriváty jsou vhodné fluorofory určené ke zhášení díky dlouhé době života jejich excitovaných stavů. Pokud není zhášec v přímé blízkosti u fluoroforu, je možné během života excitovaného fluoroforu k němu přidifundovat. Zhášení je tedy ovlivněno difúzním koeficientem a dobou života zhášeného fluoroforu. Pyren může být zhášen halogenidy [45, 46], tvorbou exciplexu s kovy, např. Ag^+ [47] nebo aminokyselinami jako je například tryptofan [48]. Pomocí zhášení je možné určit agregační číslo micelárních systémů [46, 49].

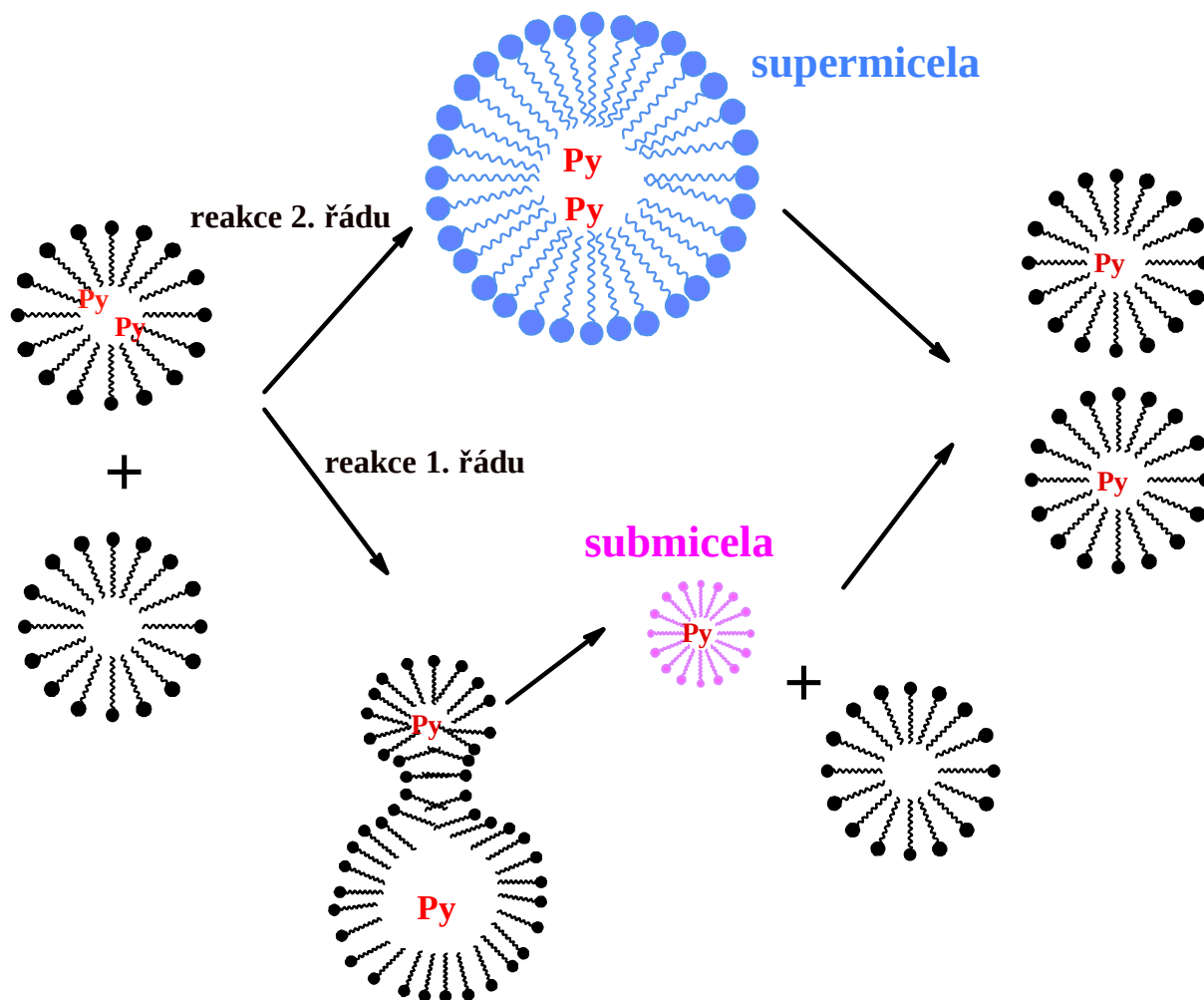
Zhášení halogenidy se používá ke stanovení umístění fluoroforu např. v membráně, či micelárních systémech. Jodid draselný je hydrofilní sloučenina a zháší fluorofory ve vodné fázi.

3-jodpropanová kyselina zháší v palisádové vrstvě a 10-joddekanová kyselina zháší v hydrokarbonové části micely nebo membrány. Podle toho, který z uvedených zhášeců bude zhášet fluorescenci fluoroforu lze tedy odhadnout umístění fluoroforu v micelě či membráně viz obrázek 12 [45].

Pomocí tvorby nebo naopak rozpadu excimeru pyrenu byla studována výměna této hydrofobní látky mezi micelami neionogenního a ionogenního tenzidu. U neionogenního tenzidu dochází k výměně pomocí splnutí dvou micel, kdy vzniká „supermicela“, která se následně rozdělí zpět na dvě micely. Proces je charakterizován rychlostní konstantou druhého řádu a není závislý na charakteru rozpuštěné látky. U ionogenních tenzidů převládá mechanismus prvního řádu, bez přítomnosti soli jsou micely stabilní i několik dní. Mechanismus této výměny spočívá ve vytvoření submicely obsahující rozpuštěnou látku, která následně splyne s jinou micelou [50]. Schéma uvedených mechanismů je uvedeno na obrázku 13.



Obrázek 12: Umístění jodidových zhášeců v membráně[45]



Obrázek 13: Možnosti výměny rozpuštěné látky v micelárním prostředí. Nahoře přednostní mechanismus výměny u neionogenních tenzidů, dole přednostní mechanismus výměny u ionogenních tenzidů (Py = pyren)

4. MATERIÁLY A METODY

V této kapitole se seznámíme s přípravou zásobních roztoků a vlastnostmi použitých fluoroforů, s přístroji, na kterých byla měřena absorpční a fluorescenční spektra a s metodami, které se používají na vyhodnocení účinnosti přenosu energie, výpočet vzdáleností dvou fluoroforů a v neposlední řadě s metodami, kterými se vyhodnocuje zhášení fluorescence.

4.1 Použité chemikálie

Aceton p.a. (Lach-Ner spol. s r.o., $\geq 99,5 \%$)

Acylhex1 (CPN spol. s r.o.), hyaluronan modifikovaný hexylovými řetězci, stupeň substituce 10 %

Acylhex2 (CPN spol. s r.o.) hyaluronan modifikovaný hexylovými řetězci, stupeň substituce 40 %

Cetylpyridinium chlorid (Sigma Aldrich, $\geq 99,0 \%$, č. šarže 075K0200)

Disodná sůl fluoresceinu (Fluka, č. šarže 1407491)

Hyaluronan ($M_w = 106$ kDa, CPN spol. s r.o., č. šarže 190707-E1)

Hyaluronan ($M_w = 418$ kDa, CPN spol. s r.o., č. šarže 140807-8-D7)

Hyaluronan ($M_w = 1,36$ MDa, CPN spol. s r.o., č. šarže 050907-7)

Chloroform (Fluka, $\geq 99,8 \%$, pro UV-spektroskopii, č. šarže 1364637)

Methanol (Sigma Aldrich, $\geq 99,8\%$, pro UV-spektroskopii, č. šarže 1283468)

Perylen (Fluka, $\geq 99,0 \%$, pro fluorescenci, č. šarže 384079/1)

Pyren (Fluka, $\geq 99,0 \%$, pro fluorescenci, č. šarže 430166/1)

Tetradecyltrimethylamonium bromid (Fluka, $\geq 98,0 \%$, č. šarže 1377175)

4.1.1 Příprava zásobních roztoků fluoroforů

Zásobní roztok perylenu byl připraven v chloroformu a jeho koncentrace byla $1,19 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Zásobní roztok disodné soli fluoresceinu byl připraven v methanolu tak, aby jeho koncentrace byla $2,07 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Zásobní roztok pyrenu v acetonu byl připraven tak, aby jeho koncentrace byla $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.1.2 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB

Bylo odpařeno takové množství zásobního roztoku perylenu v chloroformu, aby jeho koncentrace po doplnění na 200 ml tenzidem TTAB o koncentraci 10 mmol dm^{-3} byla $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Tento roztok byl míchán přes noc. Do skleněných vialek byla odpařena různá množství zásobního roztoku fluoresceinu v metanolu tak, aby po doplnění na 5 ml roztokem perylenu v TTAB, vznikla koncentrační řada fluoresceinu v rozmezí 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Byly připraveny tři paralelní řady vzorků.

4.1.3 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB v přítomnosti nativního hyaluronanu

Byl připraven zásobní roztok peryleny v TTAB tak, že koncentrace peryleny byla $1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a koncentrace tenzidu byla $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Do skleněných vialek bylo pipetováno různé množství nativního hyaluronanu o $M_r = 418 \text{ kDa}$ tak, že po přidání 4 ml roztoku peryleny v TTAB byla vytvořená koncentrační řada hyaluronanu v rozmezí 0,0005–0,02 %, přičemž koncentrace peryleny a tenzidu zůstala konstantní. Tyto vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Do jiných skleněných vialek bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku fluoresceinu v metanolu tak, aby po odpaření rozpouštědla a připipetování 4 ml vytvořeného roztoku peryleny v TTAB a hyaluronanu, byla jeho koncentrace v rozmezí 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Pro vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na přenos energie bylo ke 40 ml zásobního roztoku peryleny v TTAB připipetováno takové množství hyaluronanu, aby jeho hmotnostní zlomek po doplnění na 50 ml byl 0,002 %. Takto byly připraveny tři roztoky s použitím hyaluronanu o M_r 106 kDa, 418 kDa a 1,36 MDa. Do skleněných vialek bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku fluoresceinu v metanolu, aby po odpaření rozpouštědla a připipetování 4 ml vytvořeného roztoku peryleny v TTAB a hyaluronanu, byla jeho koncentrace v rozmezí 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.1.4 Příprava vzorků pro přenos energie v TTAB v přítomnosti modifikovaného hyaluronanu

Modifikovaný hyaluronan Acylhex1 (ACHX1) a Acylhex2 (ACHX2) je vlastně hyaluronylester kyseliny hexanové, kdy kyselina hexanová tvoří ester s primárním hydroxylem N-acetylglukosaminové části hyaluronanu. Rozdíl mezi ACHX1 a ACHX2 je ve stupni substituce. V případě ACHX1 je stupeň substituce 10 %, kdežto v případě ACHX2 je 40 %.

Byl připraven zásobní roztok peryleny v TTAB tak, že koncentrace peryleny byla $1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a koncentrace tenzidu byla $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Do skleněných vialek bylo pipetováno různé množství modifikovaného hyaluronanu Acylhex1 a Acylhex2 tak, že po přidání 4 ml roztoku peryleny v TTAB byla vytvořená koncentrační řada hyaluronanu v rozmezí 0,0005–0,02 %, přičemž koncentrace peryleny a tenzidu zůstala konstantní. Tyto vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Do jiných skleněných vialek bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku fluoresceinu v metanolu tak, aby po odpaření rozpouštědla a připipetování 4 ml vytvořeného roztoku peryleny v TTAB a hyaluronanu, byla jeho koncentrace v rozmezí 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.1.5 Příprava vzorků pro určení CMC

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl ZR pyrenu v acetonu. Po odpaření rozpouštědla bylo připipetováno takové množství ZR TTAB, aby po doplnění na 5 ml byla jeho koncentrační řada v rozmezí 0,002–10 mmol dm^{-3} . Ke každé koncentrační řadě bylo připipetováno takové množství ZR nativního hyaluronanu, aby jeho koncentrace ve vzorku po doplnění na 5 ml byla 0,01 %; 0,002 % a 0,0005 %. K ostatním koncentračním řadám bylo připipetováno takové množství ZR modifikovaného hyaluronanu ACHX1 a ACHX2, aby jeho koncentrace ve vzorku po doplnění na 5 ml byla 0,02 %; 0,002 % a 0,0005 %.

4.1.6 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl zásobního roztoku pyrenu. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 ml 12,5 mmol dm^{-3} roztoku TTAB, potom byl připipetován cetylpyridinium chlorid (CPC) v rozsahu 0–100 μl , přičemž koncentrace zásobního roztoku CPC byla 1,68 10^{-3} mol dm^{-3} . Nakonec byly všechny vzorky doplněny MiliQ vodou na konečný objem 5 ml. Koncentrace TTAB ve vzorcích byla tedy 10 mmol dm^{-3} . Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Byly vytvořeny tři paralelní řady vzorků.

4.1.7 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB v přítomnosti nativního hyaluronanu

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl zásobního roztoku pyrenu. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 ml 12,5 mmol dm^{-3} roztoku TTAB, potom byl připipetován cetylpyridinium chlorid (CPC) v rozsahu 0–100 μl , přičemž koncentrace zásobního roztoku CPC byla 1,68 10^{-3} mol dm^{-3} . Následně byl připipetován roztok nativního hyaluronanu o $M_r = 418$ kDa tak, že koncentrace hyaluronanu ve vzorku po doplnění na 5 ml MiliQ vodou byla 0,01 %, 0,002 % a 0,0005 %. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Pro každou koncentraci hyaluronanu byly vytvořeny tři paralelní řady.

4.1.8 Příprava vzorků pro určení agregačního čísla TTAB v přítomnosti modifikovaného hyaluronanu

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl zásobního roztoku pyrenu. Po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 ml 12,5 mmol dm^{-3} roztoku TTAB, potom byl připipetován cetylpyridinium chlorid (CPC) v rozsahu 0–100 μl , přičemž koncentrace zásobního roztoku CPC byla 1,68 10^{-3} mol dm^{-3} . Následně bylo připipetováno takové množství derivátu ACHX1 a ACHX2, aby po doplnění MiliQ vodou na 5 ml byla jeho koncentrace ve vzorku 0,02 %, 0,002 % a 0,0005 %. Vzorky byly třepány na třepačce přes noc. Pro každou koncentraci hyaluronanu byly vytvořeny tři paralelní řady.

4.1.9 Příprava vzorků pro stanovení výměny rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami

Do dvou skleněných vialek bylo napipetováno 100 μl zásobního roztoku pyrenu, po odpaření rozpouštědla byly připipetovány 4 ml 12,5 mM roztoku TTAB. Vzorky byly třepány přes noc na třepačce. Druhý den byla první vialka doplněna vodou na objem 5 ml a do druhé vialky bylo připipetováno takové množství zásobního roztoku ACHX1, aby po doplnění na 5 ml byla jeho koncentrace ve vzorku 0,02 %.

Do jiných dvou skleněných vialek bylo napipetováno 200 μl zásobního roztoku CPC, poté byly připipetovány 4 ml 12,5 mM roztoku TTAB. Vzorky byly třepány přes noc na třepačce. Druhý den byla první vialka doplněna vodou na celkový objem 5 ml. Do druhé vialky bylo připipetováno takové množství zásobního roztoku ACHX1, aby po doplnění na 5 ml byla jeho koncentrace ve vzorku 0,02 %.

Do páté skleněné vialky bylo odpařeno 50 μ l zásobního roztoku pyrenu, po odpaření rozpouštědla bylo připipetováno 5 ml 10 mM roztoku TTAB. Takto byl připraven referenční vzorek

Všechny vzorky byly vloženy na noc do ledničky. První a třetí, a druhý a čtvrtý vzorek byl smíchán těsně před měřením.

4.2 Měření absorpčních a fluorescenčních spekter

Absorpční spektra byla měřena na UV-VIS spektrometru Varian typ Cary 50 Probe v rozsahu 200–800 nm s krokem 1 nm rychlostí 600 nm/min. K měření fluorescenčních spekter byl použit luminiscenční spektrometr Aminco-Bowman Series 2 s xenonovou (150 W) a zábleskovou (7 W) lampou. Měřicí rozsah je 220–850 nm, rychlost skenu je 3–6000 nm/min, přesnost měření je $\pm 0,5$ nm. Měření byla prováděna při teplotě 20 °C, není-li řečeno jinak.

Excitační vlnová délka perylenu byla 411 nm, intenzita fluorescence perylenu byla odečítána při 450 nm a to z důvodu zavedení korekcí spekter. Perylen při 450 nm ještě dostatečně fluoreskuje a zároveň jeho absorbance při této vlnové délce je minimální, dochází tedy k co nejmenšímu zkreslení výsledků vlivem reabsorpce perylenu. Emisní spektrum perylenu s fluoresceinem bylo pořizováno v rozsahu 420–600 nm.

Excitační vlnová délka pyrenu byla 335 nm, emisní spektrum bylo pořizováno v rozsahu 360–520 nm. K výpočtům agregačního čísla TTAB byl použit totální integrál emisního spektra v daném rozsahu. Při stanovování výměny rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami byla jednotlivá spektra pořizována v teplotním rozsahu 5–50 °C.

4.3 Vyhodnocení

4.3.1 Korekce intenzity fluorescence

Při měření přenosu energie je požadováno, aby akceptor neabsorboval při excitační vlnové délce donoru. Pokud tomu tak není, je nutné zavést různé korekce na hodnoty naměřené intenzity fluorescence donoru. Čím víc akceptor při této vlnové délce absorbuje, tím rychleji klesá intenzita fluorescence donoru a výsledky jsou značně zkreslené.

Další korekce je nutné zavést, abychom potlačili efekt reabsorpce emitujícího záření akceptorem. Záření, které dopadne na detektor je tedy nižší a efekt reabsorpce se projeví nižšími hodnotami intenzity fluorescence.

$$F_{\text{kor}} = F_{\text{poz}} \cdot 10^{0,5 \cdot (OD_{\lambda_{\text{ex}}} + OD_{\lambda_{\text{em}}})} \quad (28)$$

kde F_{kor} značí korigovanou intenzitu fluorescence, F_{poz} je intenzita fluorescence, kterou naměříme na přístroji a $OD_{\lambda_{\text{ex}}}$ a $OD_{\lambda_{\text{em}}}$ jsou optické hustoty vzorku při excitační a emisní vlnové délce v tomto pořadí.

Korigovaná intenzita fluorescence je tedy zvýšená a velikost zvýšení je daná optickými hustotami při excitační a emisní vlnové délce. Hodnota 0,5 v exponentu vyplývá z geometrie měření fluorescence, kdy je světelný paprsek fokusován doprostřed kyvety a vyzářené světlo vychází ze středu kyvety.

4.3.2. Vyhodnocení účinnosti přenosu energie

Nejdříve je nutné vypočítat překryvový integrál donoru a akceptoru v daném prostředí. Jeho hodnotu je možné spočítat dle Simpsonova pravidla [25] tak, že po změření emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru ve stejném rozsahu vlnových délek se získané hodnoty dosadí do vztahu:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda} \quad (29)$$

kde I_D je intenzita fluorescence donoru, ε_A je molární extinkční koeficient akceptoru a λ je vlnová délka.

Dosažením vypočtené hodnoty do vztahu 4 či 5 vypočteme Försterův kritický poloměr R_0 . Pokud bude vzdálenost obou fluoroforů rovna hodnotě Försterova kritického poloměru, účinnost přenosu energie bude 50 %.

Účinnost přenosu energie je možné získat analýzou úbytku fluorescence donoru dle vztahu 7. Naměřené intenzity fluorescence je nutné korigovat viz kapitola 4.3.1. Z naměřené závislosti účinnosti přenosu energie na koncentraci akceptoru získáme maximální hodnotu účinnosti přenosu energie, z níž je možné spočítat vzdálenost dvou fluoroforů podle vztahu 6.

4.3.3 Stanovení agregačního čísla

Metoda stanovení průměrného agregačního čísla je založena na zhášení fluorescence. Poissonovo rozdělení popisuje distribuci fluoroforu a zhášedce v micelárním prostředí. Fluorofor emituje záření pouze tehdy, když okupuje prázdnou micelu, tedy bez zhášedce. Naměřený poměr intenzit fluorescence v přítomnosti zhášedce a bez vyjadřuje rovnice:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{[Q]}{[M]}} \quad (29)$$

kde $[Q]$ je koncentrace zhášedce a $[M]$ je koncentrace micel, která se spočítá ze známé koncentrace tenzidu a jeho hodnoty CMC. Vztah 29 přechází v:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \frac{N_{ag}}{[S] - CMC} \cdot [Q] \quad (30)$$

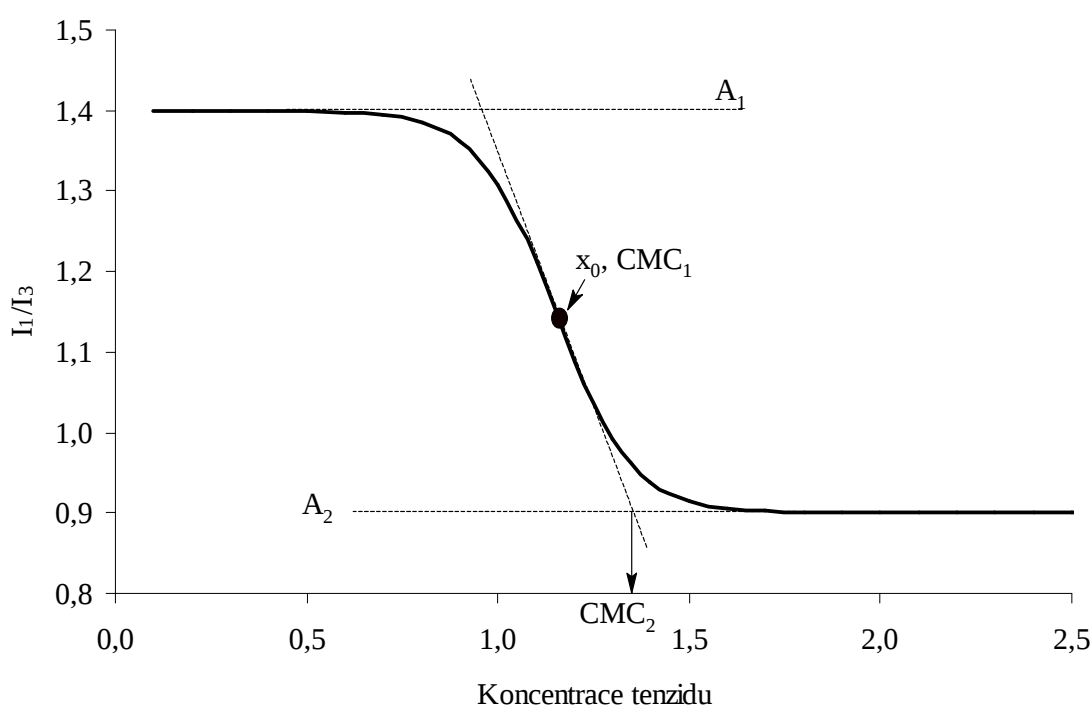
kde N_{ag} je stanovované agregační číslo a $[S]$ je koncentrace tenzidu. Naměřená závislost poměru intenzit fluorescence bez a v přítomnosti zhášedce na jeho koncentraci je tedy lineární a směrnice této přímky je přímo úměrná agregačnímu číslu.

4.3.4 Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace tenzidu se dá stanovit například pomocí pyrenu. Poměr intenzit fluorescence prvního (373 nm) a třetího (383 nm) maxima je velice citlivý parametr na polaritu okolí. Vynesením závislosti poměru 1 : 3 na koncentraci tenzidu získáme Boltzmannovu křivku, ze které je možné stanovit CMC (viz obrázek 13). Tuto křivku popisuje rovnice:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/\Delta x}} + A_2 \quad (31)$$

kde A_1 a A_2 je maximální a minimální dosažená hodnota, x je koncentrace tenzidu, Δx je gradient a x_0 je inflexní bod.



Obrázek 14: Charakteristické parametry klesající Boltzmannovy křivky sloužící ke stanovení CMC

Když proložíme naměřenou závislost sigmoidní Boltzmannovou křivkou v programu Origin, výstupem získáme všechny hodnoty potřebné pro výpočet CMC. Aguiar a kol. ve své práci naznačil způsob, jakým lze určit výslednou hodnotu kritické micelární koncentrace. Zda použít hodnotu inflexního bodu (CMC_1 na obr. 13) nebo hodnotu druhého zlomu (CMC_2 na obr. 14). Toto rozhodne poměr $\frac{x_0}{\Delta x}$. Pokud je jeho hodnota nižší než 10, je použita hodnota inflexního bodu, pokud je tento poměr větší než 10, je použita hodnota druhého zlomu, tedy CMC_2 [51].

4.3.5 Stanovení výměny rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami

Z výsledků experimentů, které sloužily k určení agregačního čísla systému bylo možné zjistit, jaký je poměr fluoroforu (pyrenu) a zhášedce (CPC), aby při měření intenzity fluorescence pyrenu bylo znatelné, že je pyren zhášen. Tento poměr je uveden v kapitole 4.1.8. Protože se mění intenzita fluorescence s teplotou, bylo nutné napřed změřit referenční vzorek, tedy jak klesá intenzita fluorescence pyrenu v daném systému bez přítomnosti zhášedce. Porovnáním poklesu intenzity fluorescence smíchaných vzorků (jeden vzorek obsahuje micely se solubilizovaným pyrenem a druhý vzorek obsahuje micely s CPC) s referenčním vzorkem získáme informace, zda vlivem teploty dochází k výměně pyrenu mezi micelami.

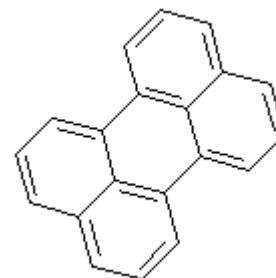
4.3.6 Stanovení chyby měření

Vzorky byly připraveny ve třech kopiích, přičemž výsledné hodnoty vynesené v grafech jsou průměrné hodnoty měření těchto paralelních vzorků. Grafy byly zpracovány v programu MS Excel a chybové úsečky, které jsou znázorněny v některých grafech byly vytvořeny pomocí funkce SMODCH, tedy jedná se o směrodatné odchylky, které byly dané rozdílem naměřených hodnot výše zmíněných paralelních vzorků.

4.4 Vlastnosti použitých fluoroforů

4.4.1 Perylen

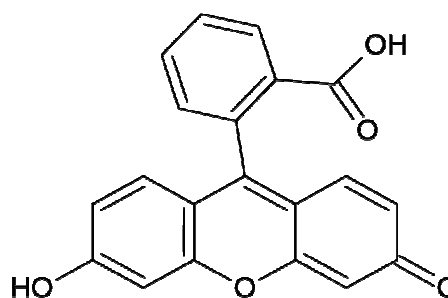
Perylen je hydrofobní fluorofor (viz. obr. 15), který je v současné době hodně studován v biologických, medicínských a chemických systémech, a to především díky jeho schopnosti solubilizovat se uvnitř micely [25, 52]. Díky vysokému kvantovému výtěžku a velkému spektrálnímu překryvu absorpčního spektra s emisním spektrem pyrenu, byla tyto dvojice sond použita pro zkoumání rezonančního přenosu energie při navázání na vlákna DNA [53]. Díky účinnému přenosu energie mezi perylenem a riboflavinem lze perylen použít k detekci vitamínu B₂ v lékových tabletách. Tato metoda je jednoduchá, citlivá a rychlá [29].



Obrázek 15: Perylen

4.4.3 Fluorescein

Je to fluorofor, který se nejčastěji využívá v mikroskopii jako značkovací. Jeho absorpční maximum ve vodě je 494 nm a emisní maximum 521 nm. Při 460 nm se objevuje tzv. izosbestický bod. Fluorescence této molekuly je velice vysoká a má velmi krátkou dobu života (kolem 3–4 ns). Jeho strukturu můžeme vidět na obrázku 16. Ve vodném roztoku existuje v několika formách v závislosti na pH. Jedná se o kation (abs. maximum 437 nm), neutrální molekulu, monoanion a dianion (abs. maximum 490 nm).



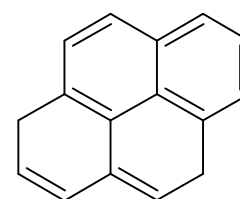
Obrázek 16: Fluorescein

4.4.4 Pyren

Pyren je jedna z nejpoužívanějších fluorescenčních sond. Fluorescenční spektrum pyrenu ve vodě vykazuje pět hlavních píků. Poměr prvního (monomer) a třetího píku je citlivý parametr, kterým charakterizuje polaritu okolního prostředí [51, 54]. Změny v jeho spektrálním chování (poměr 1 : 3) jako funkce koncentrace tenzidu se využívá ke stanovení CMC a jiných micelárních charakteristik.

Jeho charakteristická tvorba excimeru při vyšších koncentracích pyrenu v systému se využívá k určení mikroviskozity jeho okolí. Tvorba excimeru je řízena difúzním koeficientem, který je nepřímo úměrný viskozitě prostředí.

Pyren se také používá k určení agregačního čísla tenzidů, které se získá zhášením jeho fluorescence. Jako vhodný zhášec je používán například TPC [55] nebo CPC [56].

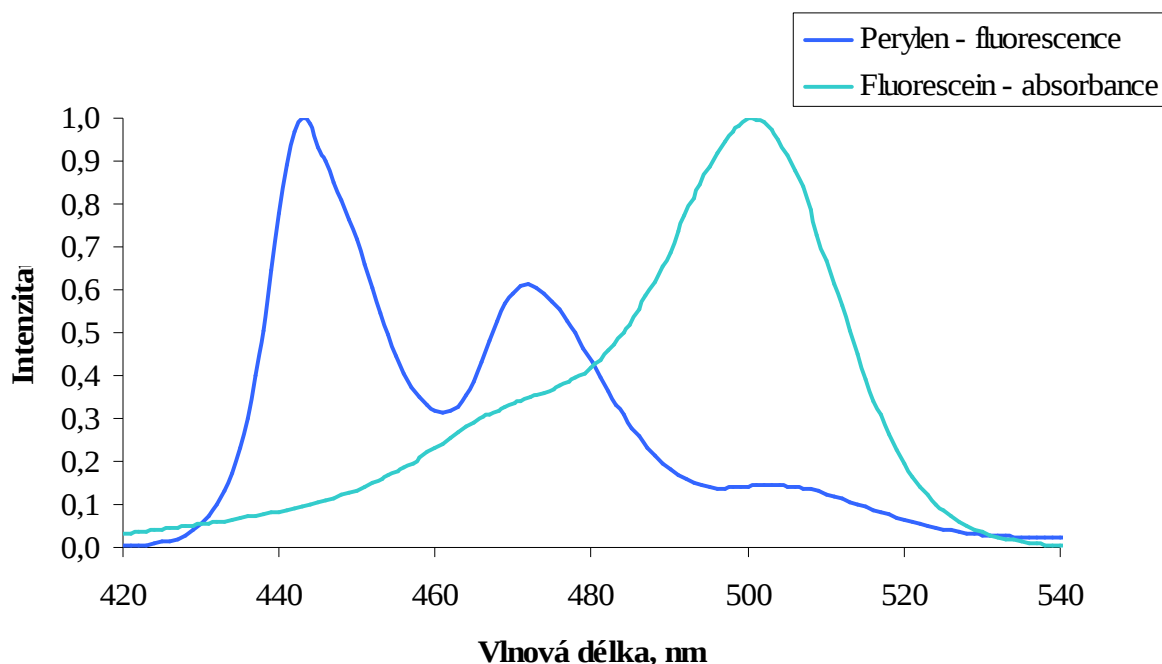


Obrázek 17: Pyren

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Přenos energie mezi perylenem a fluoresceinem v TTAB

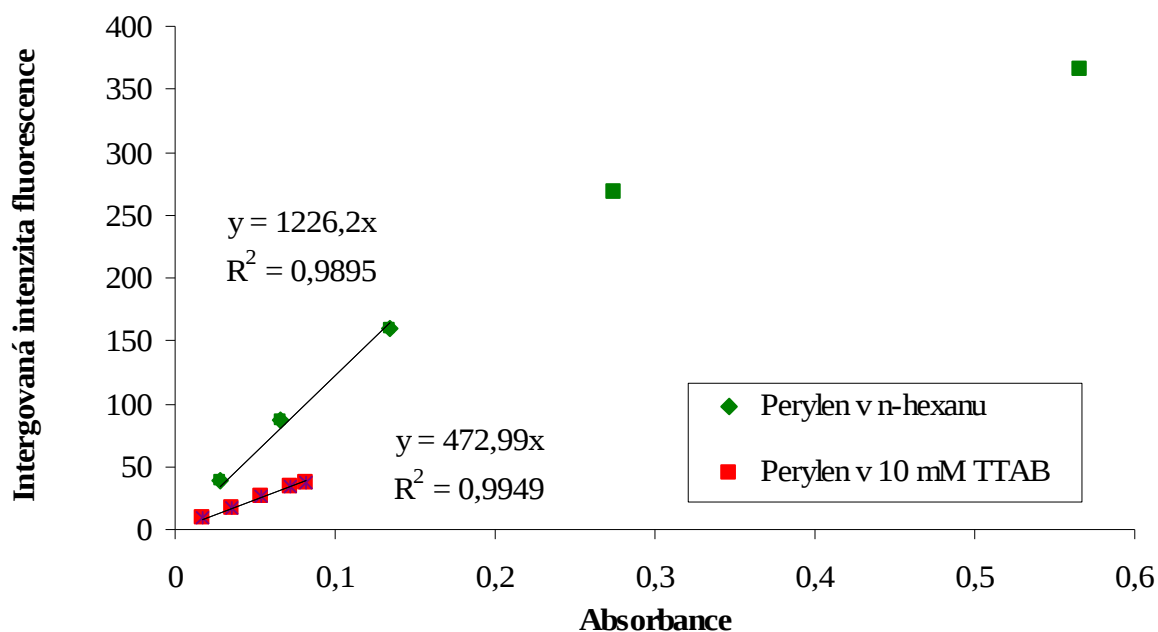
Pokud se emisní spektrum donoru (perylene) překrývá s absorpčním spektrem akceptoru (fluorescein), může excitace donoru způsobit nezářivý přenos energie k akceptoru., který se následně projeví úbytkem fluorescence donoru. Na obrázku 18 je znázorněn překryv těchto spekter.



Obrázek.18: Normalizovaná fluorescence perylenu a absorbance fluoresceinu

Výsledný překryvový integrál, který byl vypočten podle Simpsonova pravidla [25], má hodnotu $1,2 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$. Výpočet překryvového integrálu naznačuje vztah 29. Försterův kritický poloměr je přímo úměrný hodnotě překryvového integrálu, viz vztah 5. Pro tento systém je jeho hodnota 43,9 Å.

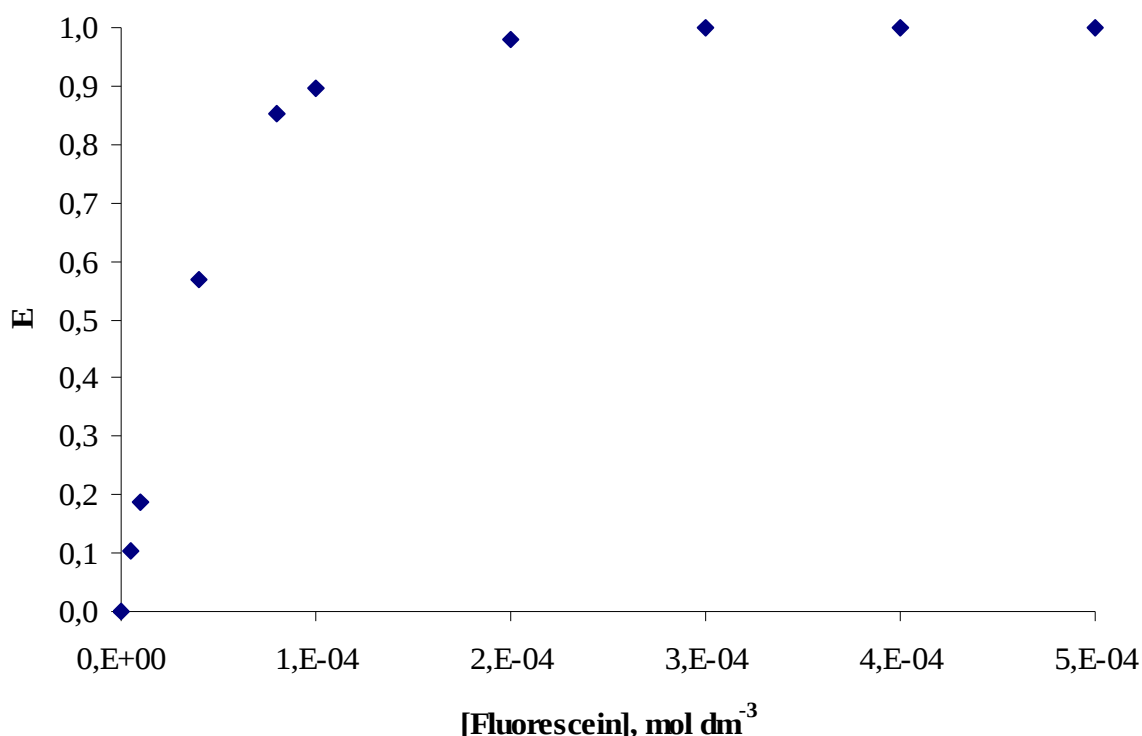
Pro výpočet Försterova kritického poloměru je mimo jiné potřeba znát hodnotu kvantového výtěžku donoru, v našem případě perylenu. Jeho hodnota se dá vypočítat buď pomocí standardu (viz. kapitola 2.4.11) nebo pomocí známé hodnoty v jiném rozpouštědle. Perylen má definovaný kvantový výtěžek v n-hexanu, jehož hodnota je 0,98. Pomocí vztahu 2 byla získána hodnota kvantového výtěžku perylenu v TTAB. Hodnota směrnice přímkových částí závislostí $F_{\text{int}} = f(A)$ pro perylen v n-hexanu a v TTAB je znázorněna v grafu na obrázku 19. Výsledná hodnota kvantového výtěžku perylenu v TTAB je 0,38. Tato hodnota byla použita pro výpočet Försterova kritického poloměru.



Obrázek 19: Závislost integrované intenzity fluorescence peryleny na jeho absorbanci v *n*-hexanu a v 10 mM TTAB

Účinnost přenosu energie je závislá na vzdálenosti donoru a akceptoru, konkrétně na její šesté mocnině. Zároveň však můžeme účinnost přenosu energie vyjádřit ze změřeného úbytku fluorescence donoru viz vztah 10. V micelárním systému byl použit hydrofobní donor (perylene), který se přednostně solubilizuje uvnitř micelárního jádra a hydrofilní akceptor (fluorescein), který zůstává ve vodném prostředí. V našem případě byla použita taková koncentrace peryleny, že ne každá micela, která v roztoku vznikla, obsahovala perylen. Tím, že se zvyšovala koncentrace přidaného fluoresceinu, byla zvyšována pravděpodobnost, že micely TTAB, které obsahují perylen budou elektrostaticky interagovat s alespoň jednou molekulou fluoresceinu a tím dojde k přenosu energie. Cílem bylo nalézt takovou koncentraci fluoresceinu, kdy všechny micely obsahující perylen interagovaly s fluoresceinem a tím by byla účinnost přenosu energie maximální, kterou lze v tomto systému dosáhnout. V tom případě by byla účinnost přenosu energie v závislosti na koncentraci fluoresceinu konstantní.

Při měření úbytku intenzity fluorescence bylo nutné zavést korekce, protože koabsorpce fluoresceinu (při jeho vyšších koncentracích) při excitační vlnové délce peryleny a následná reabsorpce emitovaného záření fluoresceinem značně zkreslily výsledky. Takové zkreslené měření můžeme vidět na obrázku 20.



Obrázek 20: Závislost účinnosti přenosu energie na koncentraci fluoresceinu získaná z nekorigovaných dat

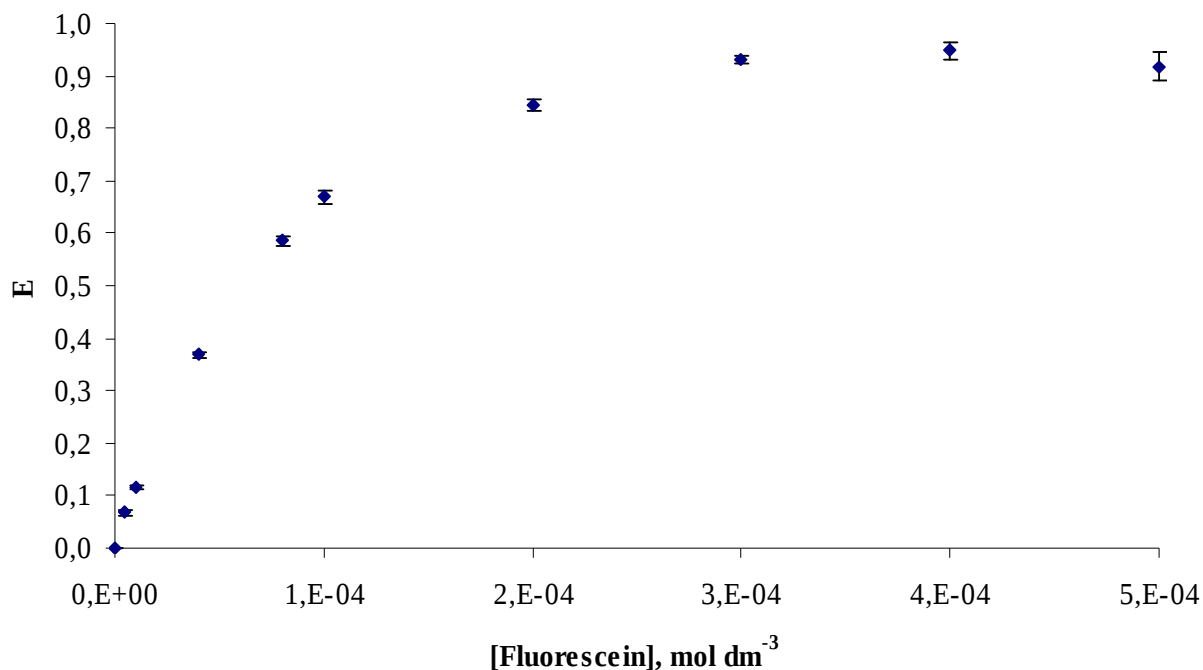
Z grafu je patrné, že účinnost přenosu má od koncentrace fluoresceinu $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ hodnotu 1. To by z definice závislosti účinnosti přenosu energie na vzdálenosti donoru a akceptoru znamenalo, že oba fluorofory jsou v těsném kontaktu. Toto je ale vyloučeno z důvodu umístění obou fluoroforů v roztoku.

V článcích, které se zabývají přenosem energie v micelárním prostředí, autoři zmíněné korekce buď nezaváděli, nebo se zmínili o efektu koabsorpce donoru a akceptoru, ale dále to nijak nerozváděli. Korekce (viz kapitola 4.3.1), kterou navrhuje Lakowicz [19], byla pro náš systém vyhovující. Jak tyto korekce ovlivnily výsledná data, je možné vidět na obrázku 21.

Autoři článků také většinou uvedli účinnost přenosu při maximální koncentraci akceptoru, kterou si sami zvolili, aniž by se zmínili, jak se systém chová při vyšších koncentracích. V micelárním systému je problém, že fluorofory nejsou pevně navázány a účinnost přenosu energie je tedy závislá na tom, jestli se donor a akceptor v systému potkají, nikoli na vzdálenosti, protože v našem případě, kdy máme hydrofobní donor a hydrofilní záporně nabitý akceptor v roztoku kationaktivního tenzidu, je v micelárním systému vzdálenost konstantní (to je způsobeno tím, že hydrofobní donor se zabuduje dovnitř micely a akceptor se díky elektrostatickým interakcím bude nacházet v hydrofilní části micely, tedy nebude se volně pohybovat v roztoku a vzdálenost obou fluoroforů tedy lze brát jako konstantní). Zvyšováním koncentrace akceptoru tedy zvyšujeme pravděpodobnost, že se donor i akceptor v systému potkají a přenos energie proběhne. Při nižších koncentracích akceptoru je pravděpodobnost nižší a přenos energie proběhne jen u zlomku párů donor-akceptor. Účinnost přenosu energie tedy není maximální, kterou lze v systému dosáhnout a nelze tedy s její

pomocí počítat vzdálenost donoru a akceptoru. Maximální účinnosti přenosu lze dosáhnout v případě, že další přídavek akceptoru na přenos energie již nebude mít vliv.

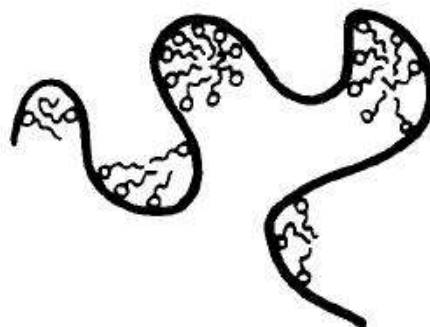
Měřením byla získána maximální účinnost, kterou lze v tomto systému dosáhnout. Její hodnota je $0,95 \pm 0,02$, což určuje, že vzdálenost obou fluoroforů je $27,0 \pm 2 \text{ Å}$. V literatuře je uvedeno, že hydrodynamický poloměr micely TTAB je $27 \pm 1,4 \text{ Å}$ [56], Gorski a Kalus ve své práci uvedli, že výsledkem jejich měření poloměru micely pomocí SANS je hodnota poloměru $25,5 \pm 0,1 \text{ Å}$ [57], což naznačuje, že námi vypočítaná hodnota je reálná vzhledem k umístění obou fluoroforů v systému.



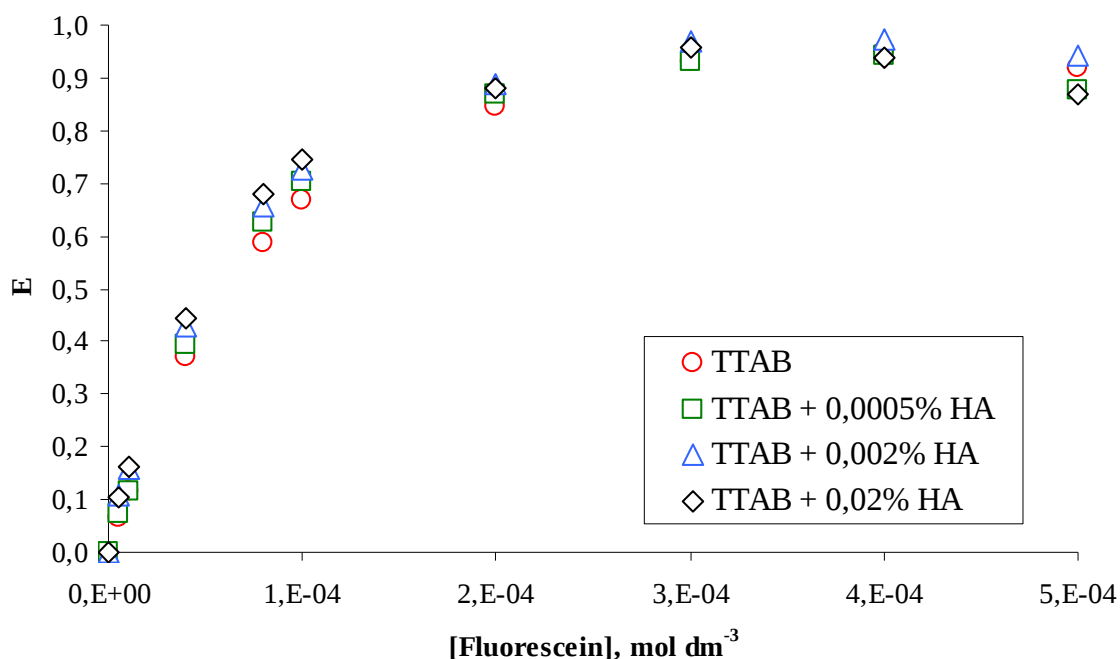
Obrázek 21 : Závislost účinnosti přenosu energie na koncentraci fluoresceinu získaná z korigovaných dat (průměr ze třech měření)

5.1.1 Vliv přidavku HA na účinnost přenosu energie v TTAB

Ve vodném roztoku je předpoklad, že kladně nabitý povrch micel TTAB bude přitahovat záporně nabitý řetězec hyaluronanu. V našem případě byl použit hyaluronan s molární hmotností 418 kDa. Porovnáním účinnosti přenosu energie v samotném TTAB a třech různých koncentracích hyaluronanu bylo zjištěno, že při nižších koncentracích fluoresceinu hyaluronan podporuje přenos energie (viz obrázek 23). Velikost chybových úseček daných směrodatnou odchylkou nepřekročí velikost bodů znázorněných v grafu. To naznačuje, že hyaluronan interaguje s micelami zřejmě tak, že řetězec hyaluronanu částečně obalí micelu TTAB, jak je zobrazeno na obrázku 22. Hyaluronan tak zamezí fluoresceinu s onou micelou interagovat a tím se sníží počet micel, se kterými může fluorescein interagovat. Dojde tedy ke zvýšení účinnosti přenosu energie při nižších koncentracích fluoresceinu. Při koncentraci fluoresceinu $c = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ dojde k navýšení účinnosti přenosu na maximální možnou hodnotu v tomto systému. V případě samotného TTAB dochází k maximální účinnosti přenosu až při koncentraci fluoresceinu $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Hodnota maximální účinnosti spadá do rozmezí chyby měření přenosu energie v TTAB bez přítomnosti hyaluronanu, tedy nedochází ke změnám ve vzdálenostech fluoroforů vlivem přidavku nativního hyaluronanu.



Obrázek 22: Interakce polymeru s micelárním systémem [58]

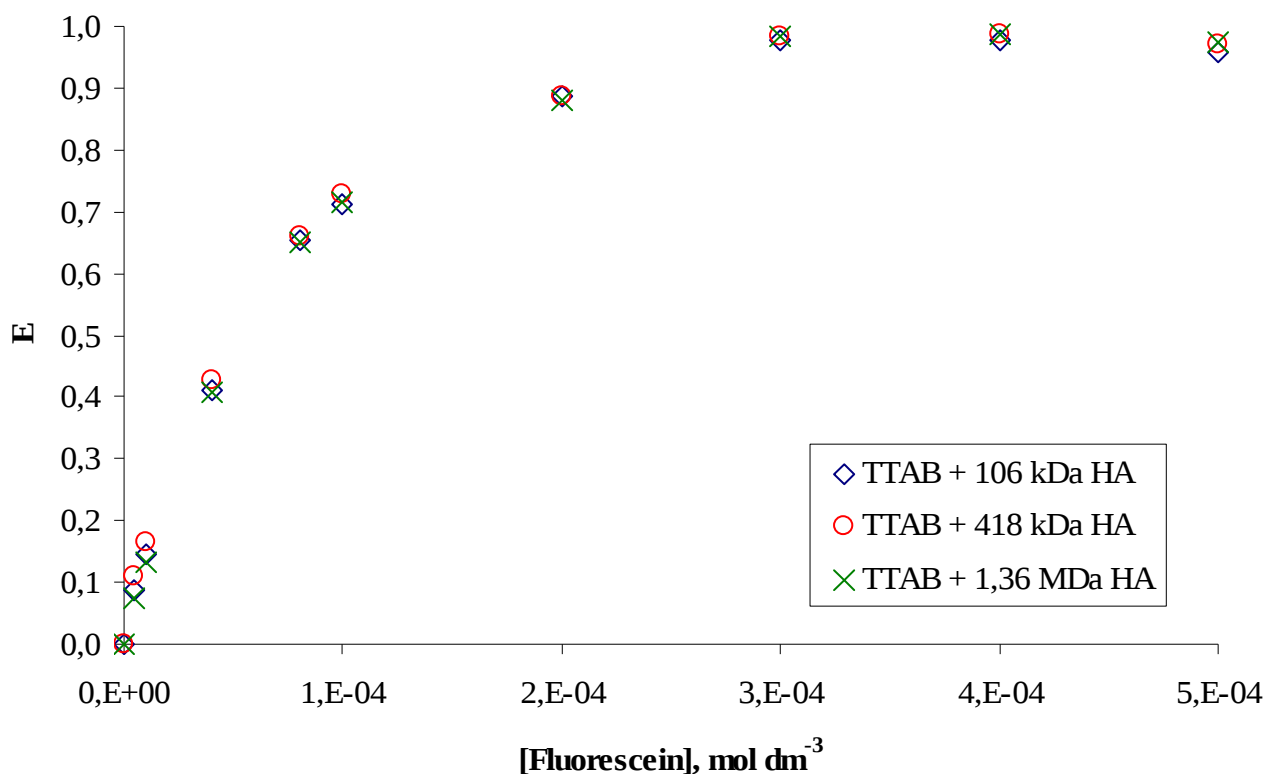


Obrázek 23: Vliv koncentrace hyaluronanu na účinnost přenosu energie ($M_{r_{HA}} = 418 \text{ kDa}$)

5.1.2 Vliv molární hmotnosti hyaluronanu na účinnost přenosu energie v TTAB

Byl studován vliv molární hmotnosti nativního hyaluronanu na přenos energie v TTAB. Do roztoku byl připipetován hyaluronan o různých molekulových hmotnostech (106 kDa, 418 kDa a 1,36 MDa), ale zároveň všechny vzorky obsahovaly stejnou hmotnostní koncentraci hyaluronanu, tedy 0,002 %.

Na obrázku 24 je znázorněn vliv jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu. Z grafu je patrné, že různá molární hmotnost nevyvolala významný efekt. Stanovené hodnoty účinnosti přenosu energie jsou téměř totožné a vejdou se do rozmezí, které je určené směrodatnou odchylkou. Ani v tomto případě velikost chybových úseček nepřekročí velikost bodů znázorněných v grafu.

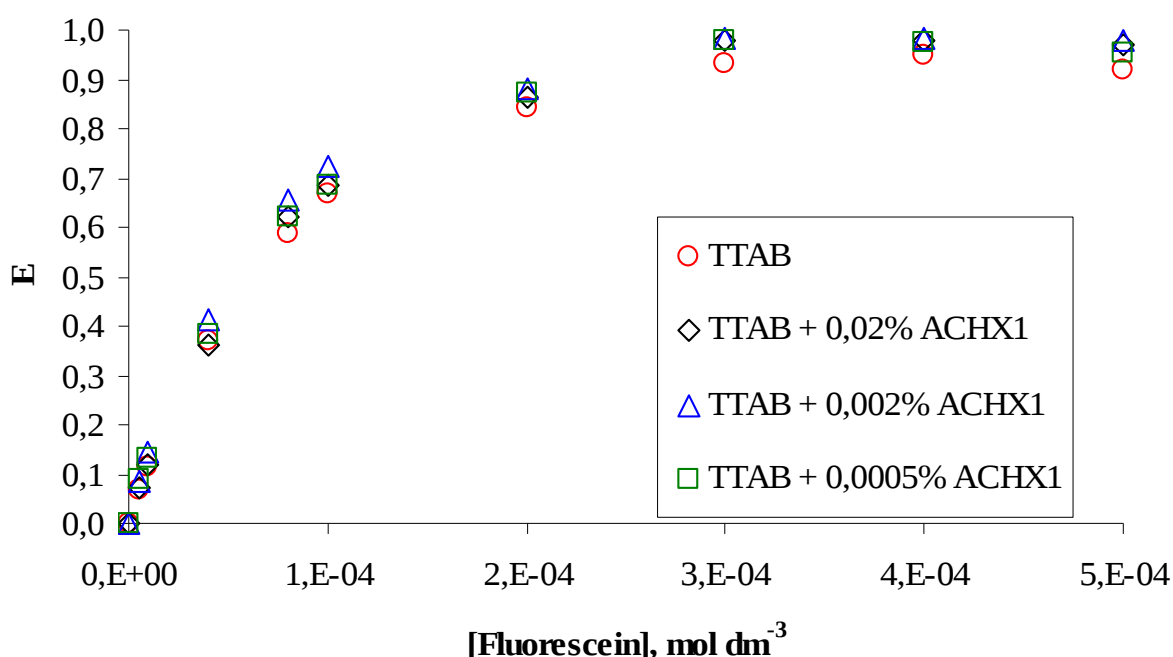


Obrázek 24: Vliv přídavku 0,002% hyaluronanu o různých M_r na přenos energie

5.1.3 Vliv přidavku derivátu hyaluronanu ACHX1 na účinnost přenosu energie v TTAB

Průběh závislosti účinnosti přenosu energie na koncentraci fluoresceinu byl také sledován v přítomnosti modifikovaného hyaluronanu. Jak již bylo psáno výše, derivát ACHX1 je modifikován hexylovým řetězcem na primární alkoholové skupině N-acetylglukosaminové části monomeru. Stupeň substituce je 10 %, tedy 10 % všech monomerů v roztoku obsahuje hexylový řetězec. Díky tomu by mohly micely na řetězci hyaluronanu zkondenzovat tak, že hexylový řetězec by působil jako kosurfaktant v micelle.

Jak je vidět z grafu na obrázku 25, při nižších koncentracích fluoresceinu nedochází k významné podpoře přenosu energie, jako tomu bylo v případě přidavku nativního hyaluronanu, ačkoli k dosažení maximální účinnosti přenosu stačí nižší koncentrace fluoresceinu než v samotném TTAB, podobně jako v přítomnosti nativního hyaluronanu. Graf zároveň naznačuje vyšší hodnotu celkové dosažené účinnosti přenosu v tomto systému, což ukazuje na zmenšení velikosti micel, popřípadě může docházet k deformaci tvaru micel tak, že dojde k přiblížení perylenu a fluoresceinu. Maximální dosažená hodnota účinnosti je $0,98 \pm 0,01$, což určuje, že vzdálenost dvou sond je v tomto systému 22 ± 1 Å, což je o 5 Å méně, než v případě samotného TTAB. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku hodnot získanou ze třech měření nepřesahují velikost bodů znázorněných v grafu.

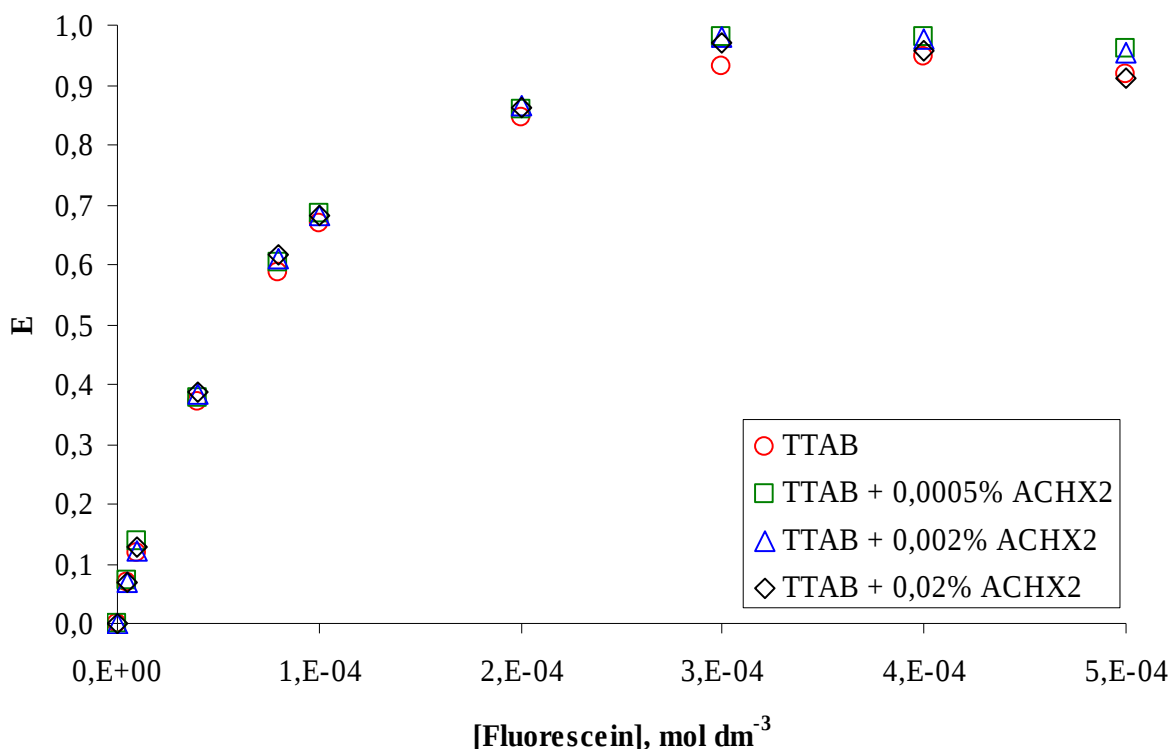


Obrázek 25: Vliv koncentrace ACHX1 na účinnost přenosu energie v TTAB (průměr ze třech měření)

5.1.4 Vliv přidavku derivátu hyaluronanu ACHX2 na účinnost přenosu energie v TTAB

Derivát ACHX2 se od derivátu ACXH1 liší stupněm substituce, tedy počtem hexylových řetězců na monomer. Ještě se nepředpokládá, že by derivát ve vodném prostředí agregoval, ale v micelárním systému může ovlivnit jeho vlastnosti.

Jak je vidět z grafu na obrázku 26, při nižších koncentracích fluoresceinu nedochází k významné podpoře přenosu energie, stejně jako tomu bylo v případě přidavku ACHX1. Jak ale můžeme vidět, dochází také k navýšení maximální účinnosti přenosu energie, tedy ke zmenšení vzdálenosti obou fluoroforů. Maximální dosažená účinnost přenosu má hodnotu $0,975 \pm 0,015$, což znamená, že vzdálenost fluoroforů je $24,5 \pm 1,5$ Å. Opět tedy dochází ke zmenšení velikosti micel oproti samotnému TTAB, kdy vzdálenost perylenu a fluoresceinu byla $27,0 \pm 2$ Å. I v tomto případě chybové úsečky nepřesahují velikost bodů vyznačených v grafu.

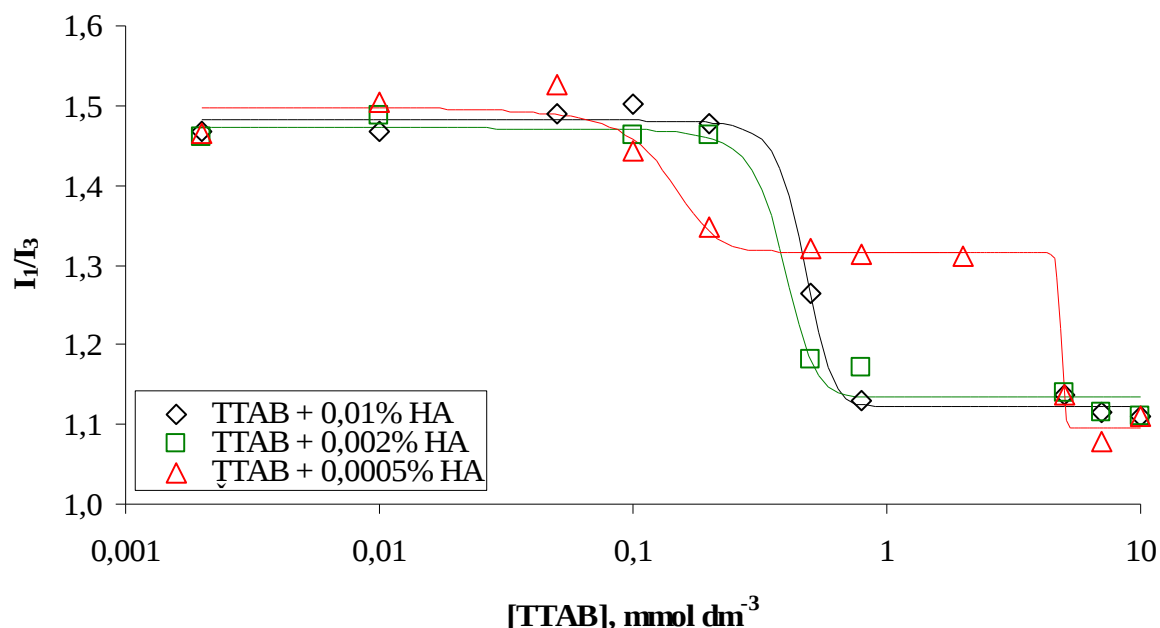


Obrázek 26: Vliv koncentrace ACHX1 na účinnost přenosu energie v TTAB (průměr ze třech měření)

5.2 Stanovení kritické micelární koncentrace TTAB v přítomnosti nativního a modifikovaného hyaluronanu

Stanovení kritické micelární koncentrace v námi použitých systémech je nezbytné pro stanovení agregačního čísla těchto systémů. Přídavek opačně nabitého hyaluronanu může způsobit značné změny v hodnotách CMC.

Výpočet kritické micelární koncentrace pomocí pyrenu je popsán v kapitole 4.3.4. Již porovnáním tvaru Boltzmannovy křivky lze určit, zda přídavek hyaluronanu má nějaký vliv na kritickou micelární koncentraci TTAB. Například z grafu na obrázku 27 lze vyčíst, že při vyšších koncentracích hyaluronanu je hodnota CMC nižší než 1 mmol dm^{-3} , což je nižší, než hodnota CMC samotného TTAB ve vodě ($\text{CMC}_{\text{TTAB}} = 3,2 \pm 0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$). Zřejmě dochází k interakcím s hyaluronanem tak, že již při nízkých koncentracích TTAB kondenzují micely na řetězci hyaluronanu a vznikají tedy agregáty TTAB-hyaluronan. V případě nejmenšího přídavku hyaluronanu křivka vykazuje dva zlomy. První zlom by naznačoval tvorbu již zmíněných agregátů, přičemž při vyšších koncentracích TTAB je zřejmě množství tenzidu tak velké, že dochází k tvorbě micel ve volném roztoku a na křivce tedy dochází k druhému zlomu. Hodnota koncentrace, při které nastává druhý zlom se blíží hodnotě kritické micelární koncentrace TTAB bez přítomnosti hyaluronanu. Vypočtené hodnoty CMC ve všech zkoumaných systémech jsou shrnuty v tabulce 2.



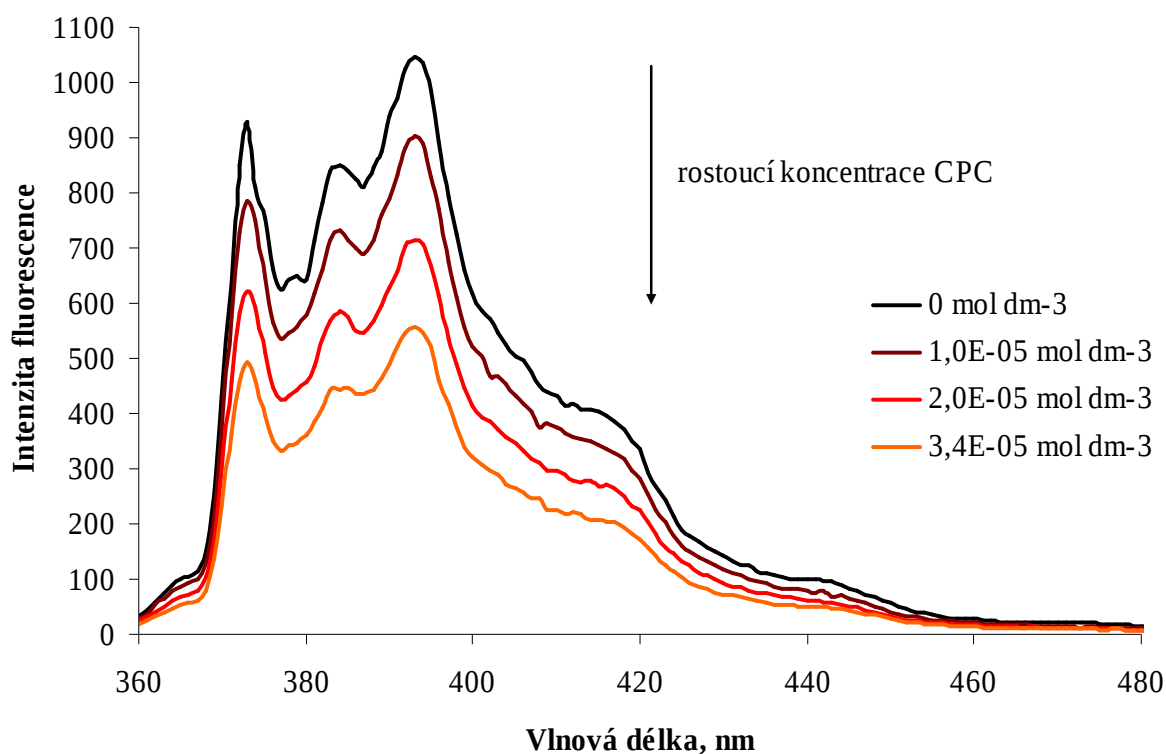
Obrázek 27: Vliv přídavku nativního hyaluronanu na kritickou micelární koncentraci TTAB

Tabulka 2: Hodnoty kritické micelární koncentrace TTAB v přítomnosti různých koncentrací nativního či modifikovaného hyaluronanu udané v mmol dm^{-3}

Systém	Hmotnostní koncentrace hyaluronanu ve vzorku				
	0,01 %	0,02 %	0,002 %	0,0005 %	0,0005 %
				1. zlom	2. zlom
TTAB + HA (418 kDa)	0,474	–	0,393	0,139	5,053
TTAB + ACHX1	–	0,495	0,335	–	2,972
TTAB + ACHX2	–	0,083	0,056	0,014	2,415

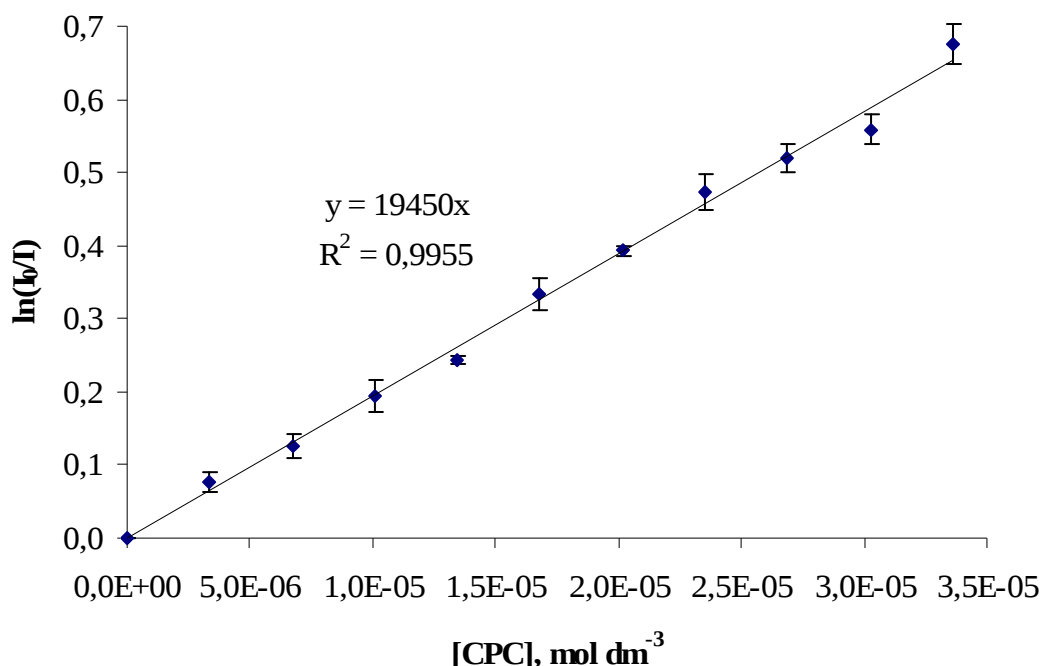
5.3 Stanovení agregačního čísla TTAB ve vodném roztoku

Agregační číslo tenzidu lze určit například pomocí zhášení. V našem případě byl zhášen pyren pomocí CPC. Se zvyšující se koncentrací CPC dochází k poklesu intenzity fluorescence pyrenu, jak je vidět na obrázku 27. Přirozený logaritmus podílu intenzity fluorescence pyrenu bez přítomnosti zhášedce ku intenzitě fluorescence v jeho přítomnosti je lineární závislost (viz obr. 28) a hodnota směrnice přímky je přímo úměrná agregačnímu číslu viz vztah 30.



Obrázek 27: Pokles intenzity fluorescence pyrenu po přidání různého množství CPC

Námi stanovená průměrná hodnota agregačního čísla 10mM TTAB při 20 °C je 133 ± 1 . Chyba měření je opět dána směrodatnou odchylkou měření třech paralelních řad a v grafu na obrázku 28 je znázorněna chybovými úsečkami. Gorski a Kalus stanovili při stejné teplotě hodnotu 126 ± 2 , přičemž koncentrace TTAB byla $105,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ [57].



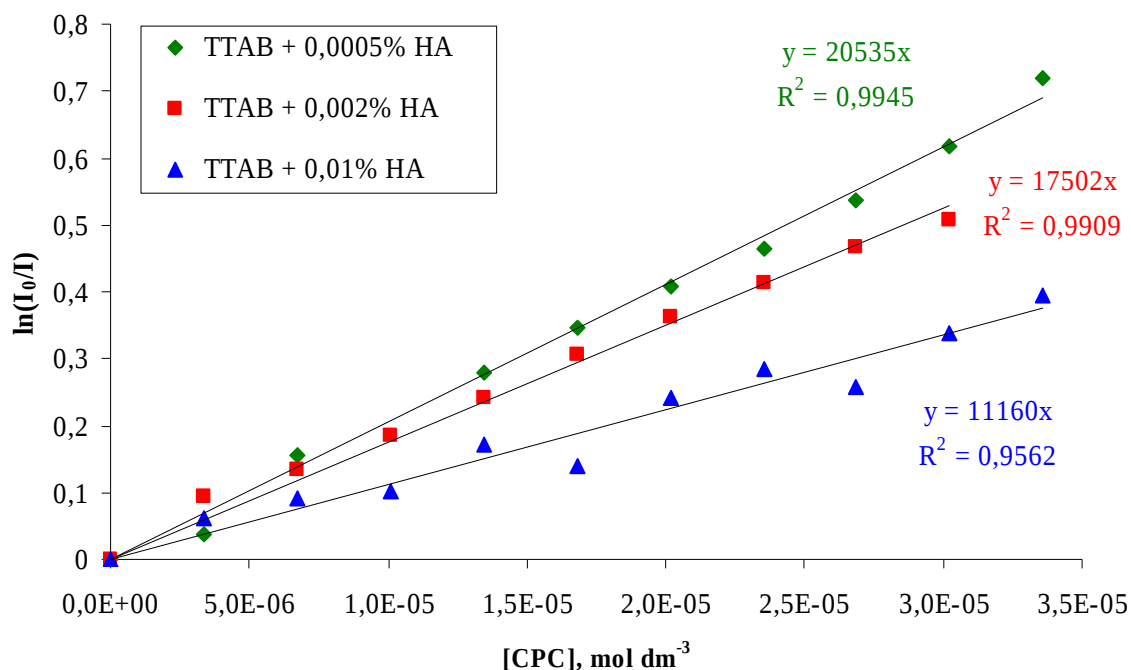
Obrázek 28: Závislost přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence pyrenu bez a v přítomnosti CPC na koncentraci CPC (průměr ze třech měření)

5.3.1 Vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo TTAB

Pro tyto experimenty byl vybrán hyaluronan s molární hmotností 418 kDa. Byl sledován vliv přídavku hyaluronanu o různé koncentraci na průměrné agregační číslo TTAB. Vzhledem k tomu, že při vyhodnocování CMC těchto systémů bylo zjištěno, že se zřejmě tvoří agregáty již při mnohem nižší koncentraci než je CMC samotného TTAB, výsledné hodnoty průměrných agregačních čísel nemusí nic vypovídat o velikosti micel či agregátů. Hodnoty vypočtených agregačních čísel viz tabulka 3. Ze směrnic závislostí přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence bez a v přítomnosti zhaščeče se dá odhadnout změna viskozity hydrofobní domény agregátů (obrázek 29). Zhašení mimo jiné závisí i na difúzním koeficientu prostředí, snížení hodnoty směrnice výše zmíněné závislosti ukazuje, že se pyren zhaší hůře, tedy je možné, že dochází ke zvýšení viskozity a tím se zabraňuje interakci pyrenu s CPC.

Tabulka 3: Vypočtené hodnoty agregačních čísel TTAB ve směsi s nativním hyaluronanem o $M_r = 418$ kDa

Vzorek	N_{ag}
10 mM TTAB	133 ± 1
10 mM TTAB + 0,0005% HA	103 ± 13
10 mM TTAB + 0,002% HA	168 ± 15
10 mM TTAB + 0,01% HA	112 ± 10



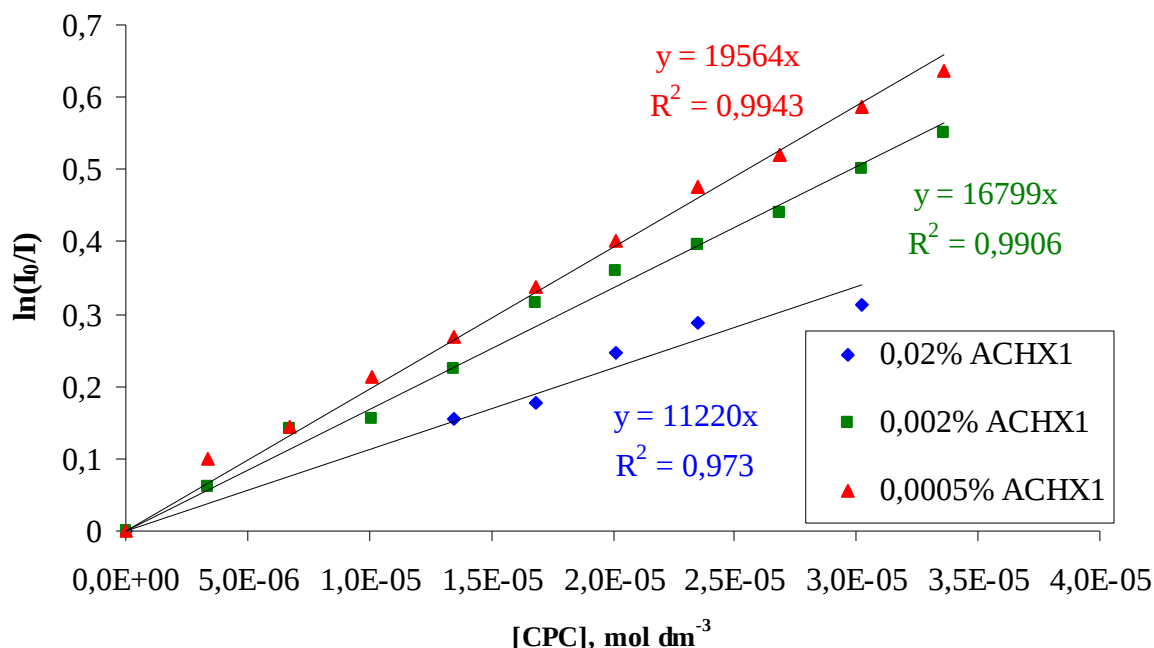
Obrázek 29: Závislost přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence pyrenu bez a v přítomnosti CPC na koncentraci CPC v systému TTAB a HA (průměr ze třech měření)

5.3.2 Vliv přídavku derivátu ACHX1 na agregační číslo TTAB

Stejně jako u nativního hyaluronanu, byl sledován přídavek i modifikovaného hyaluronanu. Na obrázku 30 můžeme vidět, že velmi nízké koncentrace vliv na agregační číslo TTAB nemají. Vzhledem k tomu, že hodnota CMC tohoto systému je téměř totožná s hodnotou CMC TTAB ve vodě, lze porovnávat hodnoty směrnic obou přímk. Jakmile koncentrace ACHX1 vzroste na hodnotu 0,002 %, agregační číslo se mírně zvýší. Při koncentraci 0,02% ACHX1 ve vzorku dojde opět ke snížení průměrného agregačního čísla systému. Průběh závislosti poměru intenzit pyrenu 1 : 3 naznačuje, že v tomto systému dochází k tvorbě agregátů již při $c_{\text{TTAB}} \sim 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, přičemž křivka nevykazuje dva zlomy, dá se tedy předpokládat, že v systému existují pouze agregáty hyaluronan-TTAB. Je tedy pravděpodobné, že vypočtené agregační číslo v tomto systému stanovuje velikost agregátů, které se vytvořily. Opět je diskutabilní, zda je vhodné usuzovat z vypočtených agregačních čísel na velikost agregátů. Vypočtená agregační čísla v přítomnosti různých koncentrací ACHX1 viz tabulka 4. Změny hodnot směrnic přímk závislostí udaných na obrázku 30 lze diskutovat stejně jako v přítomnosti nativního hyaluronanu.

Tabulka 4: Vypočtené hodnoty agregačních čísel TTAB ve směsi s modifikovaným hyaluronanem ACHX1

Vzorek	N _{ag}
10 mM TTAB	133 ± 1
10 mM TTAB + 0,0005% ACHX1	138 ± 3
10 mM TTAB + 0,002% ACHX1	165 ± 4
10 mM TTAB + 0,02% ACHX1	107 ± 5



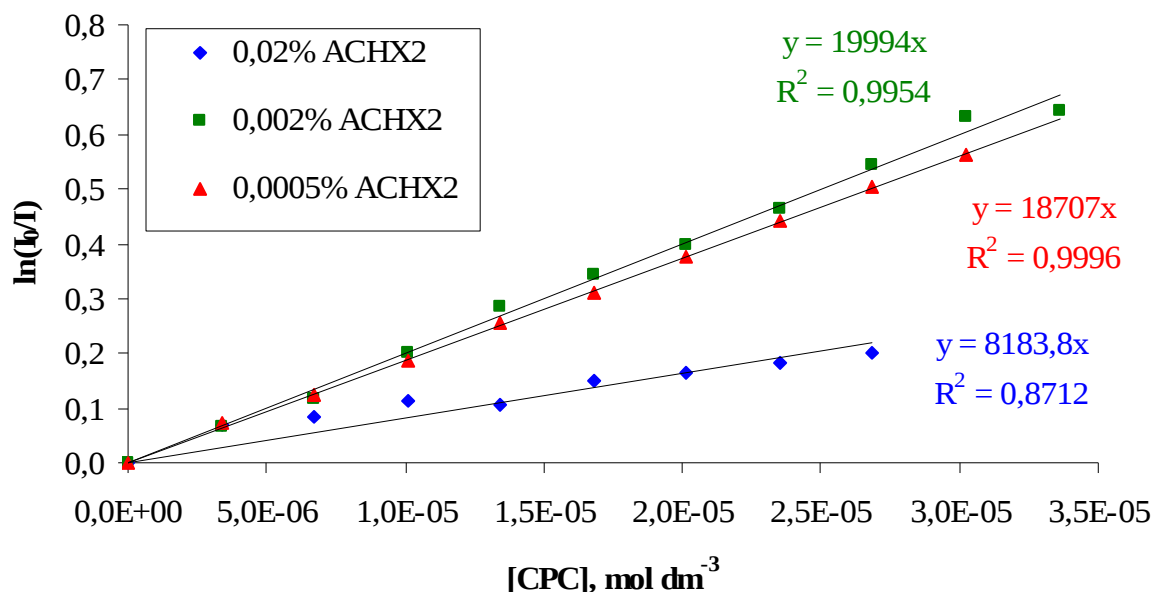
Obrázek 30: Závislost přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence pyrenu bez a v přítomnosti CPC na koncentraci CPC v systému TTAB a ACHX1 (průměr ze třech měření)

5.3.3 Vliv přídavku derivátu ACHX2 na agregační číslo TTAB

Byl studován také vliv přídavku derivátu ACHX2. Co se týče vypočítaných hodnot agregačních čísel, mají stejný charakter jako v předchozích případech. Jen lze obecně říci, že v předchozích případech se hodnoty agregačních čísel při stejných koncentracích hyaluronanu více blížily k sobě, kdežto v případě přídavku ACHX2 je rozdíl znatelnější. V případě hodnoty směrnice přímky v závislosti na obrázku 31 lze říci, že pokud budeme interpretovat sklon přímky jako ukazatel viskozity domény, dochází k znatelnějšímu nárůstu viskozity u vzorku s nejvyšší koncentrací ACHX2.

Tabulka 5: Vypočtené hodnoty agregačních čísel TTAB ve směsi s modifikovaným hyaluronanem ACHX2

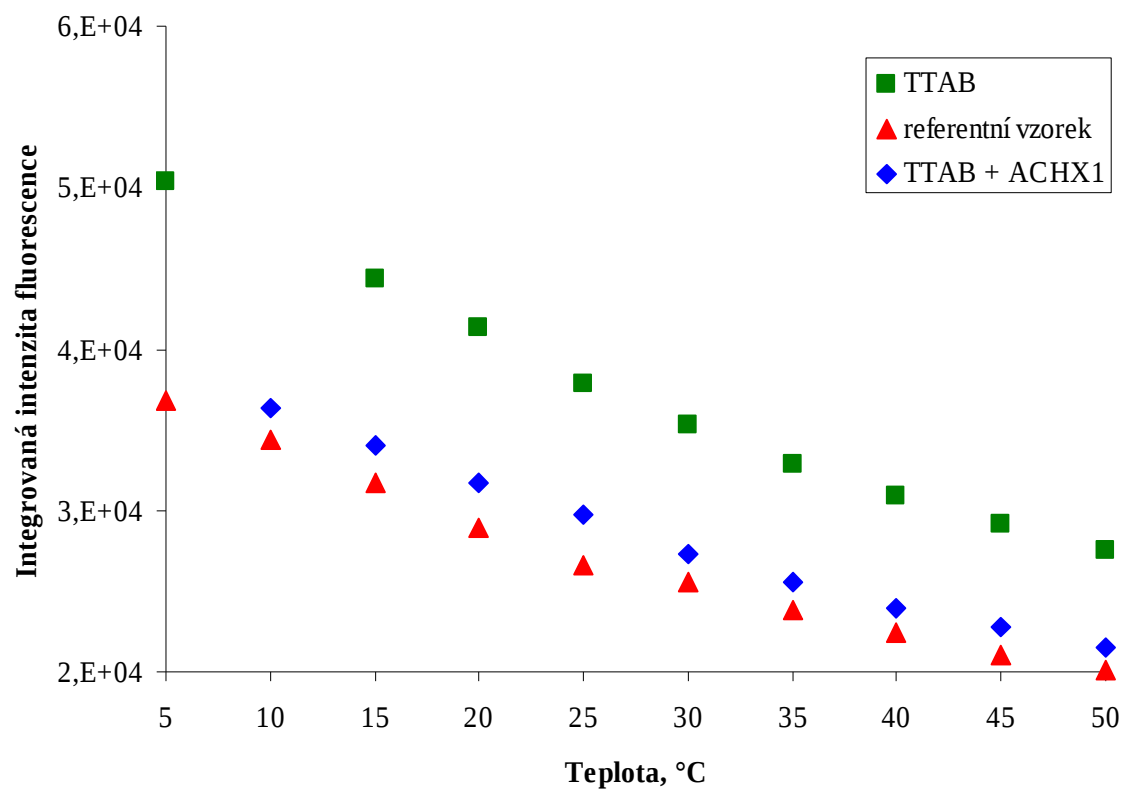
Vzorek	N _{ag}
10 mM TTAB	133 ± 1
10 mM TTAB + 0,0005% ACHX2	142 ± 6
10 mM TTAB + 0,002% ACHX2	199 ± 10
10 mM TTAB + 0,02% ACHX2	82 ± 20



Obrázek 31: Závislost přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence pyrenu bez a v přítomnosti CPC na koncentraci CPC v systému TTAB a ACHX2 (průměr ze třech měření)

5.3.4 Výměna rozpuštěné hydrofobní látky mezi micelami TTAB a vliv přidavku modifikovaného hyaluronanu na tuto výměnu

Byly připraveny vzorky pyrenu rozpuštěného v micelách TTAB a CPC rozpuštěného v TTAB. Předpoklad byl, že pokud dojde po smíchání těchto odděleně připravených vzorků k výměně pyrenu mezi micelami, dojde ke zhášení fluorescence pyrenu díky interakci s CPC. Poměr počtu micel, koncentrace pyrenu a koncentrace CPC byl zvolen takový, aby při zhášení po smíchání vzorků došlo k úbytku fluorescence zhruba na polovinu původní hodnoty intenzity. Micely ionogenních tenzidů jsou stabilní několik dní [50], proto bylo zkoumáno, zda dochází ke splývání micel TTAB vlivem zvýšené teploty v horizontu jedné hodiny. Protože intenzita fluorescence klesá s teplotou, byl připraven referenční vzorek, kdy byla sledována intenzita fluorescence pyrenu při rostoucí teplotě (viz obrázek 32). Porovnáním poklesu intenzit fluorescence pyrenu v referenčním a měřeném vzorku lze zjistit, zda dochází k výměně pyrenu mezi micelami. Na obrázku 32 je naznačen trend poklesu intenzity fluorescence referenčního vzorku. Jak můžeme vidět na obrázku 32, trend poklesu v obou měřených systémech je stejný jako u referenčního vzorku. Vzhledem k tomu, že při žádné teplotě nedošlo k náhlému poklesu intenzity fluorescence, lze říci, že ke splnutí micel a tedy výměně pyrenu mezi micelami nedošlo.



Obrázek 32: Pokles intenzity fluorescence pyrenu vlivem teploty

6. ZÁVĚR

Cílem práce byla řešerše na téma využití přenosu energie ve studiu agregačních a asociativních procesů v koloidních roztocích biopolymerů a návrh experimentů zaměřených na studium přenosu energie v koloidních roztocích na bázi hyaluronanu a vlivu fyzikálně-chemických podmínek.

Pomocí internetové a literární řešerše bylo zjištěno jakým způsobem lze vyhodnotit přenos energie. Rezonanční přenos energie slouží jako „spektroskopické pravítko“, lze tedy s jeho pomocí určit vzdálenosti například v biomolekulách či supramolekulárních shlucích. Vhodným zvolením fluorescenčních sond a tenzidů je možné odhadnout velikost agregátů, které daný tenzid tvoří. Byl vybrán hydrofobní perylen (donor), záporně nabitý hydrofilní fluorescein (akceptor) a kationaktivní tenzid TTAB. Tyto fluorofory mají vysokou hodnotu překryvového integrálu, tedy $1,2 \cdot 10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ a hodnota kritického Försterova poloměru ve vybraném systému je 43,9 Å, což znamená, že pokud budou tyto sondy od sebe vzdáleny 43,9 Å, účinnost přenosu energie bude 50 %. Pro výpočet Försterova poloměru je nutné znát kvantový výtěžek donoru v daném prostředí, v micelárním prostředí TTAB byla hodnota kvantového výtěžku perylenu 0,38. Analýzou úbytku fluorescence vlivem přidavku fluoresceinu byla zjištěna maximální hodnota účinnosti přenosu energie mezi perylenem a fluoresceinem v roztoku TTAB ($0,95 \pm 0,02$), což určuje, že vzdálenost sond je $27,0 \pm 2 \text{ Å}$.

K tomuto systému byl přidáván nativní či modifikovaný hyaluronan v různých koncentracích a byl sledován vliv jeho přidavku na účinnost přenosu energie. V případě nativního hyaluronanu docházelo k podpoře přenosu energie při nižších koncentracích akceptoru, také bylo dosaženo maximální účinnosti přenosu při nižší koncentraci fluoresceinu, avšak hodnota maximální účinnosti se nezměnila. Byl také studován vliv molární hmotnosti nativního hyaluronanu na přenos energie a bylo zjištěno, že při stejné koncentraci hyaluronanu ve vzorku vlivem různé molární hmotnosti ke změnám nedochází. Přídavek derivátu hyaluronanu Acylhex1 a Acylhex2 má na přenos energie trochu jiný vliv. Nedochází k významné podpoře přenosu energie při nižších koncentracích fluoresceinu, avšak byla získána vyšší hodnota maximální účinnosti přenosu energie ($0,98 \pm 0,005$ pro přídavek Acylhex1 a $0,975 \pm 0,015$ pro přídavek Acylhex2), což znamená zmenšení vzdálenosti fluoroforů o 2–5 Å. Lze tedy říci, že došlo ke zmenšení micel vlivem přidavku hydrofobizovaného derivátu.

Analýzou úbytku fluorescence lze také vyhodnotit zhášení. Pomocí statického zhášení v micelárním prostředí lze určit například průměrné agregační číslo v systému. Jako fluorofor byl použit pyren a jako zhášec cetylpyridinium chlorid, který působí jako kosurfaktant. Pro stanovení agregačního čísla je nutné znát hodnotu CMC systému. Stanovení CMC bylo provedeno pomocí pyrenu, kdy byl sledován poměr intenzit 1 : 3 v závislosti na rostoucí koncentraci TTAB bez a v přítomnosti nativního či modifikovaného hyaluronanu v několika koncentracích. CMC samotného TTAB ve vodě byla $3,2 \pm 0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$, vlivem přidavku hyaluronanu se měnila v rozmezí $0,014\text{--}5,053 \text{ mmol dm}^{-3}$, přičemž nejvíce byla hodnota CMC ovlivněna přídavkem derivátu Acylhex2. V případě přidavku nativního hyaluronanu a derivátu Acylhex1 nebylo ovlivnění tak velké a míra ovlivnění CMC byla téměř totožná. Při nejnižším přidavku hyaluronanu byly na Boltzmannově křivce, která slouží k vyhodnocení CMC, patrné dva zlomy, což naznačuje, že nejprve mohou vznikat agregáty TTAB-hyaluronan a potom micely TTAB. Díky tomuto zjištění nám následně vypočtená agregační čísla těchto systémů zřejmě neřeknou nic o velikosti agregátů či micel, protože není možné

s určitostí odhadnout, jak to v takovém systému vypadá a tedy jestli bylo určeno agregační číslo micel, micel zkondenzovaných na řetězci hyaluronanu či agregátů micel s hyaluronanem.

Pomocí zhášení fluorescence lze také zkoumat, zda dochází k výměně rozpuštěné látky mezi micelami. Byl připraven roztok pyrenu rozpuštěného v micelách TTAB a vedle něj byl připraven roztok rozpuštěného CPC v micelách TTAB. V případě splnutí micel by po smíchání vzorků došlo ke kontaktu pyrenu s CPC a intenzita fluorescence by poklesla. Při měření vlivu rostoucí teploty na intenzitu fluorescence pyrenu bylo zjištěno, že ke zhášení nedochází. Stejně tomu tak bylo i v přítomnosti derivátu Acylhex1. Lze tedy říci, že pokud bude v tomto systému solubilizována hydrofobní látka, nemělo by dojít k její výměně mezi micelami za podmínek, při kterých byl experiment prováděn, tedy v teplotním rozsahu 5–50 °C a v časovém horizontu jedné hodiny.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MLČOCHOVÁ, Petra, et al. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2007, vol. 69 [cit. 2008-11-07], s. 344–352. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [2] DŘÍMALOVÁ, Evženia, et al. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2005, vol. 61 [cit. 2008-11-07], s. 420–426. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [3] STERN, Robert, et al. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances* [online]. 2007, vol. 25 [cit. 2008-11-07], s. 537–557. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [4] ABATANGELO, G., WIEGEL, P.H. *Redefining Hyaluronan*. Elsevier. Amsterdam, 2000.
- [5] PHILPS, G.O., KENNEDY, J.F. *Hyaluronan 2000*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2001
- [6] BALAZS, E.A., DENLINGER, J.L. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found. Symposium* [online]. 1989, vol. 143 [cit. 2008-11-20], s. 265–275.
- [7] ASARI, A, et al. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Archive of Histology and Cytology* [online]. 1998, vol. 61 [cit. 2008-11-20], s. 125–35.
- [8] KAKEHI, Kazuaki, KINOSHITA, Mitsuhiro, YASUEDA, Shin-ichi. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, vol. 797 [cit. 2008-11-20], s. 347–355. Dostupný z WWW: <www.science-direct.com>.
- [9] DAY, A. J., PRESTWICH, G. D. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, vol. 277 [cit. 2008-11-20], s. 4585–4588.
- [10] TURLEY, E. A., et al. Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes. *Blood* [online]. 1993, vol. 81 [cit. 2008-11-20], s. 446–453.
- [11] LUO, Y.; PRESWITCH, G. D. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 1999, vol. 10 [cit. 2008-11-20], s. 755–763.

- [12] LUO, Y., ZIEBELL, M. R., PRESTWICH, G. D. A hyaluronic acid-Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules* [online]. 2000, vol. 1 [cit. 2008-11-20], s. 208–218.
- [13] AKIMA, K., IWATA, Y., MATSUO, K., WATAR, N. U.S. Patent, 5,733,891, 1998.
- [14] CORADINI, D., et al. A novel retinoic/butyric hyaluronan ester for the treatment of acute promyelocytic leukemia: preliminary preclinical results. *Leukemia* [online]. 2006, vol. 20 [cit. 2008-11-20], s. 785–792.
- [15] L. Bartovská: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. 2000, 16.4.2009 [cit. 2009-04-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/N403015.html>>.
- [16] *Glyco Forum* [online]. 1997 , Dec. 15, 1997 [cit. 2008-10-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>>.
- [17] ŠÍMA, Jan. *Spektrometrické analytické metody* [online]. 1999 [cit. 2006-10-17]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm>.
- [18] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. Weinheim (Federal Republic of Germany) : WILEY-VCH Verlag GmbH 69469, 2002. 399 s. ISBN 3-527-29919-X.
- [19] LAKOWICZ, Joseph. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006. 954 s. 3rd. ISBN 978-0387-31278-1.
- [20] SZÖLLÖSI, János, et al. Applications of fluorescence resonance energy transfer. *Reviews in Molecular Biotechnology* [online]. 2002, vol. 82 [cit. 2008-06-03], s. 251–266. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [21] NEDUMPARA, Ritty J., et al. Energy transfer studies in dye mixtures in different solvent environments. *Optics & Laser Technology* [online]. 2008, vol. 40 [cit. 2008-06-03], s. 953–957. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [22] CZÍMEROVÁ, A., BUJDÁK, J., IYI, N. Fluorescence resonance energy transfer between laser dyes in saponite dispersions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 2007, vol. 187 [cit. 2008-06-04], s. 160–166. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [23] MAJUMDER, Parijat , et al. Ultrafast dynamics in a nanocage of enzymes: Solvation and fluorescence resonance energy transfer in reverse micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2005, vol. 290 [cit. 2008-06-05], s. 432–474. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [24] CLEGG, Robert M. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1995, vol. 6 [cit. 2008-06-05], s. 103–110.

- [25] SÁNCHEZ, F. García, RUIZ, C. Carnero. Intramolecular energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of luminiscence* [online]. 1996, vol. 69 [cit. 2008-06-16], s. 179–186.
- [26] WU, Pengguang, BRAND, Ludwig. Resonance energy transfer: Methods and applications. *Analytical biochemistry* [online]. 1994, vol. 218 [cit. 2008-04-28], s. 1–13. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [27] GORBENKO, Galyna, et al. Resonance energy transfer study of peptide-lipid complexes. *Biophysical Chemistry* [online]. 2001, vol. 92 [cit. 2008-06-19], s. 155–168.
- [28] CHATTERJEE, Sujan, NANDI, Susantamay, BHATTACHARYA, Subhash Chandra. Fluorescence resonance energy transfer from Fluorescein to Safranin T in solutions and in micellar medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 2005, vol. 173 [cit. 2008-06-04], s. 221–227. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [29] BHATTAR, S.L. , KOLEKAR, G.B., PATIL, S.R. . Fluorescence resonance energy transfer between perylene and riboflavin in micellar solution and analytical application on determination of vitamin B2. *Journal of luminiscence* [online]. 2008, vol. 128 [cit. 2008-06-04], s. 306–310. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [30] EIDNE, Karin A., KROEGER, Karen E., HANYALOGU, Aylin C. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2002, vol. 13, no. 10 [cit. 2008-06-03], s. 415–421. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [31] MALLICK, Arabinda, et al. 7-Hydroxy-4-methyl-8-(40-methylpiperazine-10-yl)methyl coumarin: An efficient probe for fluorescence resonance energy transfer to a bioactive indoloquinolizine system. *Journal of luminiscence* [online]. 2006, vol. 118 [cit. 2008-06-04], s. 165–172. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [32] BARZYKIN, A. V., TACHIYA, M. Reaction Kinetics in Microdisperse Systems. *Chemical Reviews* [online]. 1996, vol. 3 [cit. 2008-06-04], s. 105–167.
- [33] KOGLIN, Peter K. F., et al. Determination of Micelle Aggregation Numbers by Energy Transfer. *Journal of physical chemistry* [online]. 1981, vol. 85 [cit. 2008-06-04], s. 2363. Dostupný z WWW: <http://pubs.acs.org>.
- [34] GEHLEN, Marcel H., DE SCHRYVER, Frans C. Fluorescence Quenching in Micelles in the Presence of a Probe-Quencher Ground-State Charge-Transfer Complex. *Journal of physical chemistry* [online]. 1993, vol. 97 [cit. 2008-06-04], s. 11242–11248.

- [35] LI, Xuelian, MCCARROLL, Matthew, KOHLI, Punit. Modulating Fluorescence Resonance Energy Transfer in Conjugated Liposomes. *Langmuir* [online]. 2006, vol. 22, no. 21 [cit. 2008-06-09], s. 8615–8617. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [36] DE OLIVEIRA, Hueder P. M., GEHLEN, Marcelo H. Electronic energy transfer between fluorescent dyes with inter- and intramolecular interactions. *Chemical physics* [online]. 2003, vol. 290 [cit. 2008-06-04], s. 85–91. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [37] SÁNCHEZ, F. Garcia, RUIZ, C. Carnero . Energy transfer in triton X-100 micelles. *Journal of luminiscence* [online]. 1993, vol. 55 [cit. 2009-03-06], s. 321–325. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [38] YAMASAKI, Takayuki, KAJIMOTO, Okitsugu, HARA, Kimihiko. High-pressure studies on AOT reverse micellar aggregate by fluorescence probe method. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 2003, vol. 156 [cit. 2009-03-06], s. 145–150. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [39] SAHA, D.C., RAY , K., MISRA, T.N. Energy transfer in triton-X 100 micelles: a fluorescence study. *Spectrochimica Acta A* [online]. 2000, vol. 56 [cit. 2009-03-06], s. 797–801. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [40] DE, Swati , GIRIGOSWAMI, Agnishwar, MANDAL, Anil Kumar. Energy transfer-a tool for probing micellar media. *Spectrochimica Acta A* [online]. 2003, vol. 59 [cit. 2009-03-06], s. 2487–2496. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [41] BURCU, Meryem Aydın et al., The fluorescence resonance energy transfer between dye compounds in micellar media, *Dyes and Pigments* [online]. 2008, oi:10.1016/j.dyepig.2008.10.002.
- [42] DE, Swati, GIRIGOSWAMI, Agnishwar. Fluorescence resonance energy transfer-a spectroscopic probe for organized surfactant media. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2004, vol. 271 [cit. 2009-03-06], s. 485–495. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [43] GOSWAMI, Arup, PAL, Medini Kanta. Transfer of energy from thiocyanine to acridine orange and formation of exciplex between the two dyes bound to surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1998, vol. 138 [cit. 2009-03-06], s. 123–129. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [44] LUAN, Yu-Xia , et al. Studies on aggregation of AOT and NaDEHP via the energy transfer between AO and RB molecules. *Dyes and Pigments* [online]. 2005, vol. 67 [cit. 2009-03-06], s. 223–228. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.

- [45] DEUMI, Michel, BARAKA, Mohamed El, QUINONES, Edwin. Fluorescence quenching of pyrene derivatives by iodide compounds in erythrocyte membranes: an approach of the probe location. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 1995, vol. 87 [cit. 2009-03-24], s. 105–113. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [46] BAKSHI, Mandeep Singh, SINGH, Kulbir. Synergistic interactions in the mixed micelles of cationic gemini with zwitterionic surfactants: Fluorescence and Krafft temperature studies. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2005, vol. 287 [cit. 2009-03-25], s. 288–297. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [47] LEE, Ji Hoon , et al. Characterizing pyrene–Ag⁺ exciplex formation in aqueous and ethanolic solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 2004, vol. 167 [cit. 2009-03-24], s. 141–148. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [48] YANG, Hong, BOHNE, Cornelia. Chiral discrimination in the fluorescence quenching of pyrene complexed to β -cyclodextrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* [online]. 1995, vol. 86 [cit. 2009-03-25], s. 209–217. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [49] ALMGREN, Mats, et al. Fluorescence quenching dynamics in rodlike micelles. *Journal of Physical Chemistry* [online]. 1988, vol. 92 [cit. 2009-03-25], s. 4479–4483. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org>.
- [50] RHARBI, Yahya, WINNIK, Mitchell A. Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2001, vol. 89–90 [cit. 2009-04-22], s. 24–46. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [51] AGUIAR, J., et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2003, vol. 258 [cit. 2009-03-23], s. 116–122. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [52] STEVENSON, Sarah A., BLANCHARD, G.J. Quantitating the association of charged molecules with ionic micelles. *Spectrochimica Acta Part A* [online]. 2007, vol. 67 [cit. 2008-11-20], s. 98–104. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [53] LINDEGAARD, Dorthe , et al. Pyrene–perylene as a FRET pair coupled to the N2'-functionality of 2'-amino-LNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2008, vol. 16 [cit. 2008-11-26], s. 94–99. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [54] ANANTHAPADMANABHAN, K. P. , et al. Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* [online]. 1985, vol. 1 [cit. 2006-12-15], s. 352–355. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.

- [55] DANINO, D., TALMON, Y., ZANA, R. Alkanediyl-.alpha.,.omega.Bis(Dimethylalkylammonium Bromide) Surfactants (Dimeric Surfactants).5. Aggreagation and Microstrucutre in Aqueous Solutions. *Langmuir* [online]. 1995, vol. 11, no. 5 [cit. 2009-03-23], s. 1448–1456. Dostupný z WWW: <pubs.acs.org>.
- [56] SHARMA, K. Shivaji, et al. Self-aggregation of a cationic-nonionic surfactant mixture in aqueous media: Tensiometric, conductometric, density, light scattering, potentiometric, and fluorometric studies. *Journal of physical chemistry B* [online]. 2004, vol. 108 [cit. 2009-03-18], s. 12804–12812.
- [57] GORSKI, N., KALUS, J. Temperature Dependence of the Sizes of Tetradecyltrimethylammonium Bromide Micelles in Aqueous Solutions. *Langmuir* [online]. 2001, vol. 17 [cit. 2009-03-29], s. 4211–4215. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org>.
- [58] GEHLEN, Marcel H., SCHRYVER, Frans C. De. Time-Resolved Fluorescence Quenching In Micellar Assemblies. *Chemical Reviews* [online]. 1993, vol. 93 [cit. 2009-03-23], s. 199–221. Dostupný z WWW: <pubs.acs.org>.

8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACHX1	Acylhex1, modifikovaný hyaluronan, stupeň substituce 10 %
ACHX2	Acylhex2, modifikovaný hyaluronan, stupeň substituce 40 %
CMC	kritická micelární koncentrace
CPC	cetylpyridinium chlorid
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
Da	1 dalton = 1 g mol^{-1} (jednotka používaná v biochemii)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTAB	decyltrimethylamonium bromid
HOMO	nejvýše obsazený molekulový orbital (highest occupied molecular orbital)
I3A	3-jodpropanová kyselina
I Φ A	4-jodbenzoová kyselina
I10A	10-joddekanová kyselina
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (lowest unoccupied molecular orbital)
M	mol dm^{-3}
M*	excitovaná molekula
MM*	excitovaný dimer (excimer)
N _{Ag}	agregační číslo
Q	zhášec
RET	rezonanční přenos energie (resonance energy transfer)
SANS	malouhlový rozptyl neutronů (single angle neutron scattering)
SDS	dodecylsulfát sodný
TPC	tetradecylpyridinium chlorid
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
TX100	polyoxyetylen(9,5)oktylfenol (Triton X-100)
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra
ZR	zásobní roztok

9. SEZNAM PŘÍLOH

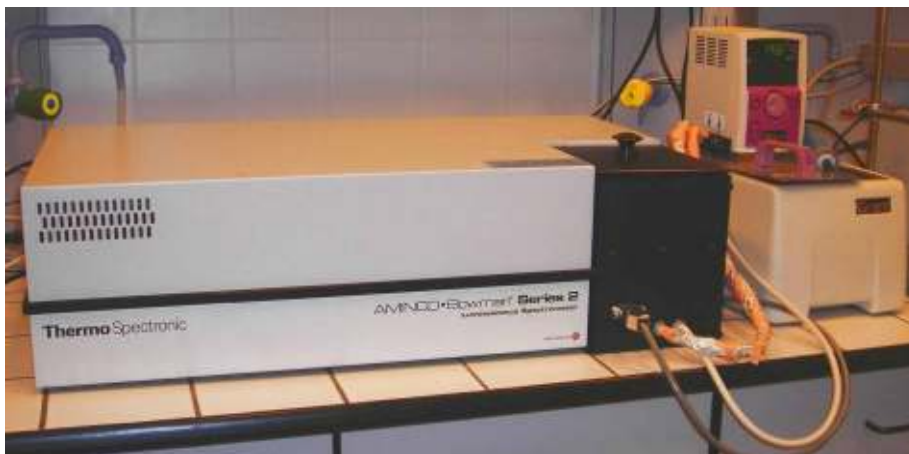
Příloha 1	<i>UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe</i>
Příloha 2	<i>Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Bowman, Series 2</i>
Příloha 3	<i>Část koncentrační řady fluoresceinu v roztoku perylenu v 10 mM TTAB</i>
Příloha 4	<i>Část koncentrační řady fluoresceinu v roztoku perylenu v 10 mM TTAB osvětlená UV-lampou</i>

10. PŘÍLOHY

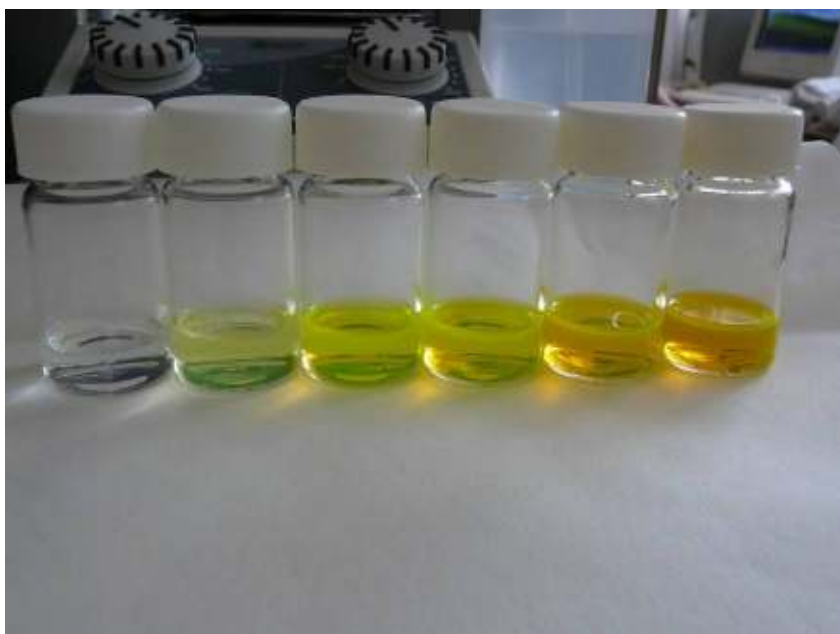
Příloha 1: *UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe*



Příloha 2: *Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Bowman, Series 2*



Příloha 3: *Část koncentrační řady fluoresceinu v roztoku perylenu v 10 mM TTAB*



Příloha 4: Část koncentrační řady fluoresceinu v roztoku perylenu v 10 mM TTAB osvětlená UV-lampou

