



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**DIFÚZNÍ VLASTNOSTI OPAČNĚ NABITÝCH
ORGANICKÝCH MOLEKUL V ROZTOCÍCH HYDROFILNÍCH
POLYELEKTROLYTŮ**

DIFFUSION PROPERTIES OF OPPOSITELY CHARGED ORGANIC MOLECULES IN SOLUTIONS OF
HYDROPHILIC POLYELECTROLYTE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Rýcová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0994/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Eva Rýcová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Zuzana Adamcová	

Název diplomové práce:

Difúzní vlastnosti opačně nabitých organických molekul v roztocích hydrofilních polyelektrolytů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma stanovení difúzních vlastností fluoreskujících malých molekul v roztocích polymerů s přihlédnutím k technikám fluorescenční spektroskopie.
2. Navrhnout experimenty pro ověření difúzních vlastností kladně nabitě fluorescenční sondy v roztoku hyaluronanu sodného.
3. Stanovit vliv koncentrace polyelektrolytu na difúzní vlastnosti organické fluorescenční sondy.
4. Diskutovat vlastnosti roztoku polyelektrolytu z hlediska stanovených difúzních vlastností vybrané sondy.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Eva Rýcová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem fyzikálních interakcí záporně nabitých polymerů s malými ionogenními fluoreskujícími molekulami. Ověřuje přítomnost této vazby pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a poskytuje komplexní pohled na tuto problematiku. Cílem bylo prozkoumat koncentrační závislost na difúzních vlastnostech systému. Pro tento experiment byl zvolen poměr P/D , kde P představuje počet vazných míst na polymeru a D reprezentuje počet vazných míst na molekule fluorescenční sondy. Jako polymery byly zvoleny hyaluronan sodný, chondroitin sulfát sodný a polystyrensulfonát sodný, a jako fluorescenční sondy byly použity akridinová oranž a Rhodamin 6G. Důvodem, proč byly pokusy prováděny právě s těmito sondami, byl předpoklad, že díky kladnému náboji na fluorescenční sondě bude docházet k elektrostatické interakci se záporným nábojem polymeru. U akridinové oranže nebyla vazba jednoznačně prokázána, u Rhodaminu 6G byla interakce detekována.

ABSTRACT

This work is focused on physical interactions of negatively charged polymers with small ionogenic fluorescent molecules. Trying to verify the presence of these interactions using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and provides a comprehensive view of the problem. The aim of this work is to observe the effect of concentration on the diffusion properties. P/D ratio, where P represents number of polymer binding sites and D number of dye binding sites, was chosen for this issue. Hyaluronate, sodium chondroitin sulfate and sodium polystyrene sulfonate were used as polymers and Acridine Orange, and Rhodamine 6G were chosen as fluorescent probes. The reason why this experiment uses these probes, was the assumption, that the positive charge occurring on the fluorescent probe will lead to the electrostatic interaction with the negatively charged polymer. As a result, the bond between acridine orange and polyelectrolyte was not clearly demonstrated, but the interaction with Rhodamine 6G have been proved.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan sodný, polystyren sulfonát sodný, Rhodamin 6G, akridinová oranž, fyzikální interakce, fluorescence

KEYWORDS

sodium hyaluronate, sodium polystyrene sulfonate, Rhodamine 6G, acridine orange, physical interaction, fluorescence

RÝCOVÁ, E. *Difúzní vlastnosti opačně nabitých organických molekul v roztocích hydrofilních polyelektrolytů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 62 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Mé osobní poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD. za ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Adamcové za cenné rady. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu nejen ve studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
	2.1 Kyselina hyaluronová	7
	2.2 Polystyren sulfonát sodný.....	11
	2.3 Chondroitin sulfát	13
	2.4 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek	13
	2.5 Fluorescenční sondy	14
	2.6 Fluorescence	16
	2.7 Ustálená a časově rozlišená fluorescence	21
	2.8 Fluorescenční korelační spektroskopie.....	21
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
	4.1 Materiály.....	34
	4.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků.....	34
	4.3 Použité přístroje.....	35
	4.4 Vlivy na měření	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
	5.1 Fyzikální interakce polyelektrolytu s akridinovou oranží	44
	5.2 Fyzikální interakce polyelektrolytu s Rhodaminem 6G	46
6	ZÁVĚR.....	53
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	55
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	62
	8.1 Seznam zkratk.....	62
	8.2 Seznam symbolů.....	62

1 ÚVOD

Snahou mnoha výzkumníků je objevit takový polymerní nosič, který by ideálně navázal léčivo a distribuoval ho v lidském těle tak, aby byly zásahy do okolních zdravých tkání co nejmenší. Ovšem nic není ideální a snažíme se tedy najít určitý kompromis.

Existuje mnoho léčiv, které na sobě nesou kladný náboj a právě proto byla zvolena sonda Akridinová oranž a Rhodamin 6G. Jako polymer byl zvolen hyaluronan sodný. Ten nachází v současné době využití v mnoha směrech a aplikacích, jak lékařských, tak i terapeutických. Je každodenní potřebou při ošetřování ran vlhkým krytím, léčbě bércových vředů a dalších diabetických potíží. Aplikují ho lékaři při kloubních onemocněních, očních operacích, a nemalá část se používá také v kosmetické chirurgii. Hyaluronan může být hlavní komponentou v nosiči pro cílenou distribuci léčiv, ale také může být pouze molekulou informační. S jeho pomocí můžeme zkoumat interakce s dalšími molekulami, což bylo zvoleno jako jeden z cílů této práce. Předpokládá se, že pokud by nosič obsahoval kyselinu hyaluronovou, dostal by se snáze k nádorovým buňkám. Tímto by se mohlo dosáhnout eliminace nežádoucích účinků současné terapie nádorových buněk. Další možnou aplikací nosičů na bázi hyaluronanu by mohl být vývoj takových nosičů, které by umožňovaly dlouhodobou cirkulaci léčiva v krevním řečišti a potlačily tak rezistenci cílové tkáně vůči léčivu, popř. zajistily setrvání léčiva v místě aplikace a jeho následné řízené uvolnění. To může být zajištěno právě polymerním nosičem, na kterém je aktivní látka navázaná a celý systém je aplikován přímo na místo určení.

V této práci jsou polymery kyselina hyaluronová a polystyren sulfonát sodný zvoleny díky své biokompatibilitě a jejich využití v medicíně.

Tato práce si klade za cíl alespoň částečně přispět do celkového výzkumu v oblasti fluorescenční spektroskopie, a to prozkoumáním využití této metody v procesech interakcí mezi molekulami. Fluorescenční korelační spektroskopie patří v současné době k nejmodernějším používaným metodám. Umožňuje nám sledovat jednotlivé molekuly a zároveň tak pozorovat chování molekul v daném prostředí. Měřením touto technikou zjistíme velikost a pohyblivost částic a také jejich koncentraci. Výzkum je zaměřen na interakce akridinové oranže a Rhodaminu 6G s různými polyelektrolyty. Podrobněji je zkoumán průběh interakcí mezi polystyren sulfonátem sodným a Rhodaminem 6G.

2 TEORETICKÁ ČÁST

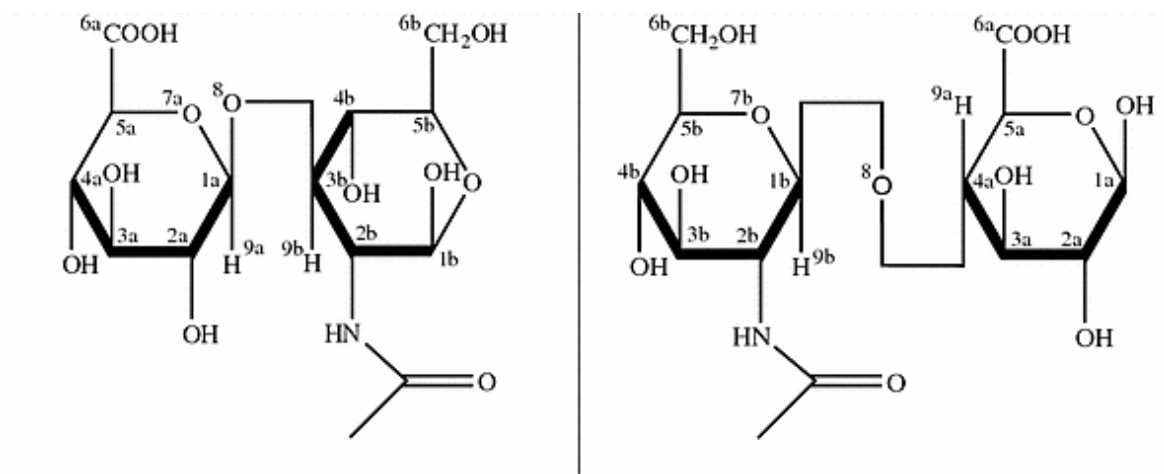
2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselinu hyaluronovou (HA) izolovali v roce 1943 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer ze sklivce očí skotu. Jméno dostala podle svého původu a z části i podle struktury. Název je odvozen ze slova „hyaloid“, tedy v překladu sklivec a poté z názvu „uronic acid“, což v angličtině znamená uronová kyselina, která je součástí struktury.

Dnes běžně označujeme tuto látku jako hyaluronan, protože v lidském těle se nevyskytuje jako kyselina, ale jako polyanion. Název hyaluronan byl zaveden roku 1986, aby odpovídal mezinárodní nomenklatuře sacharidů a zároveň odrazil fakt, že se tato látka může vyskytovat nejen jako kyselina, ale i ve formě soli [1].

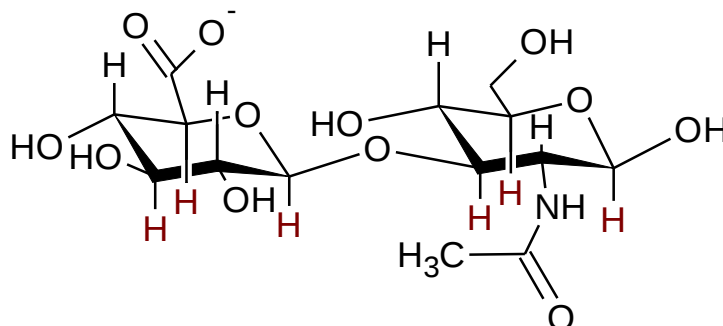
2.1.1 Chemická struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek. Tato jednotka obsahuje kyselinu D-glukuronovou a N-acetyl-D-glukosamin. Mezi těmito složkami se vyskytují dva typy β -glykosidických vazeb, a to 1-3 a 1-4 [2].



Obr. 1a : Spojení disacharidových jednotek 1-3(levá část) a 1-4 (pravá část) glykosidickou vazbou u hyaluronanu [3]

Objemné skupiny v obou jednotkách zaujímají stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco červeně naznačené vodíky zaujímají polohu axiální (viz obrázek 1b). Toto uspořádání je pro molekulu energeticky nejvýhodnější a takto uspořádané vodíky zároveň vytváří hydrofobní oblasti. Postranní řetězce tvoří oblasti hydrofilní [1].



Obr. 1b: Prostorové uspořádání funkčních skupin hyaluronanu

2.1.2 Výskyt, funkce a využití

Kyselina hyaluronová je zástupcem skupiny polysacharidů typicky se nacházejících v pojivových tkáních obratlovců, které byly dříve známy jako kyselé polysacharidy, a nyní je nazýváme glykosaminoglykany (GAG). Glykosaminoglykany jsou nevětvěné, jednořetězcové polymery disacharidových jednotek obsahujících N-acetylhexosamin a hexózu. Druhým cukrem je kyselina hexuronová. Jedinou výjimku tvoří keratan sulfát, jehož druhým cukrem je galaktóza [4].

Ostatní GAG krom kyseliny hyaluronové sdílejí několik vlastností – obsahují sulfátové skupiny a jejich řetězce jsou poměrně krátké (běžně okolo 15–20 kDa). Jejich syntéza probíhá v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu a bývají substituovány peptidy za vzniku proteoglykanů [4].

Hyaluronan je přirozeně syntetizován v plazmatické membráně buňky. Příslušný enzym v buněčné membráně střídavě váže k řetězci jednotlivé monosacharidové jednotky a narůstající polymer je pak vytlačen do extracelulární matrix. Tam je schopen tvořit komplexy s jinými látkami, např. proteiny. Při syntéze se aktivně účastní tři integrální membránové proteiny – hyaluronansyntázy. U obratlovců se vyskytují tři typy – HAS1, HAS2 a HAS3 [11, 74].

Přestože se hyaluronan skládá z jednoho polysacharidového řetězce, jeho molekulová hmotnost obvykle dosahuje milionů daltonů [4].

Rozložení hyaluronanu v těle savců bylo zjištěno pečlivou analýzou krysího těla [5]. Výsledek této analýzy by měl být analogický i pro jiné savce. Asi polovina hyaluronanu byla získána z kůže, čtvrtina z kloubů. Zbytek hyaluronanu je rozděleno rovnoměrně mezi vnitřní orgány a svaly. Procentuální zastoupení hyaluronanu v těle krysy je uvedeno v tabulce 1. Největší koncentraci hyaluronanu lze najít v pojivových tkáních, tedy v pupeční šňůře, synoviální tekutině, kůži, sklívci. Pozoruhodné množství bylo nalezeno také v plicích, ledvinách, mozku, svalech a naopak velmi málo je hyaluronanu v játrech. Nejnížší koncentrace je v krevním séru [4].

Tabulka 1: Distribuce hyaluronanu v různých tkáních krysy [5].

	Hmotnost [55]	Celkem hyaluronanu [mg]	Hyaluronan [%]
Celé tělo krysy	201	60,5	100
Kůže	40,2	33,8	56
Svaly	35,7	4,69	8
Kostra	57,6	16,2	27
Střeva a žaludek	15,8	0,5	1
Zbývající vnitřní orgány	43,4	5,25	9

V organismu plní hyaluronan různé funkce. Může hrát roli plniva, iontově výměnného filtru, promotéra buněčné migrace. Podílí se na embryonálním vývoji a hraje důležitou roli v hojení a regeneraci tkáně [6].

Kyselina hyaluronová a její rozkladné produkty jsou užívány v různých oblastech medicíny. Biologické vlastnosti se však liší v závislosti na velikost fragmentů. Vysokomolekulární HA vykazuje protizánětlivé, antiangiogenní a imunosupresivní vlastnosti, naopak středně velké fragmenty jsou angiogenní a imunostimulační. Tyto vlastnosti odvíjející se od počtu disacharidových jednotek umožňují užívat HA v různých lékařských aplikacích

(cílená distribuce léčiv, hojení ran, tkáňové inženýrství, apod.). Dalšími vlastnostmi přispívajícími k aplikačnímu potenciálu jsou biodegradabilita, biokompatibilita a hydratační účinky.

HA a její deriváty se využívají k vyplnění a rozšíření tkáňových prostor, k oddělení pojivových tkání při zraněních, čímž se zabraňuje jejich adhezi a předchází se tvorbě nadměrných jizev, k ochraně zdravé i zraněné tkáně před vlivy sucha a škodlivých faktorů, a také k doplnění tkáňových tekutin (např. synoviální tekutiny u artritických pacientů prostřednictvím intraartikulárních injekcí) [6].

Dalším místem využití HA je obor dermatologie a plastické chirurgie. Zde se využívá HA k vyplnění vrásek, rtů, apod. [7].

2.1.3 Vlastnosti hyaluronanu

V extracelulárním pH jsou karboxylové skupiny hyaluronanu plně ionizovány. Osmotická aktivita není ideální a v poměru k molekulové hmotnosti je dost vysoká. Z tohoto důvodu má hyaluronan obrovský vliv na své okolní vodní prostředí, kde ovlivňuje jak distribuci, tak pohyb molekul vody, a má tak hlavní roli v homeostázi lidského těla [8].

Tuhost řetězců polymeru podporuje uspořádání do rozvolněného klubka a tyto dlouhé řetězce zajišťují možnost obsadit velké molekulární domény. Řetězce se začnou překrývat a vytvářet tak síť stabilizovanou vzájemnými interakcemi mezi řetězci. Samostatně, nebo ve spojení s kolagenovými vlákny, či jinými makromolekulárními složkami extracelulární matrix snižují mobilitu sítě, a definují tak propustnost pro jiné látky, ať už pomocí difúze, nebo hydrodynamického toku [4].

Další podstatnou vlastností hyaluronové sítě je sterická exkluze vzhledem k ostatním makromolekulám. Při normální koncentraci hyaluronanu v synoviální tekutině je jen asi 15 % vody dostupné pro albumin, ale skutečná koncentrace ve zbývající části roztoku je větší. Stupeň exkluze se zvyšuje se zvyšující se molekulovou hmotností a částečně tak vysvětluje fakt, že se největší plazmatické proteiny v extravaskulárním prostoru redukuje dokonce ještě více než albumin. Mimo jiné to znamená, že virové protilátky mohou mít mnohem větší neutralizační aktivitu v přítomnosti polymerů, než se předpokládalo, a tímto budou bránit obnovení životaschopnosti viru [4].

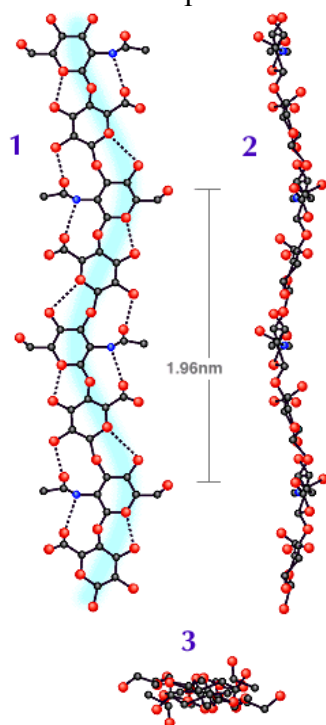
2.1.4 Hyaluronan v roztoku

Klíč k tomuto tématu spočívá ve tvarech, jaké umí řetězce hyaluronanu zaujmout. Klasické metody studia polymerů, jako je měření viskozity, ultracentrifugace a měření rozptylu světla podporovaly názor, že řetězec hyaluronanu je v roztoku ve formě náhodného klubka. Tyto metody však zkoumají systém na základě celku a srovnávají systém s matematickým modelem, který ale ne vždy musí odpovídat realitě [10].

Řetězce hyaluronanu obsahují dvě části – sacharidové kruhy, které jsou relativně rigidní, a mezi nimi glykosidickou vazbu složenou z kyslíkového atomu spojujícího tyto dvě sacharidové jednotky dohromady. Tyto dvě vazby, vedoucí z atomu kyslíku, zaujímají tvar písmena „V“. Substituenty vázané na koncích těchto vazeb, mohou rotovat až o 360°. Výpočty a molekulární modelování ukázaly realitu, že v rotaci substituentů budou určitá omezení, např. pozice, kdy jsou obě sacharidové jednotky příliš blízko sebe, bude nemožná. Zůstává však obrovský počet možností, jaký tvar mohou sacharidové jednotky zaujmout [9].

Pomocí měření rentgenového záření bylo zjištěno, že ve vodných roztocích se každá disacharidová jednotka otáčí o 180°, takže do původní konformace se dostane vždy po dvou otáčkách. Tvoří tedy dvakrát stočenou šroubovici (ne dvojšroubovici jako u DNA). Tato

struktura vykresluje jemnou křivku v obou pohledech – plošném i bočním (viz obrázek 2). Takovéto uspořádání preferují ve vodném roztoku i jiné sacharidy – keratan sulfát, chondroitin sulfát i dermatan sulfát. Objemné skupiny tedy po rotaci zaujmou výhodnější ekvatoriální polohu a vodíky se tak dostanou do pozice axiální [9].



Obr. 2: Plošná (1) a boční (2) projekce molekuly hyaluronanu. (3) je pohled skrz osu dvakrát stočené šroubovice. [10]

2.1.5 Hydrofobní oblasti v molekule hyaluronanu

Hydrofobní oblasti jsou důsledkem sekundární struktury, na rozdíl od posloupnosti cukrů, která tvoří primární strukturu. Hyaluronan v podobě dvakrát stočené šroubovice má ve své struktuře hydrofobní oblast složenou z axiálních vodíků navázaných na 8 nepolárních –CH skupin [10].

Hyaluronan se se svou velkou hydrofilitou a malou hydrofobní oblastí začal označovat jako amfifilní polyanion. Hydrofobní oblasti mají ve vodném prostředí velké důsledky. Shlukují se, čímž snižují povrchové napětí. Tento hydrofobní efekt řídí tvorbu membrán a přispívá ke stabilizaci např. dvojšroubovice DNA, přičemž se netvoří žádná chemická vazba. Hydrofilní a hydrofobní části řetězce se tedy střídají pravidelně [8, 9].

2.1.6 Další interakce

Hyaluronan tvoří agregáty sám se sebou. Částečně tomu napomáhají hydrofobní oblasti. Elektrostatické odpuzování, které by mohlo pomáhat tvorbě agregátů je brzděno jak hydrofobními oblastmi, tak i vodíkovými můstky mezi acetamidovými a karboxylovými skupinami. Pro tyto interakce krátkého dosahu je nejvýhodnější antiparalelní uspořádání. Teprve při tomto uspořádání dochází k jemnému zakřivení řetězce a rozložení hydrofobních oblastí a vodíkových můstků je optimální [8].

2.1.7 Metabolismus

Metabolismus HA je velmi dynamický. Některé buňky, např. chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují HA, tyto dva pochody jsou v rovnováze, která je řízena

aktuální koncentrací v tkáni. Metabolické studie ukázaly, že poločas rozpadu takto syntetizovaného hyaluronanu je 2–3 týdny, avšak u keratinocytů v epidermis je to méně než jeden den [11].

U savců je pak enzymatická degradace hyaluronanu výsledkem aktivity tří typů enzymů – hyaluronidáz, β -D-glukuronidáz a β -N-acetyl-hexosaminidáz. Obecně lze říci, že hyaluronidázy štěpí vysokomolekulární hyaluronan na menší oligosacharidy a zbylé dva enzymy štěpí jednotlivé fragmenty. Působení produktů degradace hyaluronanu má za následek zvýšení tkáňové permeability, proto se používá hyaluronan ve spojení s jinými léky k urychlení jejich rozptýlení, což nachází uplatnění např. v oční chirurgii, kde se používá v kombinaci s lokálními anestetiky. Tohoto faktu využívají i některé bakterie, které produkují hyaluronidázu, aby zvýšili svou mobilitu skrz tělesné tkáně [1].

Konečné produkty degradace, glukuronová kyselina a N-acetylglukosamin mohou být využity k další biosyntéze polysacharidů [12].

2.1.8 Výroba

Původně byla HA izolována z mnoha různých zdrojů – očního sklivce, pupeční šňůry, kohoutích hřebínků. Od extrakce z posledního zmiňovaného zdroje, kohoutích hřebínků, bylo však upuštěno z důvodu mnoha námitek na použití tohoto živočišného zdroje ve farmaceutickém průmyslu a dalších biomedicínských aplikacích. Jako alternativní způsob výroby byla tedy vyvinuta mikrobiální fermentace. První takto komerčně vyrobená HA pocházela z bakterie rodu *Streptococcus zooepidemicus* a tento kmen se používá dosud [13].

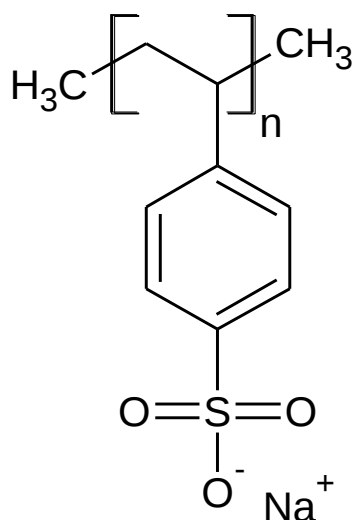
2.2 Polystyren sulfonát sodný

Polystyren sulfonát sodný (PSS) je z chemického pohledu sůl polykyseliny s funkčními sulfonátovými skupinami, navázanými na polymerní řetězec, tvořený monomery styrenu.

Tento hydrofilní polymer je založen na styrenovém skeletu. Jedná se o iontoměnič, který uvolňuje Na^+ ionty a absorbuje jiné kationty. Je snadno rozpustný ve vodě, ale v alkoholech se již nerozpouští. Struktura je zobrazena na obrázku 3. Tento polymer má také specifickou vlastnost – v jeho přítomnosti dimer akridinové oranže vykazuje fluorescenci a je možné jej pomocí fluorescenčního měření pozorovat [14].

Polystyren sulfonát sodný je bílý prášek, který našel velké uplatnění v oblasti medicíny, kde se používá ke snižování koncentrace draslíku v krvi a v játrech u lidí trpících hyperkalémií [21]. Při této nemoci je nejohroženějším orgánem srdce, může také nastat zvýšená neurosvalová dráždivost, či celková paralýza [16].

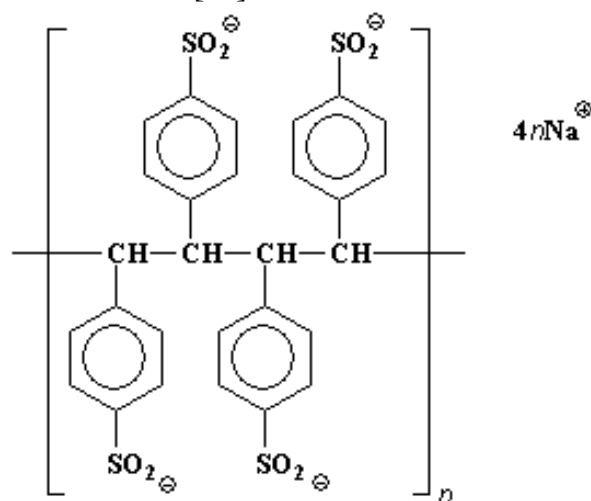
Jednou z výhod je nulová metabolizace PSS v lidském těle spojená s nulovým ukládáním v jeho tkáních, takže všechen PSS je po použití opět bezpečně z organismu vyloučen [17, 18]. Vedlejšími účinky jsou pak střevní poruchy, nebo ztráta chuti k jídlu [19]. V chemickém průmyslu se využívá k změkčování vody, kde funguje jako již zmíněný iontoměnič. Ve stavebním průmyslu je využíván jako plastifikátor cementů. V jiných odvětvích využíváme tento polymer jako membránu propustnou pro protony u palivových článků a ve formě pryskyřice je využíván jako katalyzátor v organické syntéze [20].



Obr. 3: Základní stavební jednotka polystyren sulfonátu s navázaným kationtem sodíku

Spojené monomerní prvky 4-vinylbenzenu tvoří polymerovou strukturu polystyren sulfonátu. Každý z těchto monomerních prvků je pak sulfonován funkčními skupinami SO_3^- . Hlavními metodami výroby jsou polymerace 4-vinylbenzen sulfonové kyseliny, popř. sulfonace polystyrenových řetězců. Reakčními podmínkami u druhého způsobu je řízena produkci dalších sekundárních látek v bočních reakcích. Může docházet např. k dvojité substituci fenylového kruhu, síťová polymerace přes sulfonylové skupiny apod. Na trhu je k dostání PSS takřka výhradně ve formě vápenatých nebo sodných solí, a to z důvodu stability a rozpustnosti [17].

V roztoku tvoří PSS dlouhé řetězce s centrální linií danou polymerizovaným vinylem, do prostoru jsou navázány sulfonované styrenové cykly, délka těchto řetězců může být velice rozdílná, pohybuje se od několika set po více jak 10^4 monomerních jednotek, přičemž molární hmotnost obsahuje řádově 10^4 – 10^6 Da [18].



Obr. 4: Schéma řetězce PSS [22]

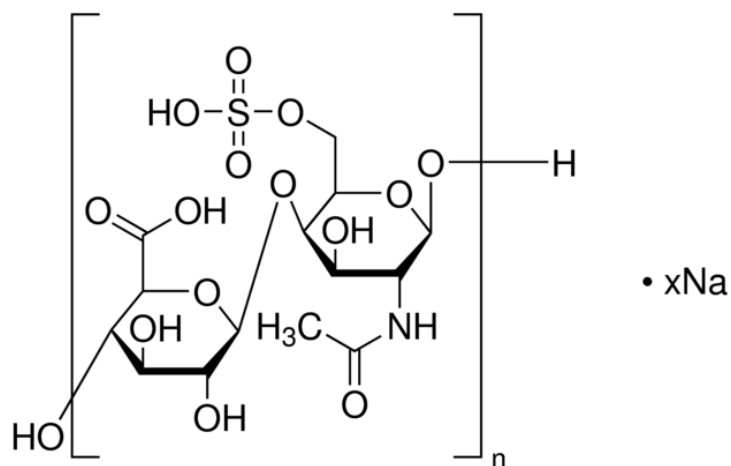
Díky této jednoduché centrální struktuře zaujímá řetězec mnoho stupňů volnosti, a tudíž samovolně nezaujímá strukturálně složitější uspořádání ve formě skládaného listu nebo šroubovice. Běžně se v roztoku vyskytuje ve formě shluků a propletenců těchto molekul bez vyššího prostorového uspořádání.

Polystyrensulfonát se díky svým známým fyzikálně-chemickým vlastnostem, biologické stabilitě a pravidelné struktuře často používá jako testovací a kontrolní polymerní látka při porovnávání fyzikálně-chemických interakcí s dalšími biopolymery, např. kyselinou hyaluronovou. Oba tyto lineární polymery jsou ve vodě rozpustné, tvoří viskoelastické roztoky a na každém svém monomeru obsahují záporně nabitě skupiny (na hyaluronanu COO^- , a na polystyren sulfonátu SO_3^-), které mohou vstupovat do interakce s dalšími kladně nabitými látkami nevazebnou fyzikální interakcí [17, 18].

2.3 Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát si našel svoje uplatnění v současné medicíně, i když zatím jen v podobě potravinových doplňků, které snižují celkové množství konzumovaných nesteroidních antiflogistik při osteoartritidě [23].

Tělu vlastní chondroitin sulfát je součástí extracelulární matrix, kde vazbou na příslušné proteiny vytváří skupinu proteoglykanů tzv. lektikanů, zodpovědných za strukturální integritu tkání a správnou funkci kloubních chrupavek [24].



Obr. 5: Struktura monomeru chondroitin sulfátu sodného

2.4 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Koloidem rozumíme systém složený z disperzních částic a disperzního prostředí. U klasických koloidů rozumíme disperzním prostředím rozpouštědlo a disperzními částicemi shluky molekul. V tomto případě jsou disperzními částicemi jednotlivé molekuly a systém nazýváme lyofilní koloidy [25].

Vysokomolekulární látky jsou kvůli své vysoké molekulární hmotnosti netěkavé a nelze je destilovat. Většina z nich při zahřívání měkne a nemá určitou teplotu tání. Rozkládají se při teplotě nižší než bod varu. Vlastnosti těchto látek se odvíjí od rozměrů, struktury a tvaru molekul. Podle tvaru můžeme vysokomolekulární látky rozdělit na lineární polymery, větvené polymery, nekonečné síťovité struktury a globulární makromolekuly. Koloidní roztoky tvoří pouze lineární polymery a globulární makromolekuly [25].

2.4.1 Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Podle povahy funkčních skupin můžeme tyto polyelektrolyty rozdělit na *kyselé*, obsahující záporně nabitě skupiny (COO^- , SO_3^-), *bazické* (NH_3^+), a *amfoterní*. O síle kyselosti rozhoduje disociační konstanta, ale porovnat poměry v těžké molekule je složité, protože dvě stejné skupiny mohou mít rozdílné hodnoty disociačních konstant. To může být způsobeno

vzájemným ovlivňováním okolního prostředí, pokud jsou molekuly příliš blízko sebe, pak zde mají vliv i odpudivé síly a rozdíly mezi disociačními konstantami stejných molekul způsobují i řetězce, na kterých jsou disociované skupiny navázané [25].

2.4.2 Vlastnosti roztoků vysokomolekulárních látek

Vyjadřování koncentrace roztoků polymerů není vhodné v molárních zlomcích, neboť hodnota molárního zlomku je vzhledem k vysoké molární hmotnosti polymerů příliš malá. Naopak velmi vhodným se jeví použití hmotnostních nebo objemových zlomků [25].

Kromě translačního a rotačního pohybu disperzních částic se u polymerů vyskytuje ještě intramolekulární rotace. Tou se mění tvar molekuly a v kinetických, optických a mechanických vlastnostech se tak projevují některé jevy, které se u jiných koloidně disperzních systémů nevyskytují, např. schopnost gelace [25].

Difúze

Difúzní koeficient makromolekul v roztocích nebývá sice v důsledku jejich velkých rozměrů vysoký, ale měření difúzního koeficientu se využívá při stanovování molární hmotnosti, např. bílkovin. Pro globulární makromolekuly, které se v roztoku chovají jako tuhé koule, může být poloměr vypočten za použití Einteinovy–Stokesovy rovnice z naměřeného difúzního koeficientu [25].

Viskozita

Viskozita zředěných roztoků globulárních polymerů se většinou řídí Einsteinovou rovnicí, ale roztoky lineárních polymerů vykazují odchylky od této rovnice i v nekonečném zředění. Při relativním pohybu makromolekulárního klubka a kapaliny ulpívá kapalina na člancích řetězce a rychlost proudění v blízkosti řetězce je nižší. V dobrém rozpouštědle klubko botná a viskozita roztoku roste. Nízká viskozita roztoku naopak svědčí o tom, že afinita polymeru k rozpouštědlu není příliš velká. Viskozita roztoků polyelektrolytů obsahujících jen souhlasné náboje za nepřítomnosti nízkomolekulárních elektrolytů, kdy makromolekula nabývá tvaru nataženého řetězce, je zvláště vysoká. Přídavkem elektrolytu se makromolekula sbaluje a viskozita klesá [25].

Viskozita koncentrovanějších roztoků roste rychleji než s první mocninou koncentrace, jak by odpovídalo Einsteinově rovnici. To je možno vysvětlit vznikem přechodných asociačních spojení mezi jednotlivými řetězci. V proudící kapalině se nepohybují již jednotlivé řetězce, ale shluky vzniklé spojením většího počtu makromolekul. Na rozdíl od zředěných systémů je viskozita roztoků polymerů ve špatných rozpouštědlech větší než v dobrých, neboť jsou zde podporovány asociace mezi jednotlivými makromolekulami a vytvářejí se větší celky. U koncentrovaných roztoků lineárních polymerů je pozorováno plastické chování. V těchto roztocích se vytvářejí nesouvislé struktury, střižné napětí je rozbíjí a viskozita s rostoucím napětím klesá. Viskozita také rychle klesá s teplotou, neboť dochází k zániku asociačních spojení v důsledku tepelného pohybu [25].

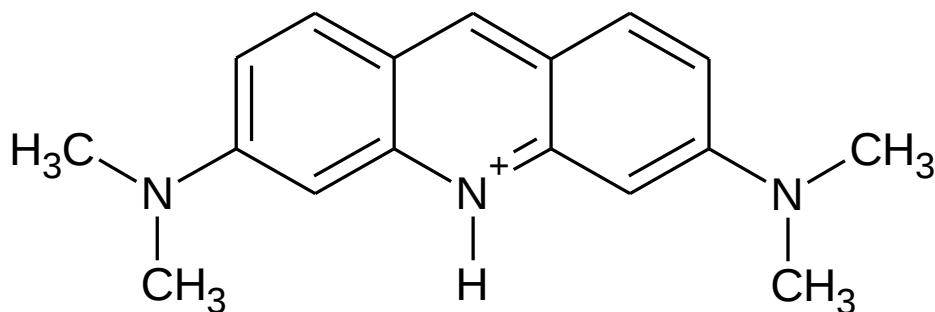
2.5 Fluorescenční sondy

Jedná se o vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám váží nekovalentně. Způsobují změnu fluorescenčních vlastností (intenzitu emise, posun emisního maxima, změnu času vyhasínání). Volba fluorescenční sondy je nejdůležitější součástí ve fluorescenční spektroskopii, protože právě její vlastností umožňují získat potřebné informace. V současné době existuje několik tisíc různých sond [26].

Pro tuto práci bylo zvoleno více fluorescenčních sond s jedním společným jmenovatelem – kladným nábojem na molekule.

2.5.1 Akridinová oranž

Akridinová oranž (AO) je kationaktivní fluorescenční sonda dobře rozpustná ve vodě. Je schopna reagovat s nukleovými kyselinami, což z ní činí velmi zajímavý nástroj pro pozorování těchto molekul [27]. Sonda s molekulami nukleových kyselin vytváří elektrostatické interakce a následně dojde ke změně absorpčního a fluorescenčního spektra. Pokud se AO naváže na DNA, emituje fluorescenci při 530 nm, v případě navázání na RNA dochází k emisi při 640 nm [28].



Obr. 6: Akridinová oranž – protonovaná forma

Ve zředěných roztocích existuje akridinová oranž pouze jako monomer, od koncentrace vyšší než $2 \cdot 10^{-5}$ M [76] se vyskytuje také jako dimer. Tvorba dimeru zhasí fluorescenci monomeru, ale i dimer vykazuje fluorescenci, ovšem s mnohem nižší intenzitou. Důkazem tvorby dimeru je měření intenzity fluorescence. S rostoucí koncentrací sondy se zvyšuje intenzita fluorescence až do chvíle agregace monomeru. V tomto okamžiku začne intenzita prudce klesat.

Akridinová oranž se využívá pro zkoumání interakcí sond a polymerů, jak biologických, tak i syntetických. Vazba sondy na polyelektrolyt může poskytnout mnoho informací o chemické a fyzikální podstatě vazných míst polymeru a o uspořádání řetězce polymeru [29].

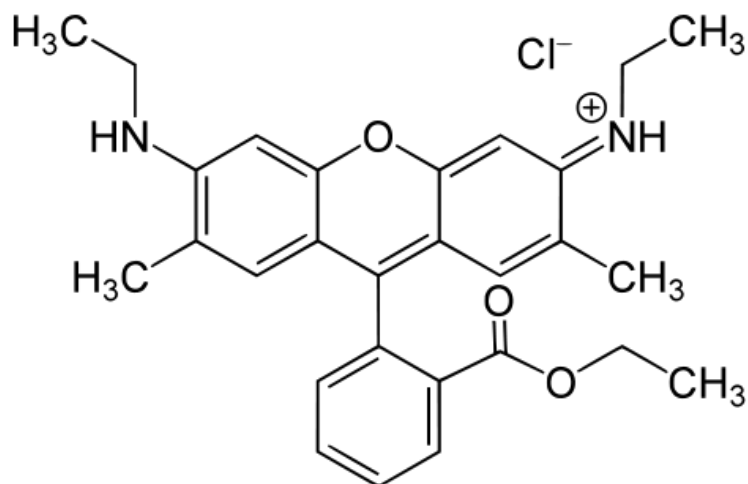
2.5.2 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G je jedním z hojně využívaných fluoroforů. Kromě použití jako fluorescenčního barviva se využívá jako barvivo v kapalných laserech. Rhodamin 6G je jednou z nejpožívanějších a nejstudovanějších laserových barviv [30, 31].

Rhodaminová barviva mají rigidní a planární centrální molekulární strukturu. Vyznačují se dlouhými vlnovými délkami excitace a emise, v oblastech 480–600 nm a 500–700 nm [15, 32]. Jejich kvantový výtěžek a fotochemická stabilita jsou vysoké [32, 33].

Rhodamin 6G je zcela rozpustný v methanolu, ethanolu a jiných organických rozpouštědlech. Ve vodných roztocích agreguje od koncentrace 10^{-6} M výše [35, 36]. Tento jev je způsoben hydrofobními interakcemi mezi alkylovými substituenty na molekule. Dochází k formování dimerů a oligomerů [30, 33, 82].

Při dostatečném zředění, kdy je potlačena agregace, je maximum excitace 525 nm a maximum emise 554 nm [36].



Obr. 7: Struktura Rhodaminu 6G

2.6 Fluorescence

V současné době je fluorescence dominantním jevem využívaným hlavně v oblasti biotechnologie, průtokové cytometrie, lékařské diagnostice, DNA sekvenaci, forenzní a genetické analýze. Došlo k dramatickému nárůstu využití fluorescence v buněčném a molekulárním rozpoznávání. Díky fluorescenci je možno odhalit umístění molekuly a pozorovat také molekuly v intracelulárním prostoru; detekce může probíhat na úrovni jedné molekuly [32].

2.6.1 Jevy fluorescence

Luminiscence je emise světla z jakékoliv látky, nastává z elektronicky excitovaných stavů.

Luminiscence se formálně rozděluje do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence, v závislosti na povaze excitovaného stavu. V excitovaných singletových stavech se elektron v excitovaném orbitalu spáruje s dalším elektronem, který má opačný spin a nachází se v orbitalu v základním stavu. V důsledku toho je návrat do základního stavu povolen a dochází k emisi energie. Emisní rozsah fluorescence je převážně od 10^8 s^{-1} , tudíž typická doba života se pohybuje okolo 10 ns. Existují ale i případy, kdy emise nastává v řádově kratších časových intervalech. Doba života fluoroforu je průměrná doba mezi excitací a návratem do základního stavu. Je třeba zvážit dobu života 1 ns v kontextu k rychlosti světla. Světlo za 1 ns urazí ve vakuu zhruba 30 cm. Mnoho fluoroforů má subnanosekundovou dobu života. Vzhledem k takto krátké době fluorescence, měření časově rozlišené emise vyžaduje sofistikovanou techniku. I přesto, že je měření časově rozlišené fluorescence složitější, je tato technika široce využívána kvůli získaným informacím. Ve srovnání s měřením ustálené fluorescence získáváme časově rozlišenou více informací. Navíc, s pokroky v technologiích se i měření časově rozlišené fluorescence značně zjednodušuje [32].

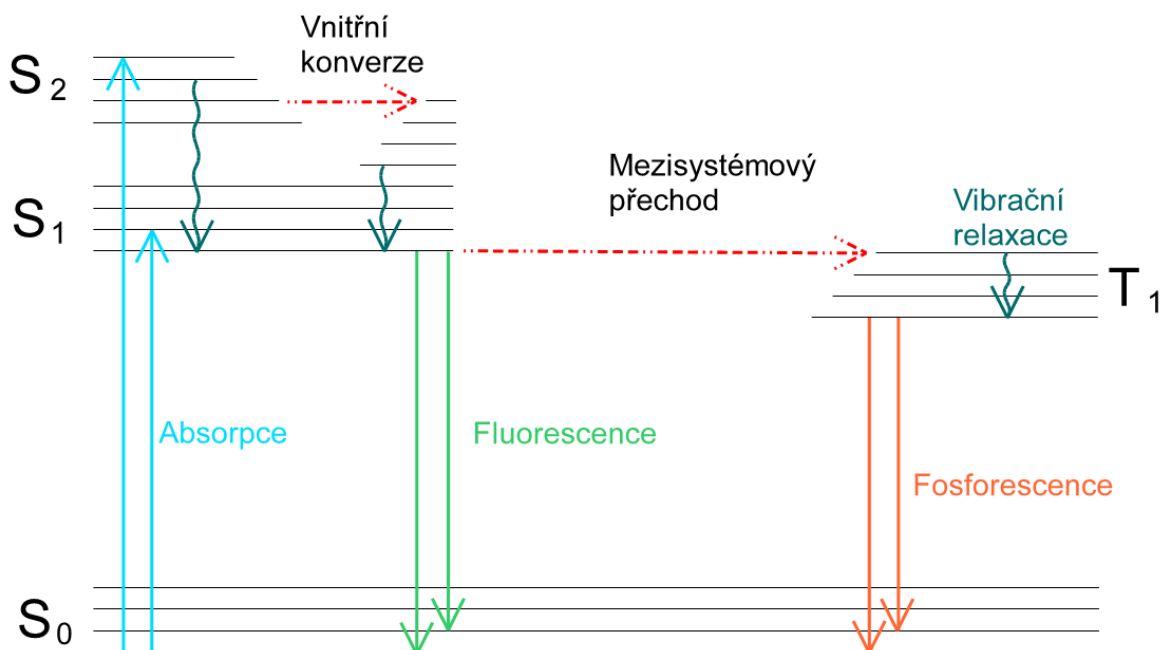
Fosforescence je emise světla z tripletového excitovaného stavu, kde oba elektrony v páru mají stejně orientovaný spin. Přechody do základního stavu jsou zakázané, a rychlost emise je pomalejší (10^3 – 10^0 s^{-1}) (viz obrázek 8). Doby života fosforescence jsou v řádech milisekund až sekund. Fosforescence obvykle nebývá vidět v roztocích o pokojové teplotě. Důvodem jsou mnohé deaktivací procesy, které konkurují emisi, jako např. neradiační rozpad a zhášení. Je třeba poznamenat, že někdy jsou rozdíly mezi fluorescencí a fosforescencí málo znatelné, např. u komplexů kovu s organickými ligandy, které vytvářejí smíšené singlet-tripletové stavy [32].

Fluorescence obvykle nastává u aromatických molekul. Typickými fluorescenčními látkami (fluorofory) jsou např. akridinová oranž, chinin obsažený v toniku, fluorescein, Rhodamin B, a jiné. Prvním objeveným fluoroforem byl chinin, u něhož je možné pozorovat jemně modrou záři při denním světle. Dále můžeme pozorovat zelenou, nebo oranžovou záři u protimrzoucích směsí do aut, kde je obsažen jak fluorescein, tak i Rhodamin B. Uhlovodíky s více aromatickými jádry, jako jsou např. anthracen a perylen také vykazují fluorescenci, emise z těchto látek se využívá pro monitorování znečištění životního prostředí ropnými látkami. Některé substituované látky také vykazují fluorescenci, např. pod zkratkou POPOP se skrývá 1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl)benzen a je využíván jako scintilační počítadlo a akridinová oranž jako další příklad se využívá nejen pro barvení DNA [32].

Na rozdíl od aromatických organických molekul jsou atomy nefluoreskující, s výjimkou lanthanoidů [37]. Spektrální údaje o fluorescenci jsou obvykle prezentovány formou emisních spekter. Fluorescenční emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence proti vlnové délce (nm), nebo vlnovému číslu (cm^{-1}). Emisní spektra různých látek se značně liší, jsou závislé na chemické struktuře fluoroforu a rozpouštědla [32].

2.6.2 Jabloňského diagram

Procesy, které se vyskytují mezi absorpcí a emisí světla, obvykle ilustruje Jabloňského diagram [38, 39]. Tyto diagramy jsou často používány jako výchozí bod pro diskusi o absorpci a emisí světla, existují v různých formách a jsou pojmenovány po prof. Alexandru Jabloňském, který je považován za otce fluorescenční spektroskopie díky svým úspěchům, a mimo jiné definoval termín anizotropie [32].



Obr. 8: Jabloňského diagram

Molekuly nacházející se ve stavu S_1 , tedy excitovaném stavu, mohou podlehnout spinové konverzi na první tripletový stav T_1 . Emise světla z tohoto stavu se nazývá fosforescencí a je posunuta k vyšším vlnovým délkám (nižším energiím) vzhledem k fluorescenci. Konverze ze stavu S_1 do T_1 se nazývá mezisystémový přechod (z angl. *intersystem crossing*). Přechod z T_1 do S_0 , který představuje základní stav, je zakázaný, a v tomto důsledku je rychlostní konstanta

pro tuto reakci řádově nižší, než pro fluorescenci. Molekuly obsahující těžké atomy, jako např. brom nebo jod, často fosforeskují. Usnadňují totiž mezisystémový přechod a posilují kvantové výtěžky fosforescence [32].

2.6.3 Stokesův posuv

Při prozkoumávání Jablůňského diagramu je zřejmé, že energie emise je nižší než energie absorpce. Fluorescence obvykle nastává při nižších energiích, jinak řečeno při vyšších vlnových délkách. Tento jev byl poprvé pozorován Stokesem v roce 1852 na univerzitě v Cambridge [40]. Tyto pokusy využívaly relativně jednoduché přístrojové vybavení. Pro ultrafialovou excitaci používali sluneční světlo a modrý skleněný filtr, který byl součástí obarveného skla. Tento filtr selektivně přenášel světlo pod 400 nm absorbované chininem. Aby dopadající světlo nedosáhlo na detektor, byl použit žlutý skleněný filtr, tehdy lahev od vína. Chinin vykazuje fluorescenci v oblasti 450 nm a je tedy snadno viditelný [32].

Roztok chininu je bezbarvý, protože absorbuje v ultrafialové oblasti. Modrou barvu vidíme pouze z oblasti blízké k povrchu, protože je roztok koncentrovaný a absorbuje všechno UV záření z prvních několika milimetrů. Stokes pozoroval vnitřní účinek filtru. Po průchodu roztokem je světlo již tak zeslabené, že nelze pozorovat modrou záři. Došlo k tomu z důvodu odstranění UV záření, a tedy oslabené světlo nemohlo dále chinin excitovat. U roztoku fluoresceinu by to možné bylo díky delší absorpční vlnové délce fluoresceinu [32].

Organická barviva jsou složena z mnoha atomů (50–100) a vykazují proto komplexní vibrační spektrum. V souvislosti s tím má fluorofor velké množství energeticky různých možností přechodu do vibračních hladin základního stavu po excitaci světlem o příslušné vlnové délce. Vzhledem k interakcím fluoroforu s molekulami rozpouštědla a tedy i solvataci, se výsledné vibrační přechody značně rozšiřují při laboratorní teplotě. Celkový posun emisního pásu fluorescence, vzhledem k poloze absorpčního pásu, v důsledku neradioaktivního rozpadu, se nazývá Stokesův posuv. Jelikož se v závislosti na excitaci mění rozložení elektronů v obalu, nastane nárůst jiných vazebných sil a dipólových momentů. Molekuly rozpouštědla zaujímají novou konfiguraci, přizpůsobí se tak během několika pikosekund [39].

Energetické rozdíly mezi excitací a emisí jsou pozorovány obecně pro většinu molekul v roztoku. Jednou z běžných příčin Stokesova posuvu je rychlý pokles do nejnižšího vibračního stavu hladiny S_1 . Kromě toho fluorofory obecně klesají na vyšší vibrační hladiny stavu S_0 , což vede k dalším ztrátám excitační energie způsobené termalizací¹ přebytečné vibrační energie. Stokesovy posuvy mohou být také způsobeny efekty rozpouštědla, interakcemi v excitovaném stavu, tvorbou komplexů nebo přenosem energie [32].

2.6.4 Doba života a kvantový výtěžek

Doba života a kvantový výtěžek jsou nejdůležitější charakteristiky samotného fluoroforu.

Kvantový výtěžek je poměr počtu emitovaných elektronů a počtu absorbovaných elektronů. Látky s největšími kvantovými výtěžky, tedy téměř jednotkovými, emitují nejjasněji. Jsou to např. rhodaminy. Doba života je také důležitá, určuje časovou dostupnost fluoroforu k interakcím s prostředím nebo difúzi v něm, a tím i informace dostupné z emise.

Pokud porovnáme dvě takřka stejné látky lišící se pouze v jednom atomu, jako je tomu např. u látek Eosin a Erytrosin B, budou vykazovat odlišné doby života a kvantové výtěžky. Obecně lze říci, že molekula obsahující těžší atom (v případě Erytrosinu B obsahuje molekula

¹ termalizace je proces, kdy se kinetická energie elektronů snaží vyrovnávat s teplotou okolí [77]

atom jodu; Eosin má na sobě navázaný atom bromu) vykazuje kratší dobu života a nižší kvantový výtěžek oproti molekule s lehčím atomem.

Doba života fluoroforu v nepřítomnosti radiačních procesů se nazývá vnitřní nebo přírodní doba života a je dána vztahem:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}, \quad (1)$$

kde Γ je rychlost emise fluoroforu.

V zásadě platí, že takovou dobu života lze vypočítat z absorpčních spekter, extinkčního koeficientu a emisních spekter fluoroforu. Zjistíme však rychlost rozpadu (radioactive decay rate), která nebere v úvahu interakce s rozpouštědlem, ani změny indexu lomu mezi absorpční a emisní vlnovou délkou.

2.6.5 Dimerizace fluoroforu a isosbestický bod

U spekter roztoků organických barviv může docházet v koncentračním rozmezí 10^{-6} – 10^{-4} M k agregaci molekul barviva, což je v podstatě deviace Lambert-Beerova zákona, jistá odchylka od ideality. Molekulární agregáty jsou makroskopické klastry molekul velikostně v rozmezí mezi krystalem a izolovanou molekulou. V polovině 30. let 20. století Scheibe [75] a nezávisle na něm Jelley [76] zjistili, že s rostoucí koncentrací barviva pseudocyaninu (PIC) ve vodě, vzniká úzký absorpční pás, což bylo později připsáno excitaci vytvořeného agregátu. K vytvoření nejjednoduššího agregátu, kterým je dimer, musí být interakce mezi dvěma molekulami barviva silnější, než všechny ostatní síly, které se vyskytují v procesu solvatace monomeru. Obvykle jsou agregáty barviv popisovány na základě pozorování spektrálních posunů absorpčních maxim vzhledem k absorpčním maximům monomerů. Pro většinu možných uspořádání dimerů se objevují dva absorpční pásy, jeden s větší energií oproti monomeru, vytváří H-typ agregátu (absorpční pás posunut hypsochromně), a druhý, s nižší energií vzhledem k monomeru, nazývaný J-typ agregátu, neboli Scheibův typ agregátu (absorpční pás posunut bathochromně) [39, 41, 42]. J-typ agregátu vykazuje lomenou nebo izotaktickou strukturu (substituenty jsou ve stejné konformaci vzhledem k hlavnímu řetězci) a obvykle vykazuje fluorescence s intenzitou vyšší, než u monomerních barviv. Je známo, že fluorescence H-typu dimerových agregátů (sendvičový typ dimeru) je silně zhasena. Ve skutečnosti, s výjimkou pár příkladů, by se mohl neemisní charakter excitovaného stavu stát uznávaným jako obecný rys H-typu agregátu.

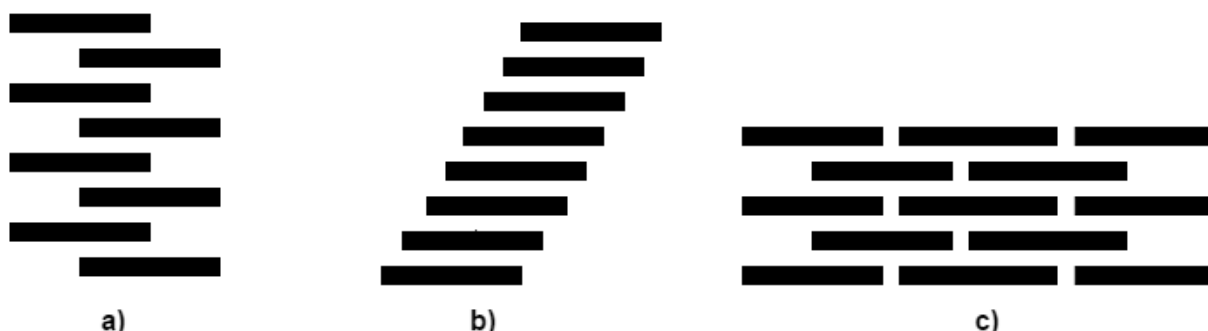
Panuje všeobecná shoda, že oba typy agregátů se tvoří skládáním jednotlivých molekul barviva na sebe, překrýváním rovin, a z toho se poté formují dvojrozměrné krystaly (viz obrázek 9).

Podle excitonové² teorie doktora Kaschi a jeho týmu [43], je v J-typech agregátů povolen pouze přechod do nižších energetických stavů excitonového pásu, což vede k faktu, že J-typ agregátu má vysoký kvantový výtěžek. V porovnání, H-typy agregátů mají velký Stokesův posuv fluorescence a malý kvantový výtěžek. Po excitaci pásu H-excitonu, dochází rychle k energetické relaxaci do nižších energetických stavů, které vykazují zanedbatelně malé dipólové momenty přechodu³. Tyto dva odlišné druhy agregátů, J-typ a H-typ se vyznačují

² Exciton je kvantum excitační energie pohybující se v periodické struktuře krystalu, je elektricky neutrální a proto jeho pohyb krystalem vede k přenosu energie, ale nikoliv náboje [44].

³ Elektromagnetická vlna může indukovat oscilující elektrický moment v molekule, který může vést až k absorpci pokud se oscilační kmitočet rovná frekvenci světla. Amplituda tohoto momentu je přechodový moment mezi počátečním a koncovým stavem [45]. Dipólový moment přechodu je kvantově mechanická záležitost. Není skutečným dipólovým momentem, ale je dán okamžitým stavem elektronového obalu molekuly.

tím, že mají odlišné úhly α mezi molekulárním dipólovým momentem přechodu a podélnou osou [39]. Jinými slovy je to úhel mezi linií vedenou středem naskládaných molekul a podélnou osou jakékoliv paralelní molekuly.



Obr. 9: Schéma skládání molekul cyaninových barviv na povrchu a v roztoku.
a) typ žebřík, b) typ schody, c) typ cihly

V závislosti na literatuře je někdy daný úhel nazýván úhlem skluzu [46]. Podle původní teorie je hraniční hodnota úhlů jiná, konkrétně pokud je $\alpha > 54,7^\circ$, tvoří se H-agregát, pokud je $\alpha < 54,7^\circ$, tvoří se J-agregát [39]. Podle druhé teorie je mezní hranice úhlu skluzu 33° , pokud je úhel menší, tvoří se J-agregát, a naopak. Excitonová teorie však platí pouze za předpokladu, že interakce mezi orbitaly zkonstituovanými molekulami jsou zanedbatelné [46]. Pokud existují interakce mezi dvěma a více molekulami v jednotce agregátu, obecně bývají pozorovány dva a více excitonových přechodů s vysokým přechodovým momentem a původní absorpční pás je rozdělen do dvou či více komponent. Toto rozdělení závisí na vzdálenosti mezi molekulami, úhlu jejich dipólového momentu přechodu s osou agregátu, úhlu dipólového momentu přechodu mezi sousedící molekulou a počtem interagujících molekul. Výskyt isosbestických bodů v absorpčním spektru s rostoucí koncentrací barviva je důkazem rovnováhy monomerních a dimerních jednotek, umožňuje vypočítat asociační konstantu, kromě spekter čistých monomerů a dimerů. Vlnové délce, při níž má více složek stejný extinkční koeficient, se říká isosbestická vlnová délka nebo isosbestický bod⁴. Když jsou v roztoku přítomny dvě absorbující sloučeniny, v absorpčním spektru se často vyskytují dva nebo více isosbestických bodů. Ve vícesložkových roztocích se isosbestické body takřka nevyskytují, protože je velmi nízká pravděpodobnost výskytu tří a více sloučenin o stejné molární absorbanci při jakékoli vlnové délce. Isosbestické body jsou užitečné při studiu rovnováhy reakcí mezi reaktanty a produkty. Přítomnost isosbestického bodu může být také využita jako důkaz, že v roztoku nejsou přítomny žádné meziprodukty [39]. Kromě tvorby dimerů dochází u některých fluoroforů (rhodaminová a oxazinová barviva) k výskytu isosbestických bodů v absorpčních spektrech po přidání aminokyseliny tryptofanu nebo DNA nukleotidu guanosinu monofosfátu, dGMP, do vodného roztoku [47, 48, 49]. Vysvětlením je fakt, že obě složky, barvivo i aminokyselina, absorbují při stejné vlnové délce a tvoří komplexy [50].

Velikost dipólového momentu přechodu udává schopnost daného stavu molekuly absorbovat nebo emitovat světlo. Směr dipólového momentu přechodu udává směr, ve kterém je světlo molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno. Molekuly přednostně absorbují záření, jehož elektrická složka kmitá ve stejné rovině, jako je absorpční dipólový moment přechodu elektronu do vyšší energetické hladiny. Molekuly přednostně emitují záření ve stejné rovině jako je emisní dipólový moment přechodu elektronu do nižší energetické hladiny [32].

⁴ Isosbestický bod je jinými slovy vlnová délka, vlnové číslo, nebo frekvence, při které se absorbance ve spektru během chemické reakce a fyzikálních změn vzorku nemění[45].

2.7 Ustálená a časově rozlišená fluorescence

Fluorescenční měření může být rozděleno do dvou typů: ustálené a časově rozlišené. Kvůli nanosekundové škále emise fluorescence je nejběžnějším typem měření ustálené fluorescence. To je charakterizováno konstantním osvětlováním vzorku a následným pozorováním. Na vzorek je svíceno kontinuálním paprskem světla a snímá se emisní spektrum [32].

Měření časově rozlišené fluorescence je druhým typem a používá se pro měření intenzitních a anizotropních křivek. Rozdíl oproti předchozímu typu je v osvětlování vzorku – zde je vzorek vystaven pulsu světla, jehož délka je kratší než doba emise. Výstupem je intenzitní křivka, která je sbírána pomocí vysokorychlostního detekčního systému schopného zaznamenat intenzitu nebo anizotropii na nanosekundové úrovni [32].

Měření ustálené fluorescence je sice jednoduché, ale instrumentace je drahá. Mnoho procesů se ztrácí během průměrování časů a není tak možné získat informace o molekule měřením ustálené fluorescence. Například anizotropní křivky fluorescenčních makromolekul jsou komplexnější než monoexponenciální výstup z ustálené fluorescence. Precizní tvar anizotropní křivky obsahuje informace o tvaru a flexibilitě makromolekuly. Z měření časově rozlišené fluorescence tedy získáváme komplexnější výsledky. Intenzitní křivky poskytují informace o konformaci makromolekul. Je možno získat biexponenciální křivku a pomocí matematické analýzy vyhodnotit, že molekula se v našem experimentu nachází ve dvou konformačních stavech [32].

2.8 Fluorescenční korelační spektroskopie

Pod zkratkou FCS se skrývá fluorescenční korelační spektroskopie, což je metoda založená na pozorování jedné nebo několika molekul. Sledované molekuly jsou průběžně posouvány difúzí do malého pozorovaného - konfokálního objemu [32, 39]. FCS tak umožňuje kontinuální pozorování po delší časová období a nevyžaduje výběr specifických molekul. Metoda je založena na analýze fluktuace intenzity fluorescence v čase, což je důsledek nějakého dynamického procesu, např. difúze z a do malého objemu, který je definovaný fokusovaným laserovým paprskem a optickou aparaturou. Když fluorofor prodifunduje do laserového paprsku, dojde k vícenásobné cyklické excitaci a následné emisi. V případě, že fluorofor difunduje z konfokálního objemu rychle ven, emise fotonů je krátkodobá. Pokud se ale šíří pomaleji, emise je delší; fotovybělování je v tomto případě potlačeno, spíše dochází k přechodu do tripletového stavu. Z korelační analýzy časově závislé emise poté můžeme určit difúzní koeficient. Časově závislá je proto, že se odkazuje na reálný aktuální čas, a nikoli na časový pokles po pulzní excitaci [39].

FCS má mnoho využití vycházejících z faktu, že kolísání intenzity fluorescence může mít za následek více procesů. Kromě translační difúze, rotační difúze a vnitřní dynamiky molekul také například mezisystémový přechod. Data jsou interpretována pomocí autokorelační funkce. K popisu procesů je zapotřebí mnoha rovnic a složitost tomu přidává i fakt, že na získaná data má ve stejný čas vliv více procesů. K získání informací o tvaru a velikosti sledovaného objemu je zapotřebí rovněž složitá teorie [32, 39].

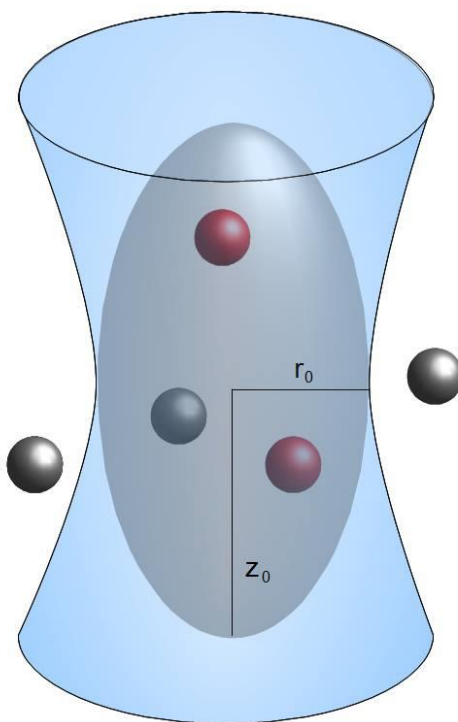
FCS byla poprvé pospána v roce 1970. Nebyla pro vědce ale atraktivní z důvodu vysokého poměru signálu a šumu, kolísání intenzity laseru, nízkých kvantových výtěžků fluoroforů a nízké účinnosti detektorů. Na rozdíl od měření intenzity fluorescence, kde se lépe měří roztoky o vyšších koncentracích, měření FCS vyžaduje malý počet molekul v objemu. Aby bylo možné pozorovat malý počet molekul, je třeba měřit zředěné roztoky, typicky kolem 1 nmol. Nežádoucí pozadí a rozptyl ze zředěného vzorku se dají odfiltrovat dobrou konfokální optickou aparaturou. Až na počátku roku 1990 se dostalo FCS řady technických vylepšení,

a tak se stalo FCS praktickou technologií. Jako detektory se začaly používat vysokoúčinné lavinové fotodiody (AP/D), dále dostalo FCS vylepšení v podobě stabilních laserů. Tím došlo k rychlému nárůstu možných aplikací. Nyní se FCS používá k pozorování DNA hybridizace, genové exprese, nebo vazeb na membránové receptory [32, 39].

2.8.1 Princip

FCS typicky měří volně difundující molekuly. Excitace se obvykle provádí pomocí laseru zaostřeného na rozhraní (diffraction-limited spot). Konfokální štěrbinina se používá k odstínění nezaostřeného signálu pocházejícího z prostředí mimo pozorovaný objem. Použitím těchto optických podmínek pozorujeme objem ve tvaru elipsoidu podlouhlého podél optické osy. Koncentrace fluoroforů musí být na rozhraní tak, aby konfokálním objemem procházelo jen několik molekul. Konfokální objem zaujímá přibližně 1 fl. Pokud je koncentrace fluoroforů 1 nmol, pak pozorovaný objem obsahuje v průměru 0,6 molekul. Jde o průměr v čase, tedy pravděpodobnost výskytu molekuly v konfokálním objemu v daný čas. Průměrný počet molekul v objemu zůstává stejný a je definován koncentrací, ovšem vlivem náhodné difúze fluoroforů může docházet k výkyvům v aktuálním počtu molekul v objemu. Kolísání počtu molekul v objemu způsobuje kolísání intenzity fluorescence [32, 39].

Na obrázku 10 je znázorněn konfokální objem s molekulami fluoroforu v excitovaném stavu (červeně) a ve stavu základním (šedě). Hodnoty z_0 a r_0 se mění v rámci použité vlnové délky laseru a v závislosti na dalších parametrech. Standardně se hodnota r_0 pohybuje okolo 100 nm a hodnota z_0 okolo 500 nm.



Obr. 10: Grafické naznačení tvaru konfokálního objemu s vyznačenými poloosami

K získání autokorelační funkce je třeba vypočítat korelaci mezi intenzitou fluorescence v daném čase $I(t)$ a v čase o něco později $I(t + \tau)$. Pokud je difúze dostatečně pomalá, hodnoty $I(t)$ a $I(t + \tau)$ se mohou rovnat. Výsledkem je autokorelační funkce $G(\tau)$, která v sobě uchovává informaci o difúzním koeficientu a počtu molekul v pozorovaném objemu. Závislost

autokorelační funkce na rychlosti difúze dělá z FCS cenný nástroj pro měření širokého rozsahu vazebných interakcí, jako např. vazba mezi proteinem a ligandem. Korelační čas τ v měření FCS křivek není závislý na době života fluoroforu [32, 39].

Důležitou částí je měření počtu difundujících molekul v pozorovaném objemu. V principu, měření nezávisí na externí kalibraci nebo kvantovém výtěžku fluoroforů, ale kalibraci provádíme použitím známých roztoků. Důležitým bodem je amplituda autokorelační funkce v čase $\tau=0$ ukazující průměrný počet pozorovaných molekul. FCS tak lze využít i pro pozorování štěpných reakcí molekul, nebo naopak agregací molekul. Pozorování tak malého počtu molekul souvisí s velkou citlivostí měření. Výkyvy intenzity fluorescence mohou způsobit molekuly přecházející do tripletového stavu, nebo strukturální změny v biomolekulách. FCS lze vylepšit pokročilými technikami a měřit tak pomocí dvou vlnových délek laserů – dvojbarevná FCS, nebo pomocí dvou laserů s odlišnou polarizací – dvojfokusová FCS [32, 39].

2.8.2 Teorie

V literatuře se může značení jednotlivých rovnic pro popis FCS lišit [t, w].

Výstupem z vyhodnocování fluktuací intenzity fluorescence, odehrávající se v malém objemu, může být statistická analýza. Jejím výsledkem je autokorelační funkce, která je definovaná jako:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1, \quad (2)$$

$$I(t) = \frac{1}{T} \int I(t) dt, \quad (3)$$

kde $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ je odchylka od průměrné intenzity, $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu v čase, I je intenzita fluorescenčního signálu, T je celkový čas a δ je okamžitá odchylka dané hodnoty [34].

Je důležité pochopit, co nám autokorelační funkce říká. Autokorelační funkce intenzity fluorescence je dána součinem intenzity v čase t , $I(t)$, s intenzitou $I(t + \tau)$ zprůměrovaná z velkého počtu naměřených dat. Sběr dat probíhá v rozmezí sekund až minut (doba měření) [32, 39]. Autokorelační funkce má své maximum pro nízké hodnoty t , poté postupně klesá k nule [34].

Časový interval τ_D , pro který má autokorelační funkce poloviční hodnotu, než má ve svém maximu, pak můžeme považovat za průměrnou dobu, po kterou se jedna molekula zdržuje v detekčním objemu.

Odchylku od průměrného fluorescenčního signálu v čase t je možné vyjádřit jako:

$$\delta I(t) = \int W(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r}, \quad (4)$$

kde integrujeme přes detekční objem. C je lokální koncentrace částic, η parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, který určuje počet fotonů detekovaný z jedné částice za jednu sekundu (závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence). $W(\mathbf{r})$ udává prostorové rozložení emitovaného světla.

Pokud budeme předpokládat, že u částic, které sledujeme, se parametr η nemění v čase a částice se pohybují volnou difuzí ve třech rozměrech, je možné odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}, \quad (5)$$

kde V_{eff} je efektivní detekční objem,

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0, \quad (6)$$

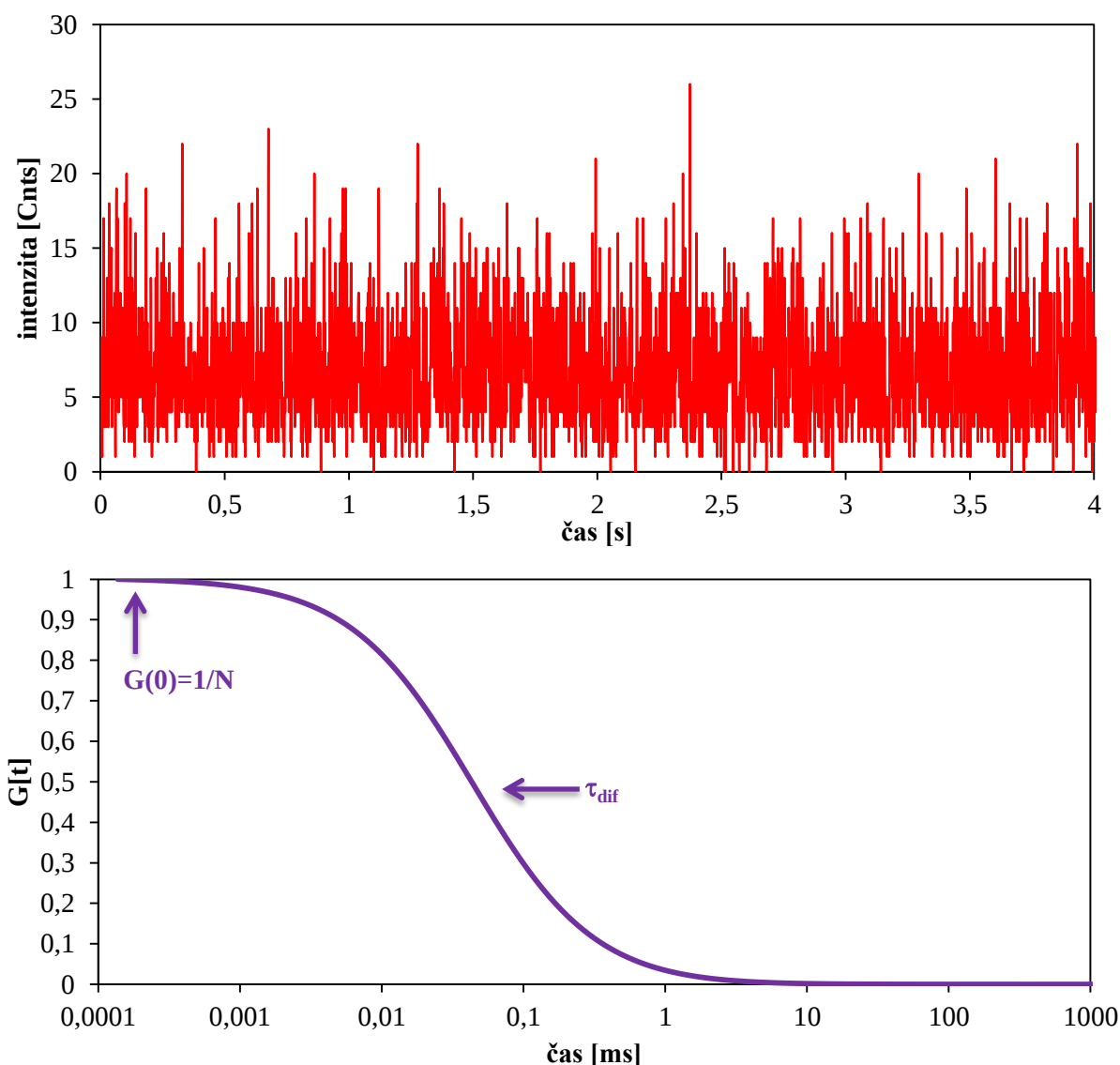
C je lokální koncentrace částic, z_0 udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu a w_0 rozměr v ohniskové rovině. τ_D je tzv. difúzní čas, parametr udávající jak dlouho se částice zdržuje v detekčním objemu, souvisí s difúzním koeficientem D fluoreskující molekuly, který je dán vztahem:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D}, \quad (7)$$

Pokud tedy naměříme fluktuující fluorescenční signál, spočítáme autokorelační funkci podle vztahu (2), proložíme ji teoretickou závislostí (5), a tak můžeme získat důležité informace o sledovaném systému: difúzní čas τ_D , který charakterizuje rychlost pohybu molekul ve vzorku, průměrný počet částic (N) v detekčním objemu:

$$N = \frac{1}{G(0)} = V_{eff} \langle C \rangle, \quad (8)$$

a pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme určit difúzní koeficient a koncentraci dané látky [34].



Obr. 11: Časový záznam fluktuace intenzity signálu a autokorelační funkce s vyznačeným inflexním bodem reprezentujícím difúzní čas a vztahem, kdy se počáteční hodnota autokorelační funkce rovná převrácené hodnotě počtu molekul v konfokálním objemu

2.8.3 Tripletní stav

Musíme také uvažovat změnu parametru η , což znamená, že molekula může přejít do tripletního stavu, ve kterém nemůže vyžářit foton, a v grafu se objeví tmavé úseky [34].

Tento přenos je kvantově zakázán a chromofor potřebuje mnohem delší čas k návratu do základního stavu. Mezisystémový přechod si můžeme představit jako sérii tmavých intervalů přerušujících kontinuální emisi fluorescence molekuly [51].

Tvar autokorelační funkce se tedy změní, ale pomocí matematických modelů umíme tyto děje oddělit [34].

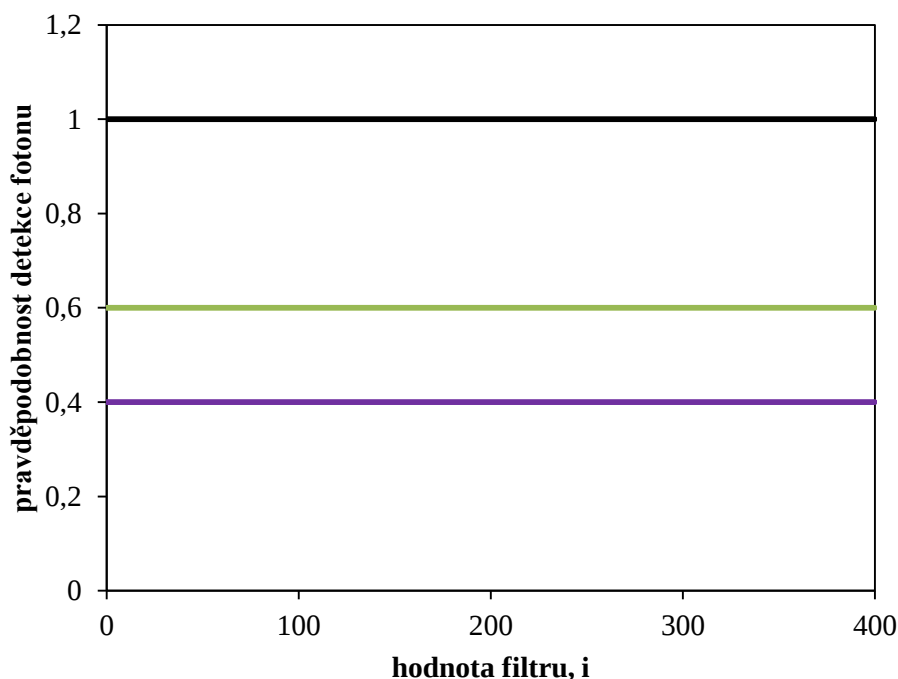
2.8.4 Časově rozlišená FCS

Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS-Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) využívá spojení dvou metod: FCS a TCSPC (časově rozlišeného čítání fotonů). Umožňuje rozlišit ve směsi fluorofory s různou dobou života. Lze tak získat autokorelační funkci jednotlivých fluoroforů i jejich kroskorelaci.

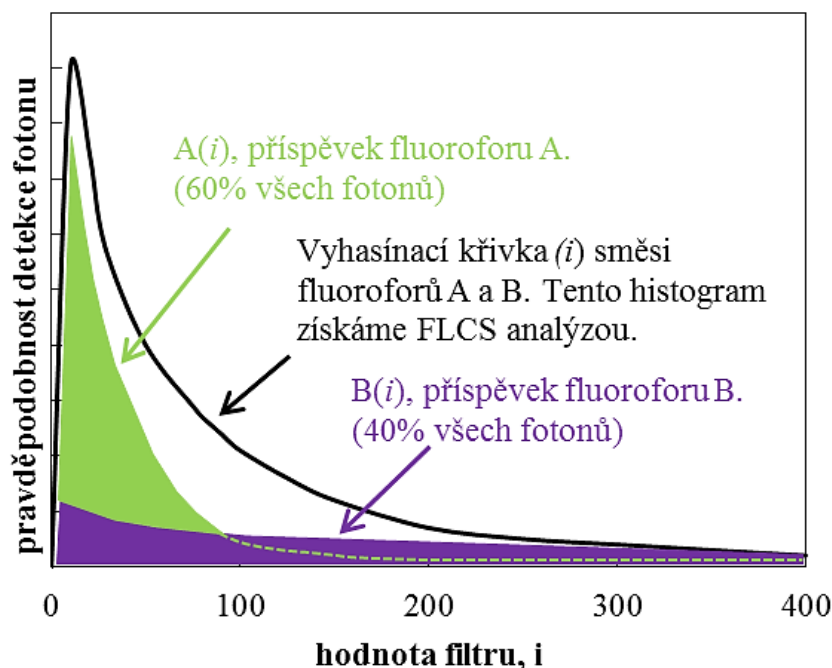
Pokud vzorek obsahuje např. dva odlišně difundující fluorofory, oba přispívají k detekované celkové intenzitě a výsledná autokorelační funkce je komplikovaně překrývaná, nikoliv lineární. S přihlédnutím k všudypřítomnému tripletovému stavu, rozptýlenému světlu, nečistotám, atd., je analýza autokorelační funkce složitá z důvodu mnoha možných nastavitelných parametrů při vyhodnocování. Řešení autokorelační funkce je komplexní. K získání FLCS dat je třeba pulzní excitace a dva nezávislé časy pro každý foton přicházející na detektor [52]. „Makročas“, který zaznamenává polohu registrovaného fotonu na kontinuální časové ose od začátku experimentu, a „mikročas“, který udává, jaká doba uplynula mezi posledním laserovým pulsem a zaregistrováním dalšího fotonu. Makročas je měřen s přesností v řádu sto nanosekund, mikročas s přesností v řádu desítek pikosekund. V makročase se projeví difúze molekul, přechody do tripletního stavu apod. Hodnota mikročasu nám poskytuje informace o průběhu dohasínání fluorescence fluoroforu, ze kterého byl daný foton emitován [52, 53].

Příkladem může být vzorek se dvěma fluorescenčními komponentami, A a B, které mají různou dobu vyhasínání. Je předpokládáno, že 60% všech fotonů zachycených během FCS experimentu je emitováno sloučeninou A a zbylé fotony patří sloučenině B.

V případě kontinuální excitace (viz obrázek 12a) je 60% pravděpodobnost, že každý detekovaný foton patří sloučenině A. Pravděpodobnost vzniku je konstantní v čase, jelikož není definován čas excitace. FLCS je založena na jednoduchém faktu, že s pulzní excitací se pravděpodobnost vzniku detekovaného fotonu mění v čase, protože A a B vyhasínají rozdílně (viz obrázek 2b) [52].



Obr. 12 a: Kontinuální excitace. V tomto časovém měřítku je pravděpodobnost jejich vzniku konstantní.

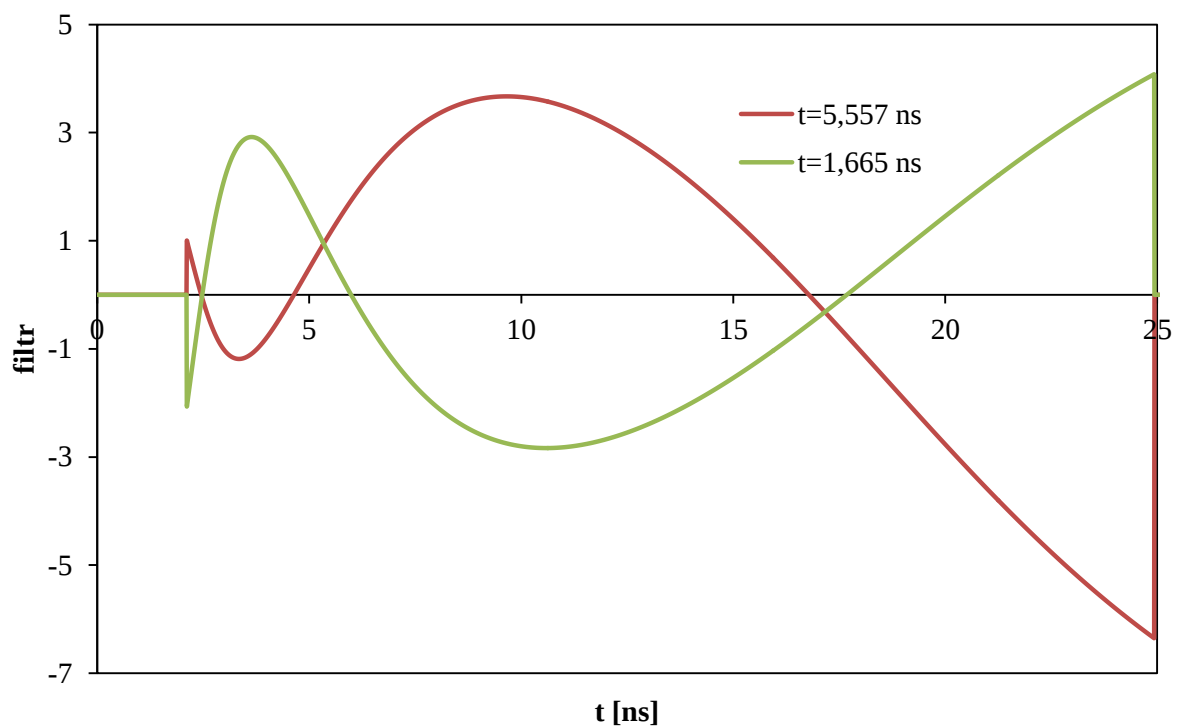


Obr. 12 b: Pulzní excitace. Většina fotonů má nejednoznačný původ. Nicméně, relativní pravděpodobnost vzniku se mění v průběhu vyhasínání a díky filtrům může být ro každý jednotlivý foton určena zvlášť.

Nyní zbývá vysvětlit jak využít pravděpodobnost vzniku k výpočtu autokorelační funkce vybrané komponenty.

Tvar A a B histogramů může být získán z nezávislých TCSPC měření, nebo analýzou vyhasínací křivky. Pokud normalizujeme křivky A a B do jednotkové plochy, pak se budeme odkazovat na tuto plochu jako na model vyhasínání. Je zjevné, že vyhasínací křivka směsi A a B může být vyjádřena jako lineární kombinace, kde dané amplitudy budou náležet jednotlivým komponentám A a B [52].

Použitím statistických filtrů vzniknou ze signálu celého vzorku dva oddělené signály. Jejich intenzity fluktuují v čase a můžeme z nich spočítat autokorelaci jednotlivých komponent, i kroskorelaci mezi nimi. Statistické filtry jsou funkcemi vyhasínacích křivek jednotlivých komponent. V klasické FCS analýze každý foton přispívá stejnou měrou a výpočty zahrnují pouze jedničky a nuly. U FLCS je o jeden krok více – vyhledávání hodnoty filtru odpovídající číslu kanálu. Je třeba si všimnout, že filtry nejsou integrovány, mohou tedy zasahovat do záporných hodnot. Avšak součet hodnot filtrů je vždy 1 [52].



Obr. 13: Ukázka FLCS statistických filtrů pro jednotlivé doby života

Statistické filtry se používají u vzorků se dvěma a více fluorofory, nám ale slouží k odlišení prostředí, ve kterém se nachází jeden fluorofor. Můžeme tak sledovat oddělené signály a získat bližší informace o mechanismu změny prostředí [54].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Hyaluronan a FCS

V nádoru dochází k nadměrné expresi enzymu hyaluronidázy, což se vědci snaží využít právě k detekci rakoviny. Fluorescenční korelační spektroskopie se jeví jako vhodný detekční nástroj. V případě označení hyaluronových makromolekul fluorescein aminem docházím k samozhášení fluorescence. V přítomnosti hyaluronidáz je hyaluronan štěpen na malé, fluorescenčně značené části a samotné štěpení se projevuje zrychlenou difúzí, zvýšením koncentrace fragmentů a nárůstem intenzity fluorescenčního signálu. V článku **R. Riche a spol.** byly měřeny všechny tyto tři jevy pomocí FCS, a to jako funkci času a koncentrace hyaluronidázy. Výhodou je velmi malá spotřeba hyaluronového substrátu [55].

Jako ultrasenzitivní a neinvazivní způsob detekce jedné molekuly v živém systému a v reálném čase také označila **V. Vukojevič** a její tým fluorescenční korelační spektroskopii. Ve svém článku poukazuje na využitelnost FCS při získávání informací o živých systémech, jako je např. komunikace mezi buňkami, konkrétně zkoumání shlukování apoptotických buněk usmrcených peroxidem vodíku. Tyto shluky se vytvářely, pokud v jedné okolní buňce došlo k cílenému usmrcení odstraněním růstových faktorů nebo při expresi proteinu p53, tedy nádorového supresoru. Pomocí FCS zjistili, že poločas rozpadu látek způsobujících buněčnou smrt je v řádu sekund, což je ale zároveň doba potřebná na přestup této látky přes buněčnou stěnu a vstup do buňky sousední. Tento mechanismus inhibují enzymy katalázy, které štěpí peroxidy. Autoři tedy ověřili fakt, že peroxid vodíku extracelulárně signalizuje buněčnou smrt. Pomocí FCS lze také pozorovat aktivity receptorů, charakterizovat fyzikálně-chemické vlastnosti vnitřního prostoru buňky a interakce mezi receptorem a ligandem [56].

Německý tým pod vedením **H. Zettla** zkoumal difúzi fluorescenčně značeného polymeru polystyrenu v širokém rozsahu koncentrací a molekulových hmotností. Jako fluorescenční sondu použili Rhodamin B a značení si prováděli ve vlastní laboratoři couplingovými reakcemi. Mobilita řetězců se začala snižovat při jedné konkrétní hodnotě koncentrace, která tvoří přechod mezi zředěnými a polozředěnými režimy, a při této koncentraci se začínají řetězce překrývat. Pro excitaci použili laser 514 nm a měření prováděli ve speciální komoře na vzorky, uzpůsobené tak, aby se jim neodpařovalo organické rozpouštědlo, ve kterém byl rozpuštěn polymer. Autoři potvrdili fakt, že ve zředěném režimu se dá pracovat i s velmi malými koncentracemi, aniž by byla ohrožena správnost a opakovatelnost výsledků. Co se týče měření v oblasti přechodové koncentrace, tak doposud chyběly výsledky ze širšího rozsahu molekulových hmotností. Díky FCS se tomuto týmu podařilo získat data pro široký rozsah molekulových hmotností a jejich věrohodnost potvrdili s teoretickými výpočty. Autoři hodnotili, zda experimentální stanovení dat z FCS odpovídá právě těmto teoretickým výpočtům, které byly ústředním tématem článku [57].

Podobnou tematiku, ale s různě koncentrovanými roztoky polyvinylalkoholu, zpracoval tým **A. Michelman-Ribeiry** z Marylandu, který si pro svá měření vybral různé fluorescenční molekuly, proteiny a polymery tak, aby pokryl celou škálu molekulových hmotností a velikostí. Vzdálenost mezi dvěma řetězci polymerů označili jako korelační délka a zjistili, že u molekul větších, než je tato korelační délka, dochází k exponenciálnímu poklesu difúzního koeficientu v závislosti na koncentraci, což vysvětlují jako potvrzení Stokes-Einsteinovy rovnice, podle které exponenciálně s viskozitou klesá difúzní koeficient. U molekul, které jsou menší, než korelační délka, Stokes-Einsteinovu rovnici použít nelze, prokládali proto data stretch-exponenciálními křivkami, kde zavedli koeficienty právě

pro dané velikosti molekul. Jako sondy používali 5–karboxytetramethylrhodamin, Alexa 546 a Rhodamin 6G a dále těmito molekulami označené proteiny. Autoři také použili přírodní fykobiliprotein a další barvivo (R)–fykoerythrin, které extrahovali z cyanobakterií a eukaryotických řas. Vzorky byly excitovány lasery o vlnových délkách 543 a 473 nm. Potvrdili tedy využitelnost FCS jako nástroje pro charakterizaci zředěných a polozředěných roztoků polymerů [58].

3.2 Akridinová oranž

Akridinová oranž patří do skupiny akridinových barviv. Díky své struktuře absorbuje záření. Přebytek energie účinně prochází aromatickým kruhem, rozdělí se mezi jeho vazby. AO zůstává v kationtové formě AOH^+ při pH pod 10, nad tuto hodnotu je molekula zcela deprotonovaná [59]. Bazické formě molekuly je přijetím protonů umožněn prostup membránou některých buněk, zpětná cesta je nemožná, proto protonovaná forma zůstává v buňce a způsobuje tam lokální kolísání koncentrace iontů [59].

Akridinová oranž, ve formě *N, N, N', N'*-tetramethylakridin-3,6-diamin hydrochloridu je používána jako sonda pro studium biologických a mikroheterogenních systémů, jako jsou micely, mikroemulze, DNA a nukleosidy, stejně jako se používá k vizualizaci biologických kompartmentů a měření pH gradientu v membránách. Všechny tyto aplikace spoléhají na fotofyzikální a fotochemické vlastnosti této sondy, které silně závisí na povaze okolního prostředí [60–63]. Chování vodného roztoku akridinové oranže je předmětem spousty zkoumání a experimentů. Velmi oblíbeným tématem je také dimerizace tohoto barviva [64–65], a zvláště pak unikátní vlastnost dimeru zhaset fluorescence. Zkoumají se také proteiny [65].

Vliv DMSO na vodný roztok bazické akridinové oranže zkoumal tým **S. Markariana**. Bylo zjištěno, že široký koncentrační rozsah roztoků DMSO má vliv na absorpční a fluorescenční spektra fluorescenční sondy. Vodný roztok akridinové oranže vykazuje dva absorpční pásy. Jeden při 468 nm odpovídá dimerové formě a druhý při 490 nm patří monomerní formě. V roztoku DMSO je pás při 490 nm potlačen a vytváří se nový pás při 428 nm. Tento odpovídá deprotonované, základní formě akridinové oranže. Pomocí ustálené fluorescence (steady-state) byly vypočítány stokesovy posuny absorpčních a fluorescenčních pásů a byla také pozorována zvýšená intenzita fluorescence u roztoků v DMSO ve srovnání s roztoky ve vodném prostředí. Bylo zjištěno, že přítomnost DMSO znemožňuje interakci akridinové oranže s molekulami vody. Z tohoto důvodu roste koncentrace volné akridinové oranže a zároveň klesá koncentrace protonované formy. DMSO se tak stal citlivým senzorem pro pozorování hladin protonované a deprotonované formy akridinové oranže [64].

Dopad micel na chování akridinové oranže ve vodném roztoku zpracoval v experimentu tým **F. Wanga**. Prvním faktem tohoto článku je, že přítomnost tenzidu zhasí fluorescence vodného roztoku akridinové oranže. Druhým faktem je, že tato vlastnost lze potlačit přidáním proteinu, v tomto případě hovězího sérového albuminu. Předpokládá se, že přítomnost tenzidu dodecylbenzelsulfonátu sodného způsobuje tvorbu dimeru akridinové oranže a tím pak zhasení fluorescence. Po přidání albuminu dochází ke vzniku inverzních micel a tím narušení podmínek pro vznik dimeru. Některé dimery se rozpadnou na monomery a zbytkové dimery se pomocí hydrofobních a elektrostatických sil usadí v klastru tvořeném směsí tenzid-protein a vytvoří tak velký asociát. Interakce mezi proteinem a malou molekulou byla zkoumána pomocí fluorescence. Tato kombinace může být modelovým systémem pro řízenou distribuci léčiv, popřípadě lze najít využití v kosmetice [65].

Tým z **Fakulty chemie a chemického inženýrství při univerzitě Guangxi v Číně** zkoumal zhášení fluorescence v systému dvou barviv a Matrinu, což je alkaloid přítomný v rostlině Jerlín (*Sophora flavescens*). Tento alkaloid má mimo jiných farmakologických účinků také protirakovinné účinky – inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu. Tým zjistil, že fluorescenční barvivo Alizarinová červen (AR) mírně zhasí fluorescenci akridinové oranže (AO) v roztoku AR/AO při pH mezi hodnotami 5 a 6 a tohoto faktu využil při stanovování hladiny Matrinu ve vodném roztoku v reálném čase a in-situ, tedy přímo v roztoku. Vytvořili tak nástroj pro detekci Matrinu, a to velmi rychlý, přesný, a levný [66].

Tvorbu dimerů akridinové oranže zkoumal tým **J. Bhattacharjee** z Indické univerzity Tripura. Autoři vytvořili vrstevnatý film, kde převažovaly dimerní formy nad monomerními. Kontrola tvorby dimerů a H-typu agregátů probíhala pomocí nanodestiček z laponitu – syntetického jílu. Pomocí UV-VIS spektroskopie potvrdili, že se zvyšující se koncentrací AO se zvyšuje i tvorba dimerů v roztoku AO. V případě filmu byl ve spektru nalezen majoritní pík dimeru a minoritní pík odpovídající monomeru. Také bylo potvrzeno, že přítomností nanodestiček laponitu lze přímo řídit tvorbu H-dimeru AO [67].

Japonský tým pod vedením **K. Kusuzakiho** zjistil další aplikaci akridinové oranže, konkrétně ve formě zinečnaté soli, v nádorové terapii. Byla prokázána jedinečná biologická aktivita akridinové oranže, a byla prokázána také funkce AO jako fotosenzibilizátoru. AO se dle autorů dá využít i jako protinádorové a antimalarické léčivo a detektor bakterií a parazitů. V chirurgii používali tuto sondu v kombinaci s foto a radioterapií na sarkomy. Výsledky prokázaly, že akridinová oranž poskytla lepší lokální kontrolu a výrazně lepší funkci končetiny, než při klasickém chirurgickém zákroku. AO se hromadí zejména v lysozomech, obecně v kyslejších místech buňky. Energie fotonů z viditelného světla nebo z rentgenových paprsků excituje AO a ta následně emituje fluorescenci a vytváří aktivovaný kyslík z intracytoplasmatického prostoru. Aktivovaný kyslík ničí lysosomy, a spolu s uvolněnými enzymy způsobuje rychlou smrt nádorových buněk. Pro porovnání, normální zdravé buňky vylučují AO rychle, protože nemají tak nízké pH [68].

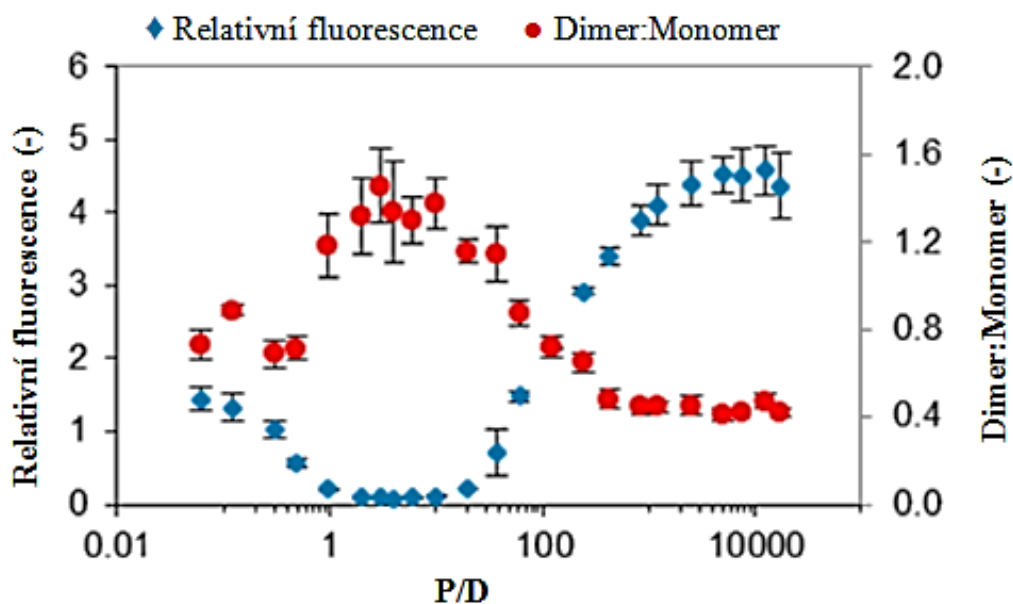
Absorpční spektra akridinové oranže zkoumal **M. Lamm** v neurochemické laboratoři v Marylandu v roce 1965. Příprava roztoků pro měření byla poměrně složitá, nejprve po převedení AO do roztoku titrovali tento roztokem NaOH, výslednou suspenzi filtrovali, vymyli zbytkové soli, usušili a znovu rozpustili v methanolu. Pomocí směsi kyseliny chlorovodíkové a methanolu v poměru 1:9 bylo sníženo pH a barvivo bylo následně vysušeno. Jelikož hlavním problémem u AO je adsorpce z roztoku k různým materiálům, byly použity Pyrex sklo, silikonované sklo, sklo vystavené kyselině fluorovodíkové, teflon, polypropylen a polyethylen. Jako nejlepší volba byly zvolené polyethylenové kontejnery. Bylo zjištěno, že AO se neřídí Lambert-Beerovým zákonem. Se zvyšující se koncentrací roztoku AO se zvyšuje pík v absorpčním spektru patřící dimeru (≈ 470 nm) a zároveň roste jeho poměr ku píku patřícímu monomeru. Tento jev je charakteristický pro metachromatická barviva (barvící v různých odstínech podle pH). Při 470 nm se vyskytuje isosbestický bod [69].

Dimer akridinové oranže zkoumali také v Číně, pod vedením **L. Yunjinga**. Vytvářeli nefluoreskující dimer in situ za přítomnosti povrchově aktivní látky, dodecylsulfonátu sodného (SDS). Poté značili proteiny tímto dimerem (AOAO) a zjistili, že takto vytvořená sonda má fluorescenční aktivitu, ve srovnání s AOAO. Vytvořili tak novou, citlivou fluorescenční sondu pro stanovení proteinů. Konvenční metoda stanovení proteinů v lidském

séru je pomocí barviva Comassie Brilliant blue (CBB), ovšem nová sonda s dimerem vykazovala mnohem větší citlivost, větší lineární rozsah, a obecně větší detekční limity [70].

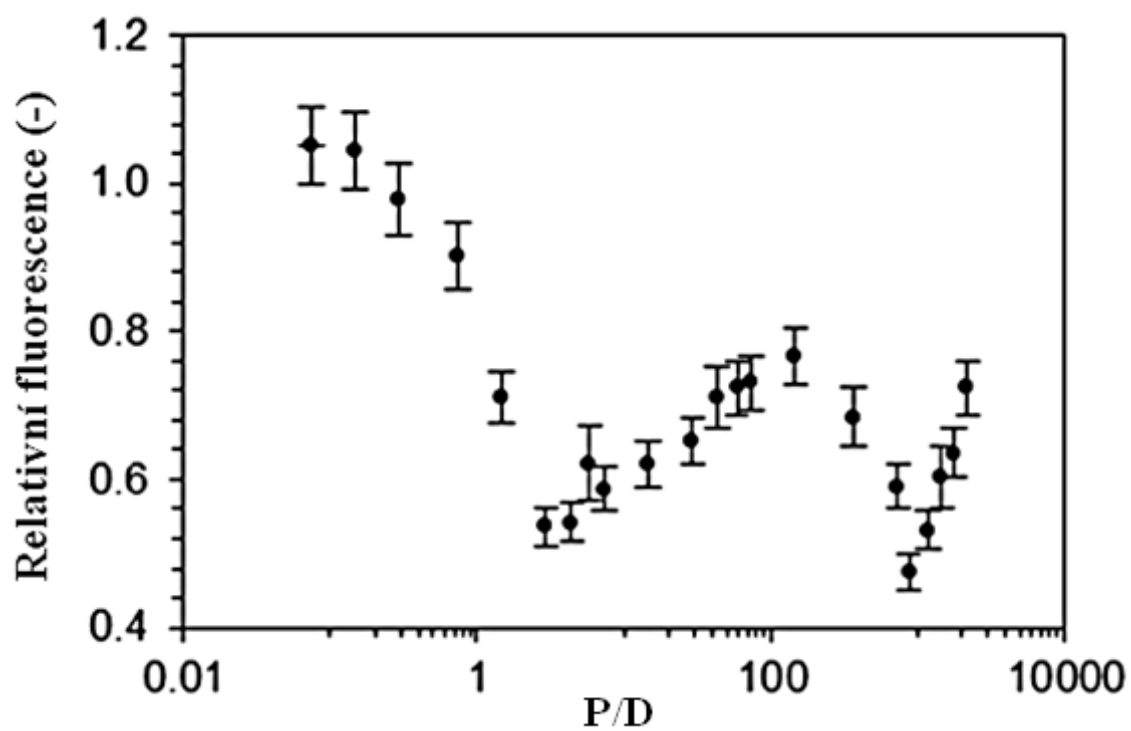
Několik článků zkoumá zvláštní chování některých barviv nesoucích náboj při navazování na polyelektrolytovou matici [79, 80], či konkrétně vazbu akridinové oranže na biopolymery [80]. Další studie se týkají vazeb akridinové oranže na syntetické polyelektrolyty [14, 71]. Syntetické polyelektrolyty vykazují velmi vysokou ochotu vázat k sobě barvivo, ale samotné navázání bylo potvrzeno až při vysokých hodnotách P/D, tedy molárnímu poměru polymeru (P) a barviva (D).

Největší podíl na problematice diplomové práce má článek z fakulty chemické v Brně, pod vedením **F. Mravce** o studiu dimerizace akridinové oranže v prostředí polymerů hyaluronanu sodného a polystyren sulfonátu sodného. Mimo jiné byla zkoumána intenzita fluorescence v závislosti na molárním poměru počtu vazných míst polymeru a počtu vazných míst barviva, tzv. poměr P/D. Oba použité polymery mají na molekule jedno vazné místo, u hyaluronanu jde o karboxylovou skupinu, v případě polystyren sulfonátu sodného pak o sulfonovou skupinu. Molekula akridinové oranže má kladný náboj na jednom heteroatomu a tudíž taky jedno možné vazné místo v případě takto myšleného experimentu. Experimentálně bylo zjištěno, že pokud je polymerem hyaluronan a pokud je poměr P/D = 3, pak nastává jakýsi bod ekvivalence, tedy stav, kdy maximum možných přístupných míst v závislosti na koncentraci polymeru je obsazeno molekulami akridinové oranže. V tomto případě je intenzita fluorescence nejnižší, což je vysvětleno faktem, že dochází k dimerizaci fluoroforu, přičemž dimer AO nevykazuje fluorescenci.



Obr. 14: Poměr relativní fluorescence a absorbance (D:M) monomeru a dimeru akridinové oranže v systému s PSS. Jako bod zájmu byla vybrána hodnota P/D = 2 a 200. V bodě 2 dochází k rapidnímu poklesu intenzity fluorescence a v bodě 200 dochází k bodu ekvivalence [72].

Samotná dimerizace byla ověřena použitím druhého polymeru, polystyren sulfonátu sodného, v jehož přítomnosti dimer AO fluorescenci vykazuje. Na základě tohoto zdroje bude předmětem diplomové práce doplnění dat pomocí metody FCS [72].



Obr. 15: Závislost relativní intenzity fluorescence v závislosti na poměru P/D v systému akridinové oranže a hyaluronanu. Bod zájmu v případě tohoto systému byl zvolen při $P/D = 2$ a 200 [72].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Hyaluronan sodný	HySilk, Lot# 160708-E1; $M_w = 300$ kDa, CPN spol. s r. o.
Polystyren sulfonát sodný 1 MDa	Sigma Aldrich, CAS 25704-18-1; Lot#MKAA1218V
Polystyren sulfonát sodný 70 kDa	Sigma Aldrich, CAS 25704-18-1; Lot#BCBF6120V
Akridinová oranž hydrochlorid hydrát	Sigma Aldrich, CAS:65-61-2; Lot#MKBP6198V
Rhodamin 6G	Sigma Aldrich, CAS 989-38-8; Lot# MKBF7515V
Voda	Miliphore: Mili-Q; Purelab: ELGA
Chondroitin sulfát sodný	Fluka, CAS 12678-07-8; Lot# 345668/1

4.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků

4.2.1 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Roztok fluorescenční sondy akridinové oranže byl připraven rozpuštěním navážky ve vodě. Do čistých LDPE polyethylenových kontejnerů byla navážena přibližná hmotnost látky a pipetován přibližný objem vody. Jelikož pro měření jsou požadovány velmi nízké koncentrace, skutečná hodnota koncentrace byla vždy následně ověřena spektrofotometricky. Z takto připraveného zásobního roztoku bylo pro každé měření pipetováno požadované množství do nové nádoby a doplněno rozpouštědlem (voda, polymer) tak, aby výsledná koncentrace sondy byla cca 10^{-8} M. V případě Rhodaminu 6G bylo použito laboratorní sklo místo LDPE kontejnerů.

4.2.2 Příprava zásobního roztoku polymeru

Příprava roztoku polymeru byla provedena standardním způsobem, a to rozpuštěním navážky ve vodě. Byly použity klasické skleněné skladovací nádoby Pyrex, do kterých bylo naváženo potřebné množství polymeru a doplněno vodou tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace.

4.2.3 Příprava vzorku pro měření difúzních křivek

Do celkového objemu 10 ml bylo napipetováno vždy 100 μ l fluorescenční sondy o koncentraci 10^{-7} M, požadovaný objem polyelektrolytu tak, aby bylo dosaženo zvoleného poměru P/D a doplněno na celkový objem vodou.

Výpočet požadovaného objemu polyelektrolytu:

$$n_{Rh} = c \cdot V = 1 \cdot 10^{-7} \cdot 1 \cdot 10^{-4} = 1 \cdot 10^{-11} \text{ mol}$$

Pokud zvolíme P/D = 1000, pak

$$n_{PSSS} = 1000 \cdot n_{Rh} = 1000 \cdot 1 \cdot 10^{-11} = 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$$

Skutečná koncentrace polyelektrolytu ve zvoleném objemu 10 ml bude následující:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{1 \cdot 10^{-8}}{0,01} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

Přepočet na hmotnostní koncentraci:

$$\rho' = c \cdot 206 = 1 \cdot 10^{-6} \cdot 206 = 2,06 \cdot 10^{-4} \text{ g/l}$$

Požadovaný objem polyelektrolytu:

$$V = \frac{V_{celk} \cdot c_{zás}}{\rho'} = \frac{9850 \cdot 1 \cdot 10^{-6}}{2,06 \cdot 10^{-4}} = 47,8 \mu l$$

4.3 Použité přístroje

Tabulka 2: Seznam použitých přístrojů

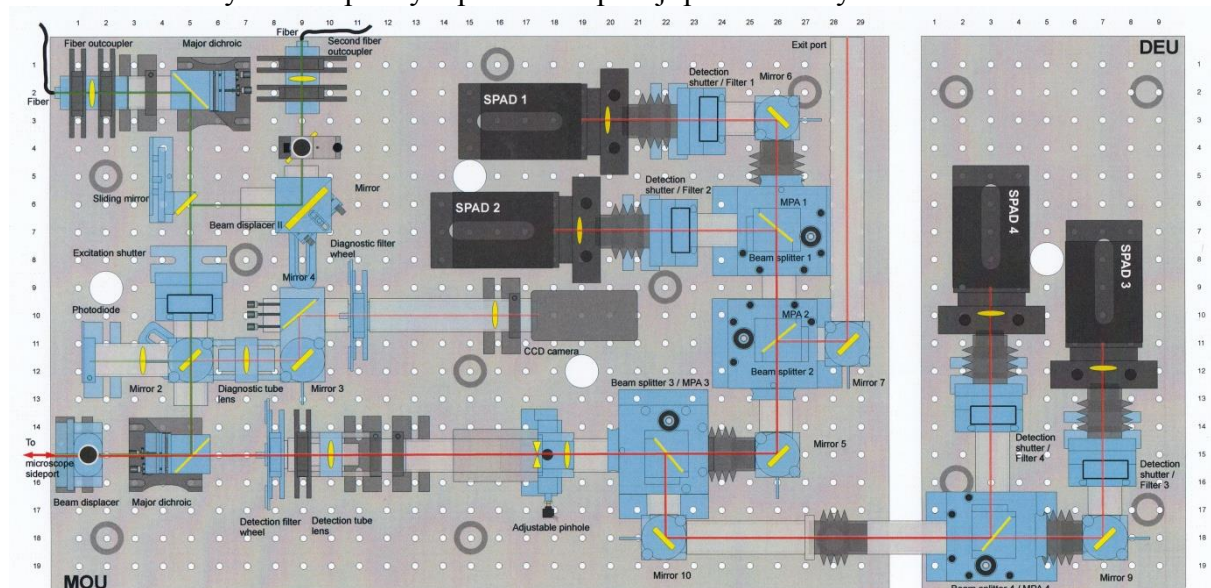
Analytické váhy	Denver instrument
Automatické pipety	Biohit ,Finnpipette, Vitrum
Magnetické míchadlo	Heidolph MR Hei-Standard
Mikroskop s fluorescenční korelační spektroskopií	MicroTime 200, PicoQuant

4.3.1 FCS

Tabulka 3: Přehled použitých laserů a dalších výměnných optických prvků pro jednotlivé fluorescenční sondy

	AO	Rhodamin 6G
laser	470 nm	510 nm
dichroické zrcadlo	405/465	514/640
emisní filtr	520/35	550/49

Úzký svazek monochromatického záření prochází sérií zrcadel, kde dochází k dělení paprsku v poměru 10:90, kdy 90% putuje na kameru a 10% pokračuje dále do optického prostoru mikroskopu, kde dopadá na vzorek. Zde dochází k excitaci vzorku a excitační světlo je dále pomocí filtru odváděno mimo detekční prostor. Emisní záření je pomocí optických prvků přiváděno na dichroické zrcadlo, které propouští pouze vlnovou délku emise a ostatní vlnové délky jsou odraženy. Následujícím optickým prvkem je emisní filtr, který vybírá část spektra a určuje tak buď spodní limit propouštěných vlnových délek, nebo určuje obě hranice spektra. Světlo dále putuje do optické šterbiny, kde dochází k odstínění nezaostřeného záření a na detektor díky těmto optickým prvkům dopadají pouze fotony ze zaostřené oblasti.



Obr. 16a: Schéma měřicího přístroje s naznačením možných průchodů laserových paprsků.



Obr. 16b: Ukázka přístroje MicroTime 200

Na tomto přístroji byla prováděna veškerá měření difúzních vlastností. Systém přístrojů pro měření metodou fluorescenční korelační spektroskopie sestává z inverzního mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačních zdrojů a elektroniky firmy PicoQuant (PicoQuant GmbH) a skeneru se sub-nanometrovým rozlišením firmy Physik Instrumente (Physik instrumente GmbH). Systém používá jako excitační zdroje pulsní laserové diody o frekvencích 90, 64, 50 MHz a vlnových délkách 375, 470, 510 a 640 nm.

Měřicí soustava obsahuje čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z nich jsou zastoupeny detektory typu τ -SPAD se šumem nepřekračujícím $100 \text{ cnts} \cdot \text{s}^{-1}$ a dva zbylé představují detektory MP/D-SPAD se šumem pod $250 \text{ cnts} \cdot \text{s}^{-1}$.

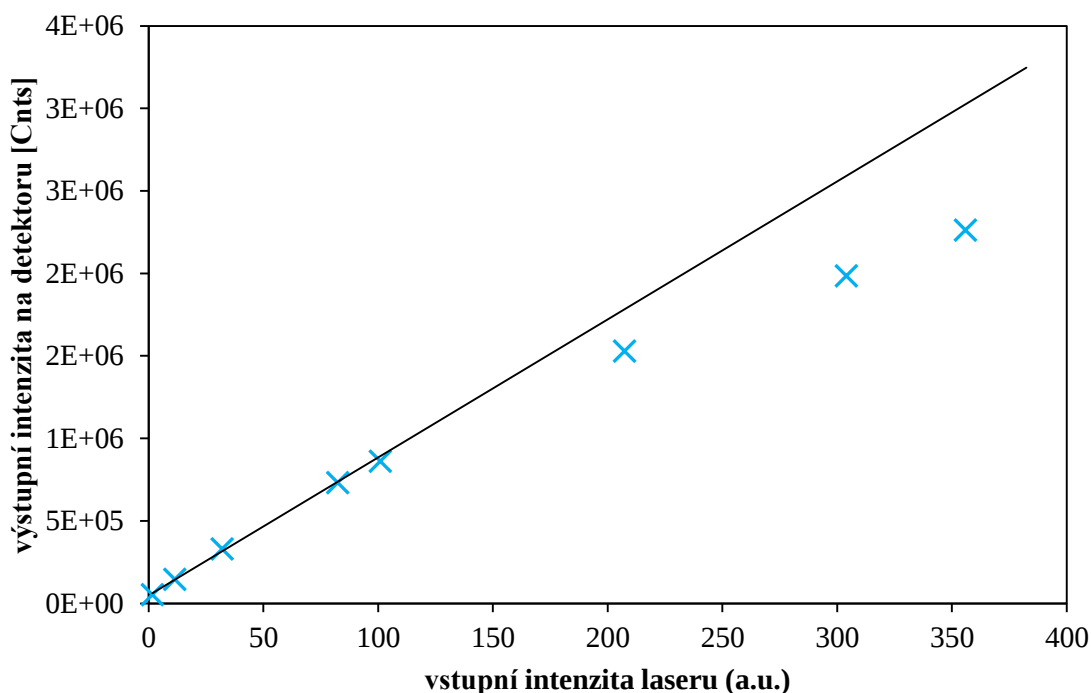
Pro experimenty byla použita následující konfigurace: excitační zdroj 470, 510 nm a frekvence pulsů laseru 40 MHz, ultraplanapochromatický objektiv UPLSAPO 60 XW s vodní imerzí, dichroické zrcadlo odrážející excitační vlnovou délku a propouštějící emisní vlnovou délku, emisní filtry (HQ520/35, 550/49), detektory τ -SPAD 2 a MP/D-SPAD 3,4.

4.4 Vlivy na měření

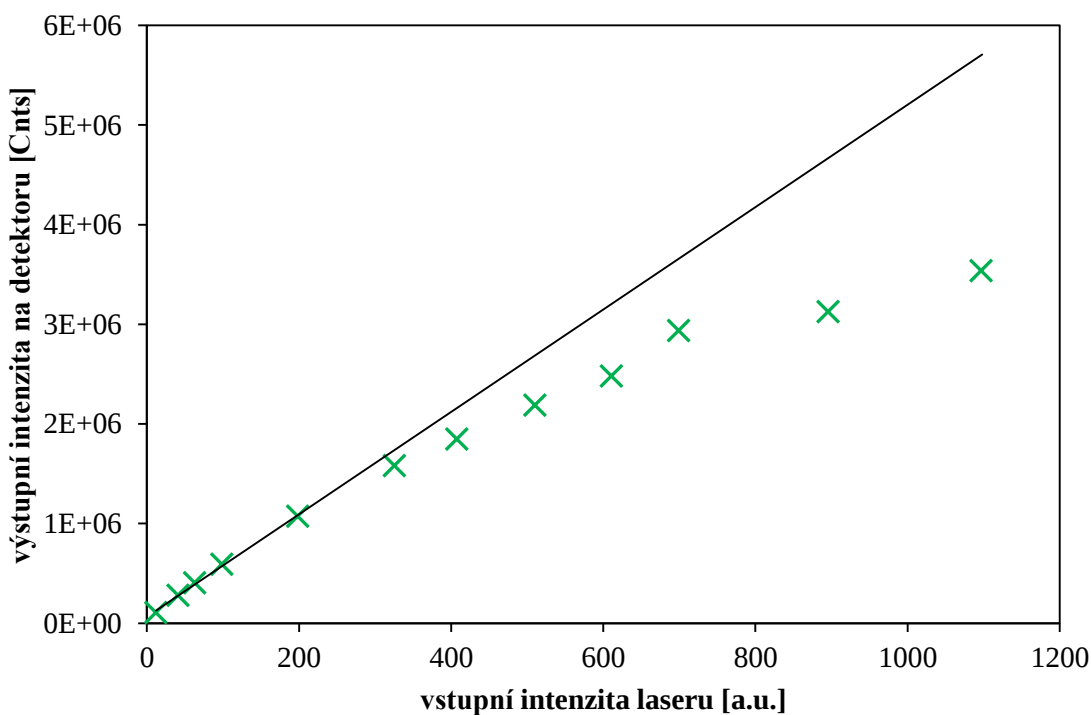
Veškeré výsledky se odvíjejí od mnoha parametrů. Doba měření zůstávala ve všech experimentech stejná, a to 5 minut. Tato doba je dostatečná pro měření málo viskózních roztoků v případě, že sonda má optimální jas (*molecular brightness*, Mb). Parametr jasu nemůžeme zcela ovlivnit, je dán charakterem samotné fluorescenční sondy a citlivostí detektoru.

Intenzita laseru je také důležitým parametrem, neboť pokud se vychýlíme z lineární části závislosti odezvy intenzity laseru na výstupní intenzitě na detektoru, matematické vzorce pro výpočty difúzních koeficientů a dalších parametrů nabydou velké odchylky. Je třeba

minimalizovat chyby způsobené lidským faktorem a přístrojem, pokud je to možné. Zde byla použita intenzita laseru okolo 100 a.u. (z angl. *arbitrary units*-libovolné jednotky), což se nachází v nižších hodnotách celkového rozsahu možného nastavení intenzity laseru a daleko od oblasti nelinearity.



Obr. 17: Optická saturace laseru 470 nm. Experimenty byly prováděny v lineární oblasti vstupní intenzity laseru. Tento laser byl používán pro experimenty s akridinovou oranží.



Obr. 18: Optická saturace laseru 510 nm. Rovněž u experimentů s Rhodaminem 6G, pro který byla používána tato vlnová délka laseru, bylo pracováno v lineární oblasti odezvy.

Před každým měřením je důležité provést kalibraci konfokálního objemu. Tento objem se mění v závislosti na použité vlnové délce laseru, teplotě a dalších parametrech. Měřením rozumíme ucelenou sadu vzorků, kalibrace se tedy provádí pokaždé při změně nastavení optických prvků přístroje, což se děje v závislosti na tom, jaké komponenty používají jednotliví uživatelé přístroje. Měřením se většinou rozumí daný den a kalibrace se tedy provede na začátku dne po nastavení přístroje. Ke kalibraci byly použity dvě látky, v závislosti na použitém laseru. Atto 488 bylo použito pro laser 470 nm a Rhodamin 6G se stal mimo samotný experiment také kalibračním roztokem pro laser 510 nm. Více bude popsáno v kapitole 4.4.1.

Další faktorem je způsob vyhodnocení dat. Ten bude popsán v kapitole 4.4.2. Přístupů je mnoho a je třeba přistupovat k problému s logikou. Každá z možných analýz poskytne určitá data, a je na uživateli, aby vyhodnotil, zda mohou být správné a pravdivé.

4.4.1 Kalibrace konfokálního objemu

Výsledky z měření neznámých vzorků pomocí FCS budou reálné, pouze pokud je stanoven tvar a velikost konfokálního objemu. Velikost a prodloužení objemu se stanovuje kalibračním měřením referenční fluorescenční sondy o známém difúzním koeficientu [73].

Abychom získali správné parametry konfokálního objemu, je třeba zachovat experimentální podmínky (vlnová délka, intenzita laseru, tloušťka podložního skla, rozpouštědlo a imerzní médium) během kalibrace stejné jako při samotném měření. V následující tabulce jsou shrnuty známé difúzní koeficienty pro námi používané sondy [73].

Tabulka 4: Difúzní koeficienty náležející použitým fluorescenčním sondám [73]

Fluorofor	λ_{em} maximum (nm)	Difúzní koeficient (ve vodě, 25 °C, v $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
Atto 488	523	$4,0 \pm 0,1$
Rhodamin 6G	550	$4,14 \pm 0,05$

Difúzní koeficient není konstanta. Je závislý na teplotě podle Stokes-Einsteinova vztahu:

$$D(T) = \frac{kT}{6\pi\eta(T)r}, \quad (1)$$

Kde D je difúzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta ($1,3807 \cdot 10^{23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), r je hydrodynamický poloměr. I viskozita vody nebo rozpouštědla obecně η ⁵ je funkcí teploty. Pokud experiment není prováděn při 25 °C, hodnoty z tabulky musí být přepočteny podle této rovnice:

$$D(T = 25^\circ\text{C}) = \frac{T}{298,15\text{K}} \cdot \frac{8,9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}}{\eta(T)} = D(25^\circ\text{C}) \cdot \frac{T + 273,15}{298,15} \cdot 2,985 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{K}^{-1},, \quad (2)$$

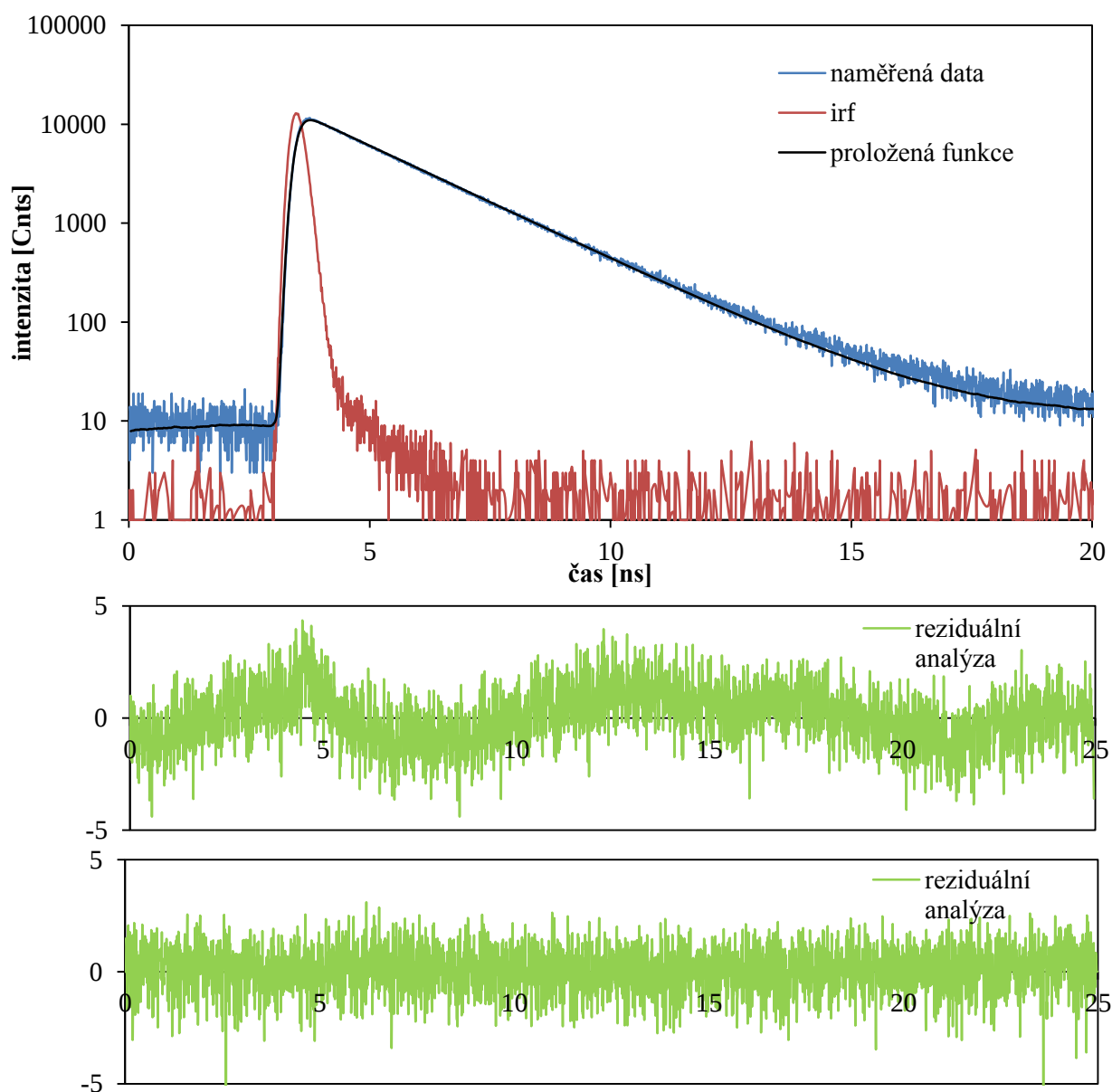
Závislost na teplotě je nezanedbatelná, ale bohužel často opomíjená [73].

⁵ V tomto případě je viskozita výjimečně označena jako η z důvodu obsazení značky η pro jiný parametr.

4.4.2 Způsoby vyhodnocování dat

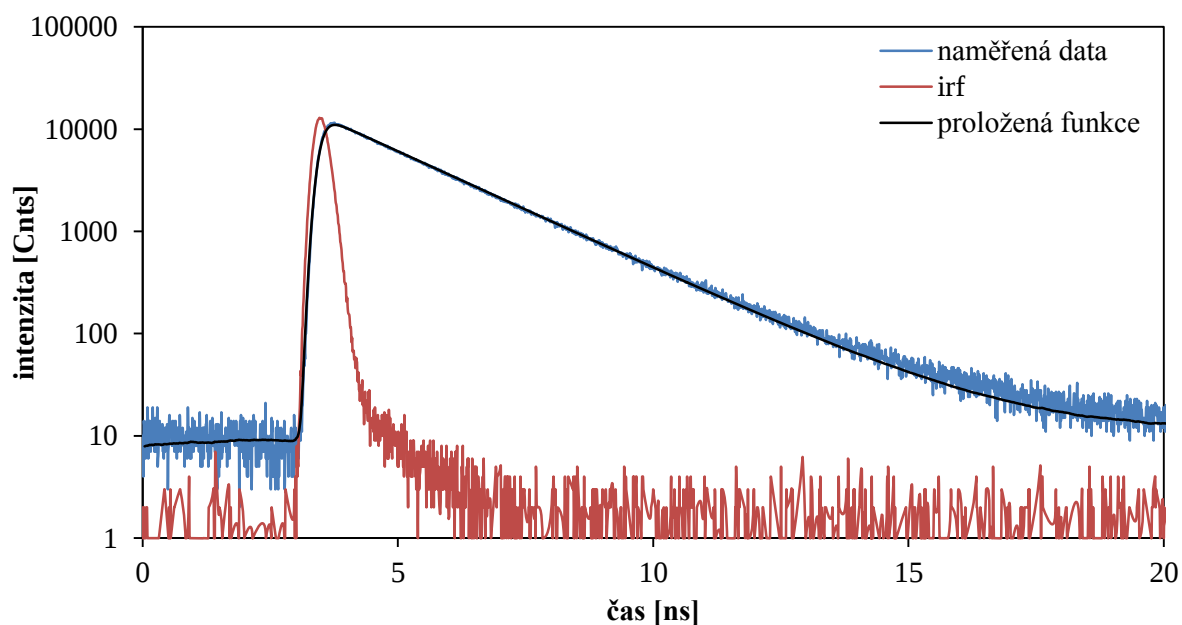
Software SymPhoTime64 nabízí v záložce Analýza několik možností. Jako ukázka byl zvolen vzorek Atto 488 ve vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-9}$ M.

Nejprve je třeba ověřit doby života. K tomu slouží buď TCSPC analýza nebo FLCS analýza. Orientační náhled nám poskytnou obě metody, ale samotné oddělení jednotlivých křivek náležících k dané době života nám poskytne pouze FLCS analýza. Tam můžeme vytvořit statistické FLCS filtry, které nám umožní samotné vytvoření tolika křivek, kolik máme dob života. Nejprve musíme od naměřené křivky odečíst odezvu laseru (irf, neboli *instrument response function*), který si změříme před každým měřením. Intenzita irf by měla zhruba odpovídat intenzitě naměřeného vzorku, jinak mohou být výsledky mírně ovlivněny. Také reziduální analýza nám nepovolí použít jinou intenzitu irf, než tu vhodnou.



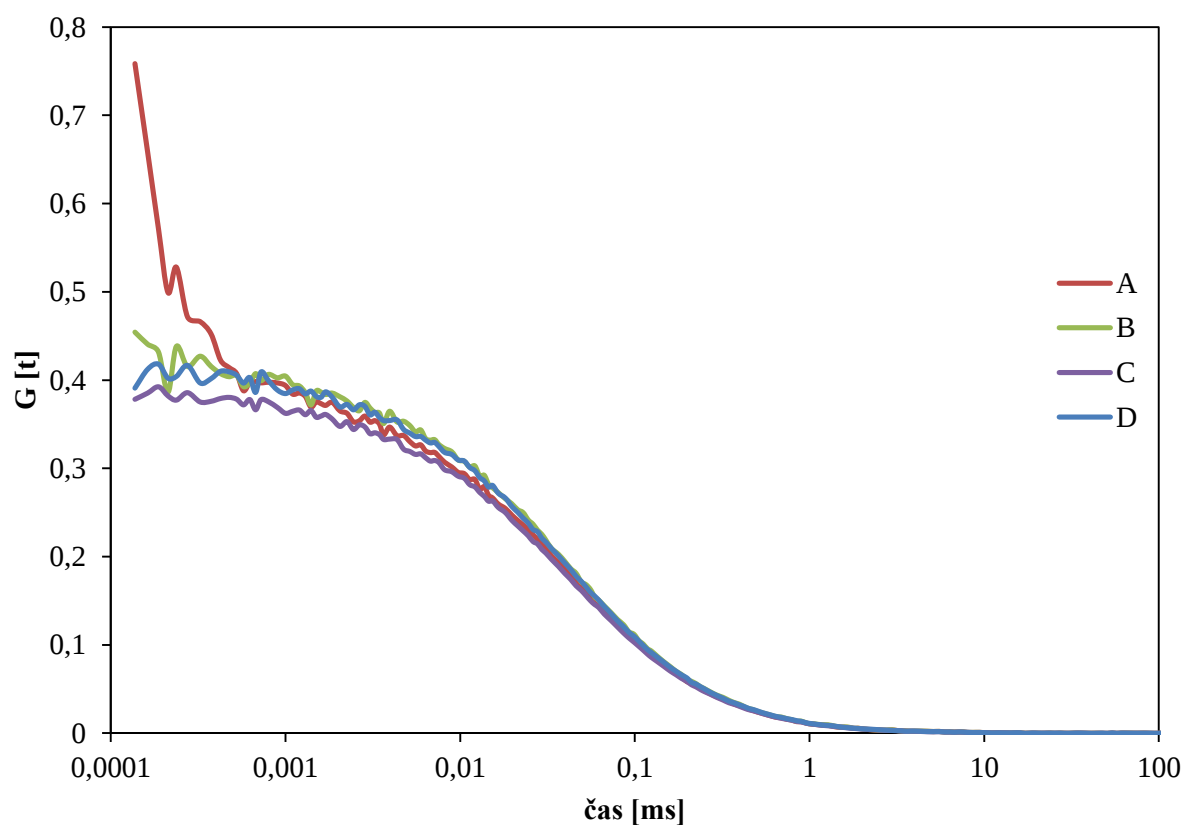
Obr. 19: FLCS analýza vzorku se dvěma reziduálními analýzami – první pro jednu dobu života a druhá pro dvě doby života

Jedna z nevhodných typů irf křivek je znázorněna na obrázku 20. Intenzita převyšuje maximum vyhasínací křivky.



Obr. 20: Ukázka nevhodně zvolené irf

Byly analyzovány dvě doby života a pro každou dobu života zvlášť byla vygenerována difúzní křivka, která je dále podrobena klasické FCS analýze pro zjištění difúzních časů, difúzních koeficientů, popř. složitějších výstupů.

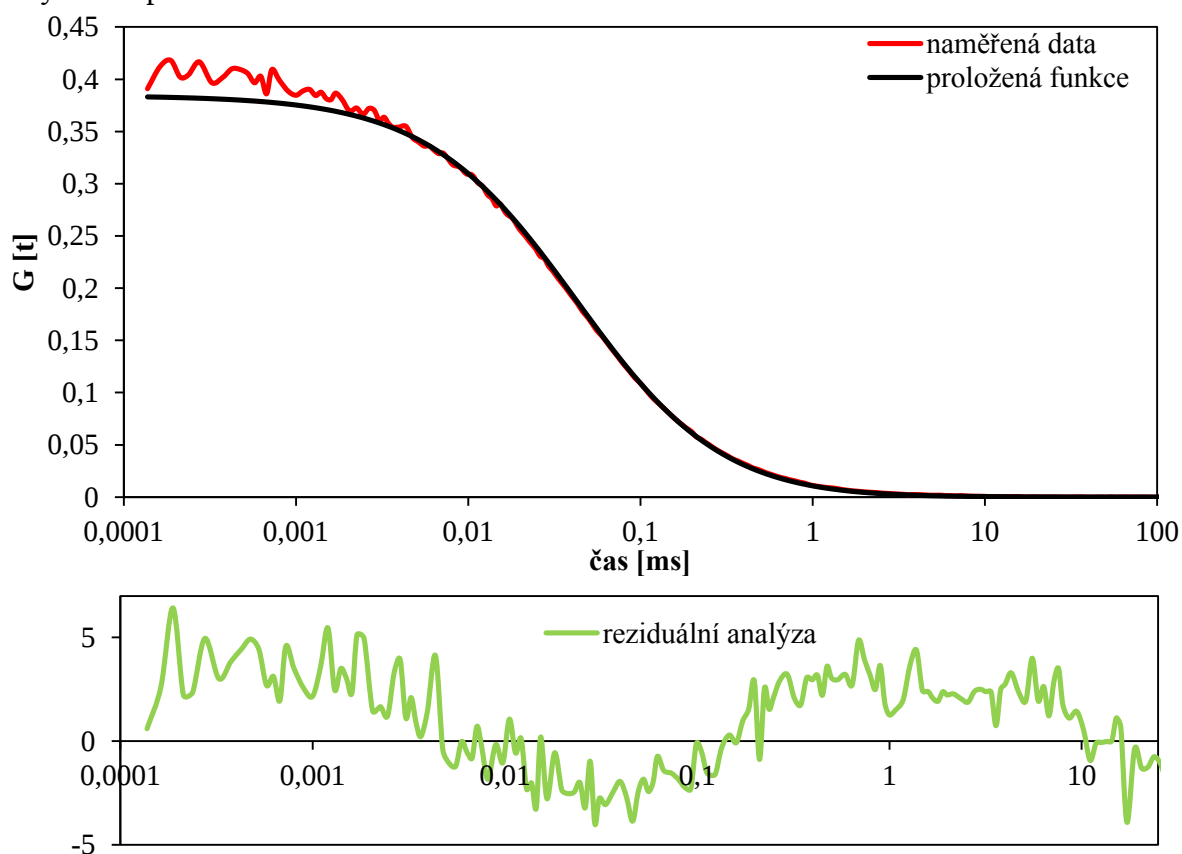


Obr. 21: Ukázky možného vykreslení difúzních křivek – kombinace možností autokorelace a kroskorelace a použití funkce FLCS Background Correction.

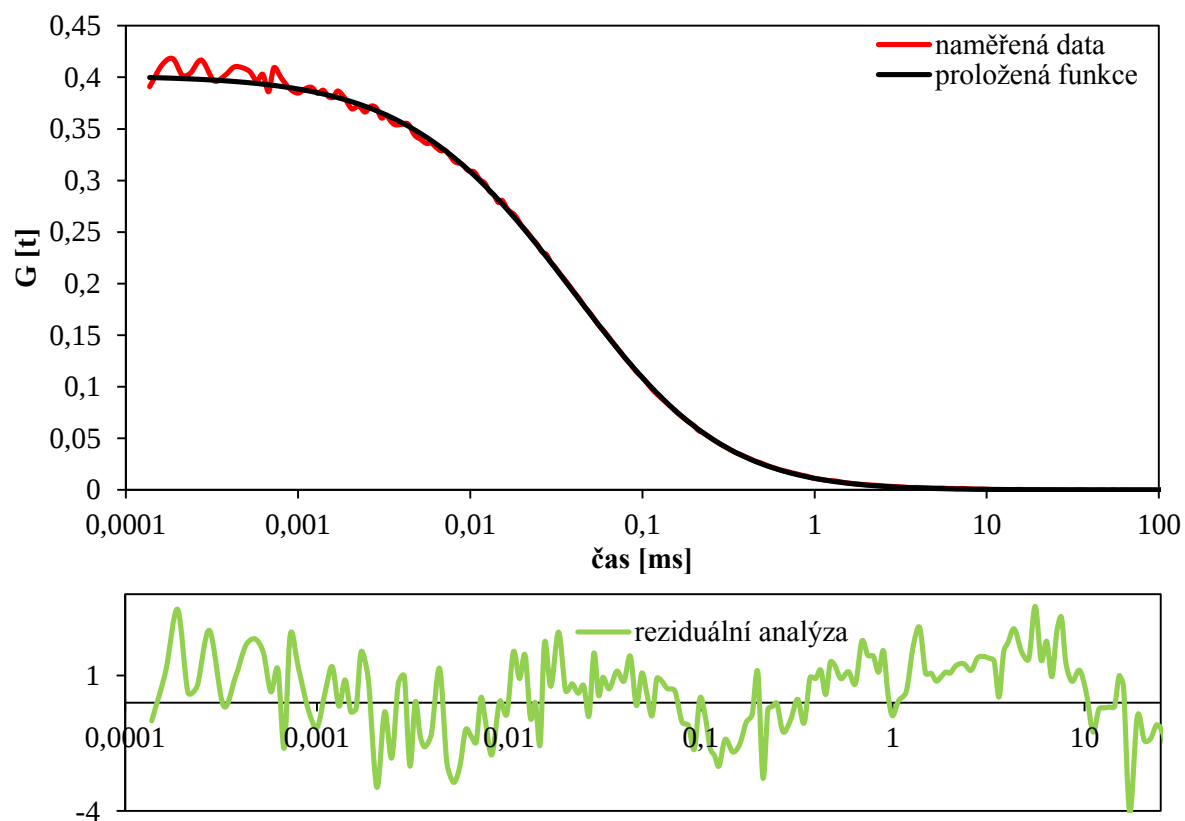
Jak vidíme na obrázku 21, tyto difúzní křivky mohou mít čtyři podoby. Křivka A představuje autokorelaci bez použití funkce *FLCS Background Correction*, křivka B tuto funkci využívá. Povolením této funkce nám software aplikuje jednoduchý FLCS filtr, který odstíní vliv *afterpulsingu* laseru. *Afterpulsing* je děj, kdy dochází k tvorbě impulsů v důsledku odezvy detektoru.

Pokud měříme s použitím dvou detektorů, již není třeba tuto funkci využívat. Kroskorelaci signálů z obou detektorů by mělo dojít k odstranění *afterpulsingu* automaticky. Potvrzení najdete v křivkách C a D na obrázku 19, kde C je kroskorelace bez použití funkce *FLCS Background Correction* a D značí kroskorelaci s použitím tohoto filtru. Dochází pouze k zanedbatelným změnám v rámci výsledné difúzní křivky v důsledku statistické analýzy.

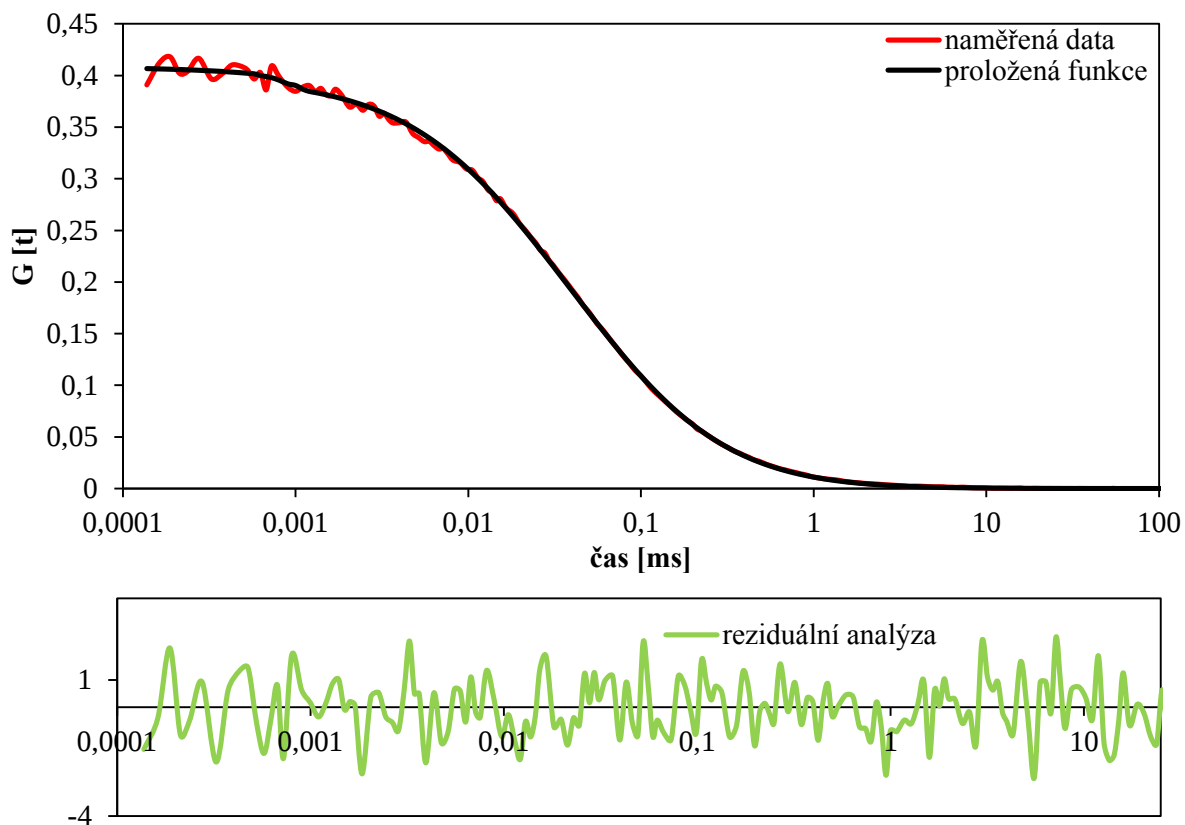
Po vykreslení difúzní křivky přecházíme k samotné analýze. Nejjednodušším matematickým modelem je prostá difúze. Rozdíl mezi použitím jednoho a dvou parametrů je znázorněn na obrázku 20a a 20b. Za povšimnutí stojí vylepšení proložení naměřených dat u obrázku 20b, který reprezentuje prostou difúzi se dvěma parametry, tedy se dvěma difúzními časy. Reziduální analýza je ale stále nevyhovující, je tedy třeba zvolit složitější analýzu – triplet.



Obr. 22a: Prokládání naměřených dat matematickým modelem prostá difúze s jedním parametrem



Obr. 22b: Prokládání naměřených dat matematickým modelem prostá difúze se dvěma parametry



Obr. 22c: Prokládání naměřených dat matematickým modelem triplet s jedním parametrem

Při srovnání číselných hodnot z těchto tří druhů analýz vidíme, že v případě prosté difúze se dvěma parametry nám u druhého difúzního koeficientu vychází hodnota $1545 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, což je nereálná hodnota, tudíž v kombinaci se špatnou reziduální analýzou tento model vyhodnotíme jako nevyhovující. Fakt, že i první matematický model je nevyhovující, usuzujeme pouze na základě reziduální analýzy, která je k tomu primárně určená. Neoptimálnější se jeví třetí analýza, jelikož číselné hodnoty jsou reálné a reziduální analýza osciluje okolo nulové hodnoty, což je v pořádku.

Tabulka 5: Zastoupení jednotlivých difúzních časů (ρ), difúzní časy (τ), difúzní koeficienty (D), tripletní čas (τ_{TR}) a zastoupení tripletního času (T)

	prostá difúze 1 parametr	prostá difúze 2 parametry	model triplet
ρ_1	0,38	0,32	0,40
ρ_2		0,08	
τ_1 [ms]	0,04	0,05	0,05
τ_2 [ms]		0,01	
D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	430	367	400
D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]		1545	
τ_{TR} [μs]			11,20
T			0,09

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem práce bylo charakterizovat interakce mezi molekulami fluorescenčních sond a polyelektrolytů pomocí časově rozlišené fluorescence. Základem pro celou práci byla odborná publikace vydaná vědci z fakulty chemické při VUT v Brně, kde byla studována AO pomocí ustálené fluorescence a dalších fyzikálně-chemických metod. Těmito metodami byly zjištěny spektrální změny před a po interakci akridinové oranže v různých poměrech s polymerem a obecné vlastnosti interakcí AO a také vzniku dimerů. Následně byla zpracována rešerše, která se okrajově opírá o dimerizaci AO, neboť tato problematika zatím nebyla široce prozkoumána a u FCS se s dimerem nesetkáváme, jelikož se pohybujeme koncentračně pod limitem vzniku dimeru. Rešerše byla zaměřená na sondu jako takovou a v další kapitole na měření hyaluronanu pomocí FCS s použitím podobných sond.

Na základě rešerše bylo zjištěno, že interakce AO s polyelektrolyty nebyla dosud studována pomocí námi zvolené metody, proto si tato práce klade za cíl prostudovat interakce mezi molekulami AO právě pomocí fluorescenční korelační spektroskopie.

Stanovení vlivu koncentrace polyelektrolytu bylo studováno vytvořením řady s různým P/D, tedy změnou poměru koncentrace polymeru vůči koncentraci barviva.

Nejprve byly provedeny experimenty s akridinovou oranží, které však ukázaly, že tato sonda není vhodná pro měření pomocí FCS. Důvodem může být nízká koncentrace a fakt, že akridinová oranž nenesou dostatečně silný náboj a některé výsledky jsou sporné a špatně interpretovatelné. Z tohoto důvodu byla použita i sonda Rhodamin 6G. Tato molekula je prostorově složitější a je možné, že právě její struktura způsobuje, že můžeme dokázat fyzikální interakci s polyelektrolytem.

Každý vzorek byl proměřen třikrát a získané hodnoty byly zprůměrovány. Spolu s diskutovanými odchylkami byly hodnoty průměru zpracovány pomocí programu Microsoft Excel.

5.1 Fyzikální interakce polyelektrolytu s akridinovou oranží

Všechny testy byly prováděny ve vodném prostředí a ve velmi zředěném režimu týkajícího se fluorescenčních sond, jelikož tento parametr je velmi důležitý pro správnost měření pomocí FCS.

K potvrzení interakce mělo dojít změnou doby života, nebo řádovou změnou difúzních časů, popřípadě výskytem tripletu.

Jelikož nebylo možné dosáhnout přesnosti měření, a standardní odchylka se pohybovala v rozmezí 25–30%, tak jako možná překážka byla označena právě sonda AO, jelikož ani v literatuře nebylo dohledatelné měření AO pomocí fluorescence v takto nízkých koncentracích, jaké FCS vyžaduje.

Po přípravě vzorků obsahujících fluorescenční sondu akridinovou oranž bylo zjištěno, že se silně sorbuje na sklo. Tento fakt je způsoben přitahováním kladně nabitých sondy k záporně nabitým skupinám skla. Proto další přípravy byly prováděny do LDPE kontejnerů o objemu 20 ml.

5.1.1 Polystyren sulfonát sodný a akridinová oranž

Řetězec polystyren sulfonátu sodného reprezentuje záporný náboj svou sulfonovou skupinou ($-\text{SO}_3^-$), díky němuž je schopen přitahovat k sobě kladně nabitě molekuly. Měřené veličiny byly studovány v závislosti na poměru P/D. P představuje molární koncentraci polymeru, tedy jeho vazných míst. Na jednom řetězci PSS se nachází jedna sulfonová skupina, tedy jedno

vazné místo. Platí rovnost, že 1 mol sulfonových skupin se rovná 206 molům PSS. D je analogie k P, ale týká se molekuly fluorescenční sondy v roztoku.

Tabulka 6a: Doby života akridinové oranže v roztocích PSS. Mapování škály P/D.

P/D →	0,5	1	10	100
doba života [ns]	1,9	1,9	1,9	1,9

Doby života se v rámci změny poměru P/D nemění, tedy z tohoto hlediska nebyla potvrzena fyzikální interakce.

Tabulka 6b: Difúzní časy, difúzní koeficienty a triplet systém AO-PSS

P/D	t [ms]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t_{TR} [μs]
0,5	0,03	570	3
1	0,03	620	3
10	0,03	610	3
100	0,80	25	70

Ani při zjišťování difúzních koeficientů nebyl objevem nějaký trend v nízkých oblastech P/D. Při hodnotě P/D = 100 došlo k řádovému poklesu difúzního koeficientu. S velkou pravděpodobností zde vzniká asociát tvořený molekulou akridinové oranže a polystyren sulfonátu. Dle Stokes-Einsteinovy rovnice je velikost vzniklého asociátu přibližně 10 nm. V rámci opakovatelnosti byla odchylka stanovena na 30%, ale v rámci porovnání s hodnotami pro nižší poměry P/D jsou hodnoty dostatečné pro odlišení vzniklého asociátu a volně difundující molekuly i s tak vysokou odchylkou. Výsledky potvrdily předpoklady z předloženého experimentu [72].

Dle [72] v systému AO-PSS v oblastech P/D = 1 dochází k nárůstu počtu dimerů vůči monomerům a jejich relativní fluorescence poklesla k nulové hodnotě. V našem případě FCS prokázalo, že nedochází k interakci a molekula se pohybuje mírně zrychlenou difúzí. Molekula akridinové oranže ve vodném prostředí vykazovala difúzní koeficient $430 \mu\text{m}^2/\text{s}$. V přítomnosti polymeru dochází k nárůstu difúzního koeficientu a na první pohled se můžou hodnoty zdát nereálné. Jedním z možných vysvětlení by mohl být fakt, že mikroprostředí tvořené polymerem vytvoří prostor, kde molekula akridinové oranže nebude nijak zadržovaná a dojde k mírné akceleraci jejího pohybu. Polymerní síť bude vytvořena tak, aby záporně nabitě skupiny polymeru byly v dostatečné vzdálenosti, a nedošlo k přitahování molekuly AO.

Pro P/D = 1000 dochází v článku [72] k opačnému procesu, tedy k nárůstu relativní fluorescence a poklesu množství dimerů v systému. Tento experiment nelze vyhodnotit, výsledky nebylo možné proložit žádným z nabízených matematických modelů tak, aby byla reziduální analýza vyhodnocena jako alespoň dostatečná. Ovšem i pro tuto hodnotu P/D bylo provedeno množství experimentů a bylo zhodnoceno, že data není možné vyhodnotit z důvodu vysoké složitosti systému. V experimentech s Rhodaminem 6G ale takto vysoké P/D vyhodnotit lze. Chyba je tedy opět přičítána nevhodnosti zvolené fluorescenční sondy.

5.1.2 Hyaluronan a akridinová oranž

Hyaluronové řetězce mají ve struktuře záporně nabitě karboxylové skupiny (COO^-). Kationtové fluorescenční sondy se váží k hyaluronanu právě prostřednictvím těchto skupin. Interakce mezi těmito dvěma nabitými skupinami byly studovány pomocí měření FCS

v závislosti na parametru P/D. Obecně platí, že 402,3 molů hyaluronanu obsahuje přibližně jeden mol vazných míst.

Tabulka 7: Doby života akridinové oranže v roztocích hyaluronanu. Mapování škály koncentrací a P/D.

P/D →	0,5	1	5	10	50	100
dobu života [ns]	1,9	1,9	1,8	1,9	1,9	1,8

Z tabulky je patrné, že při mapování dob života v závislosti na poměru P/D nedošlo k výraznější odchylce od hodnoty 1,9 ns.

Co se týče dalších analýz, bylo prokázáno, že dochází k interakci mezi náboji. U všech měřených vzorků se vyskytoval triplet, a ke zpomalení samotné molekuly došlo v poměrech P/D = 0,5 a 5.

Tabulka 8: Difúzní časy, difúzní koeficienty a triplet pro systém AO-HA

P/D	t [ms]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t _{TR} [μs]
0,5	0,05	220	23
1	0,04	450	22
5	0,05	320	25
10	0,03	500	6
50	0,03	490	1
100	0,03	470	2

Od hodnoty P/D = 10 dochází k řádovému snížení času tripletu, a zároveň mírnému zrychlení difúze molekuly. Výsledky jsou těžko interpretovatelné, nelze v nich najít žádný trend.

5.2 Fyzikální interakce polyelektrolytu s Rhodaminem 6G

Pro další měření byla zvolena fluorescenční sonda Rhodamin 6G, který slouží mimo jiné i jako kalibrační roztok pro měření FCS. Zde bylo dosaženo vysoké přesnosti měření, zároveň i opakovatelnosti, proto lze výsledky považovat za slibné, co se týče výstupů z naměřených dat. Jako polymer byl kromě hyaluronanu zvolen i chondroitin sulfát sodný a PSS. Jako body zájmu byly vyčleněny hodnoty P/D = 2 a 200 pro prostředí s oběma polyelektrolyty. Při hodnotě P/D = 2 v systému s hyaluronanem sodným dochází k poklesu relativní intenzity fluorescence a při P/D = 200 intenzita nabývá nejvyšší hodnoty v dané oblasti (viz obrázek 15). V případě polystyren sulfonátu sodného má křivka jiný průběh (viz obrázek 14). V bodě P/D = 2 dochází k rapidnímu poklesu relativní intenzity fluorescence a je žádoucí prozkoumat, jaké výsledky bude systém vykazovat při měření pomocí FCS. Nacházíme také bod ekvivalence, a to v posledním bodě zájmu, při P/D = 200. Tyto hodnoty poměru P/D byly vybrány jako body zájmu a proměřeny byly i nejbližší hodnoty nacházející se před a za těmito hodnotami. V případě PSS byl probádán širší rozsah hodnot P/D, než u jiných polyelektrolytů. Data byla pro přehlednost normalizována a výsledky jsou naznačeny dále.

5.2.1 Polystyren sulfonát sodný a Rhodamin 6G

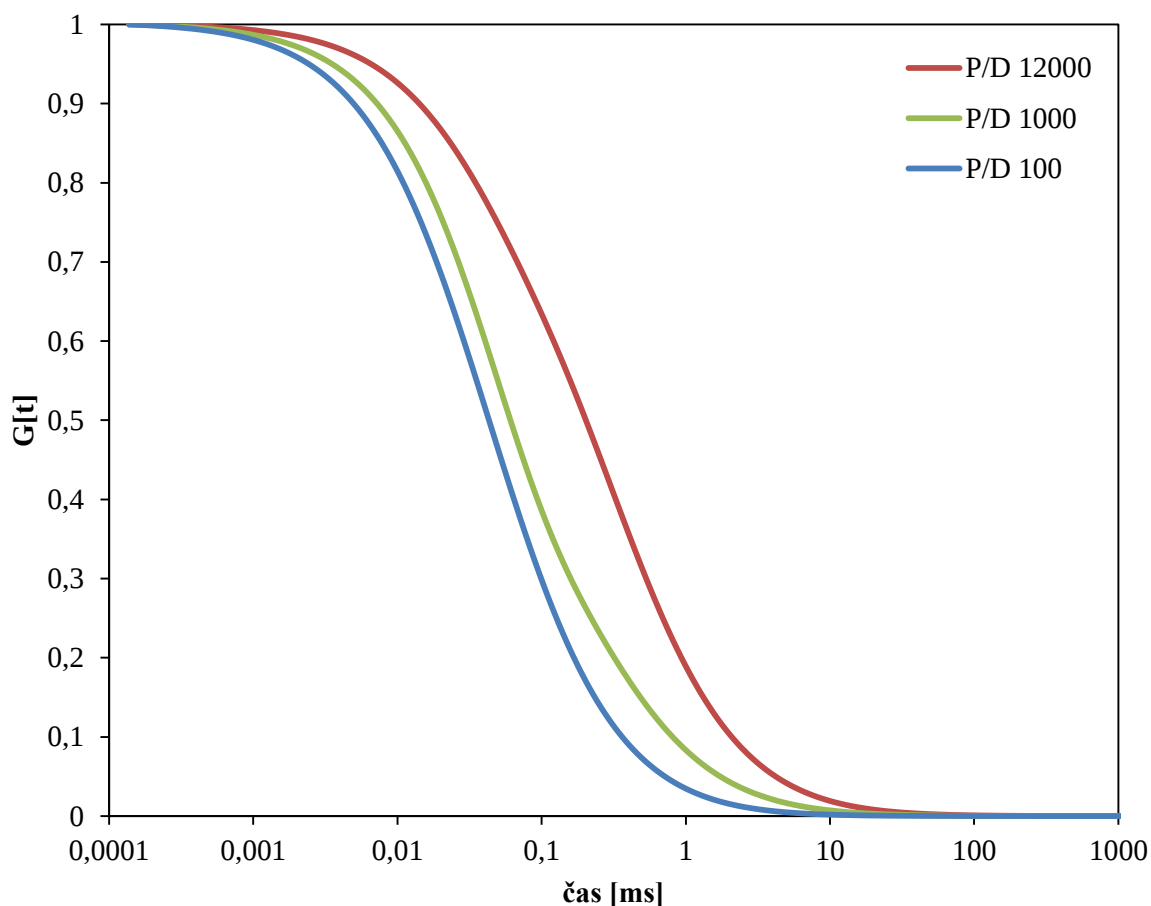
Pro měření interakcí sondy s tímto polymerem byly zvoleny dvě molekulové hmotnosti a to 1 MDa a 70 kDa. V rámci těchto odlišností nedošlo ke změně dob života, sonda vykazovala i přes široké pokrytí parametru P/D pouze jednu dobu života – 3,9 ns. Tento fakt by nám mohl

naznačit, že se sonda nachází pouze v jednom prostředí, nenavázaná na okolní polymer, popř. ve více prostředích, z nichž v každém má stejnou dobu života. Ale fyzikální interakce se může projevit i změnou difúzního času. Všechny vzorky byly tedy podrobeny FCS analýze a bylo zjištěno, že Rhodamin 6G v prostředí 1 MDa PSS vykazuje dva difúzní časy a s tím související dva difúzní koeficienty, z nichž jeden odpovídá volně difundující sondě v prostředí a jeden difúzní koeficient je řádově 100krát nižší, tedy sonda je nějakým způsobem 100krát zpomalovaná. Mohlo by být sporné potvrdit fyzikální interakci se záporně nabitými polyelektrolyty na základě těchto výsledků, protože z hlediska opakovatelnosti se výsledky mírně liší. Takový systém je však neuniformní a odlišnosti ve výsledcích jsou v rámci jednoho řádu, tedy chyba je připočítávána polydisperzitě systému. V systému se mohou nacházet různě dlouhé frakce polyelektrolytu, a pokud je na nich navázaná sonda, pak se vzniklý asociát může pohybovat různou rychlostí.

Tabulka 9: Doby života Rhodaminu 6G v prostředí PSS

P/D	1 MDa	70 kDa
100	3,9	3,9
200	3,9	3,9
300	3,9	3,8
400	3,9	4,0
500	3,9	3,9
1000	4,0	4,0
2000	4,1	3,9
3000	3,9	4,1
4000	4,1	4,2
5000	4,2	4,2
7000	4,3	4,2
12000	4,1	4,3

Z analýzy dob života je patrné, že v obou případech dochází jen k mírnému nárůstu doby života v závislosti na poměru P/D. Tento jev je přičítán velké složitosti systému v oblastech vyššího P/D. Sonda mění dobu života se vzrůstajícím počtem molekul polyelektrolytu v systému a tak vzniká větší pravděpodobnost, že dojde k interakci.



Obr. 23: Ukázka difúzních křivek 1 MDa PSS pro tři zvolená P/D.

Na obrázku lze vidět, že v rozmezí hodnot P/D 100–12 000 se difúze rovnoměrně zpomaluje, což může být přičítáno narůstající viskozitě prostředí nebo interakcím mezi molekulami polymeru. Pokud budeme předpokládat větší mezimolekulové interakce, pro sondu bude složitější prodifundovat prostředím. Ale fyzikální interakce, prezentována skokovou změnou difúzního času, opět nebyla potvrzena. Došlo pouze ke zpomalení sondy od určitého poměru P/D, což bylo dokázáno proložením modelem Triplet. V rozmezí hodnot P/D 0,5–100 se křivka nemění a difúze fluorescenční sondy má stejný průběh.

U vzorků se 70 kDa PSS byla opakovatelnost výrazně lepší. Vliv sterility nebude diskutován, jelikož poměr P/D se dá vysvětlit i jako poměr vazných míst polymeru vůči vazným místům barviva, u obou typů molekulových hmotností budou vazná místa, co se hmotnosti týče, stejná. Jelikož se pohybujeme ve velmi zředěném prostředí, výsledná koncentrace polymeru je ve stovkách nanomolů v jednom litru vzorku, tak nepředpokládáme vliv sterility. Přesto je jisté, že dochází k určitému zadržování a zpomalování molekul sondy, tedy jediným možným vysvětlením je právě fyzikální interakce mezi sondou nesoucí kladný náboj a záporně nabitým polymerem.

Toto zadržování se projevuje přítomností přechodu molekuly do tripletního stavu, což dokázala analýza v rozmezí hodnot P/D 300–12000. V hodnotách P/D do 200 se triplet nevyskytuje a difúzní koeficient zůstává stejný, cca $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Výskyt tripletu nám ukazuje na interakci a ta je navíc potvrzena snižováním difúzního koeficientu při daném poměru P/D.

Tabulka 10: Difúzní časy, difúzní koeficienty a triplet v systému Rhodamin 6G-PSS (70 kDa)

P/D	t [ms]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t _{TR} [μs]
0,5	0,04	399	
1	0,04	401	
1,5	0,04	381	
2	0,04	405	
5	0,04	381	
10	0,04	377	
50	0,04	405	
100	0,04	361	
200	0,04	363	22
300	0,12	136	43
400	0,16	98	43
500	0,14	112	41
1000	0,20	78	42
2000	0,08	210	32
3000	0,30	52	39
4000	0,36	43	45
5000	0,36	43	46
7000	0,24	65	21
12000	0,36	48	36

V rámci 1 MDa PSS byl studován i vliv stability roztoku. Na základě faktu, že výsledky jsou obdobné i v rámci měření vzorků, které byly dlouho skladovány, usuzujeme vysokou stabilitu roztoku.

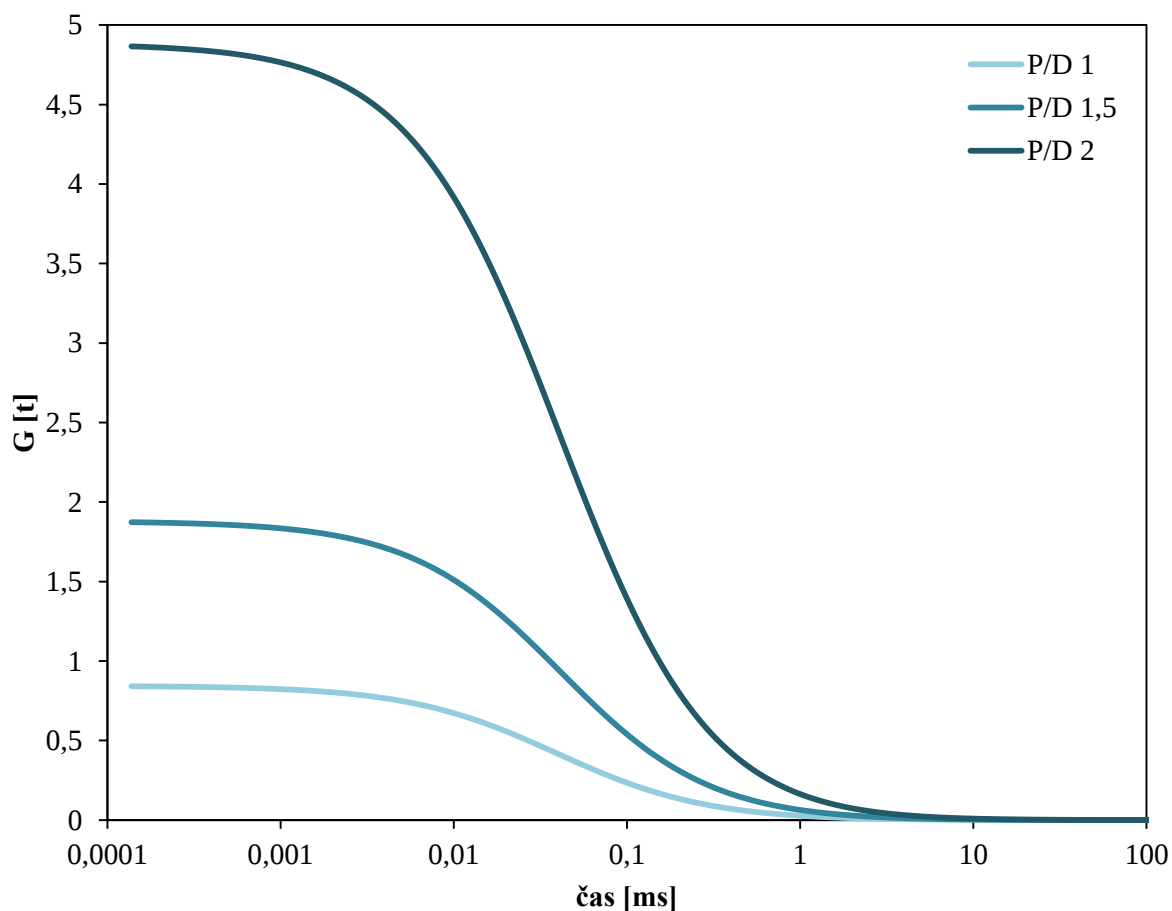
5.2.2 Hyaluronan sodný a Rhodamin 6G

Pro měření vzorků s hyaluronanem byly vybrány jen určité body zájmu z oblasti P/D. Dle článku [72] by z hlediska intenzity fluorescence byl očekávaný pokles v oblasti P/D 2 a 200. Tyto body jsou prezentovány jako body ekvivalence, tedy kdy je teoretický počet vazných míst polymeru vyplněn vazbami s fluorescenční sondou. Byly změřeny vzorky před a za oblastí těchto hodnot. Intenzita fluorescence, kterou měří přístroj FCS závisí na mnoha faktorech, nemůžeme ji tedy brát jako normalizovanou intenzitu. Ale přesto pokud by se předpoklady potvrdily, pozorovali bychom např. změnu doby života nebo výraznější změnu difúzního koeficientu. Co se týče FLCS analýzy a zjišťování dob života, zůstalo opět u jedné hodnoty, stejně jako u PSS. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Doby života systému Rhodamin 6G-HA

P/D	doba života [ns]
1	3,9
1,5	3,9
2	3,9
100	3,9
150	3,9
200	3,9
250	3,9
300	3,9

Z difúzních křivek vybraných P/D je patrné, že dochází ke změně počáteční hodnoty autokorelační křivky, což nám dává informaci o koncentraci. Se snižujícím se parametrem P/D, tedy se zvyšujícím se molárním poměrem polymeru vzhledem k barvivu dochází ke snižování počáteční hodnoty autokorelační křivky a tedy ke zvyšování koncentrace.



Obr. 24: Difúzní křivky hyaluronanu sodného a Rhodaminu 6G

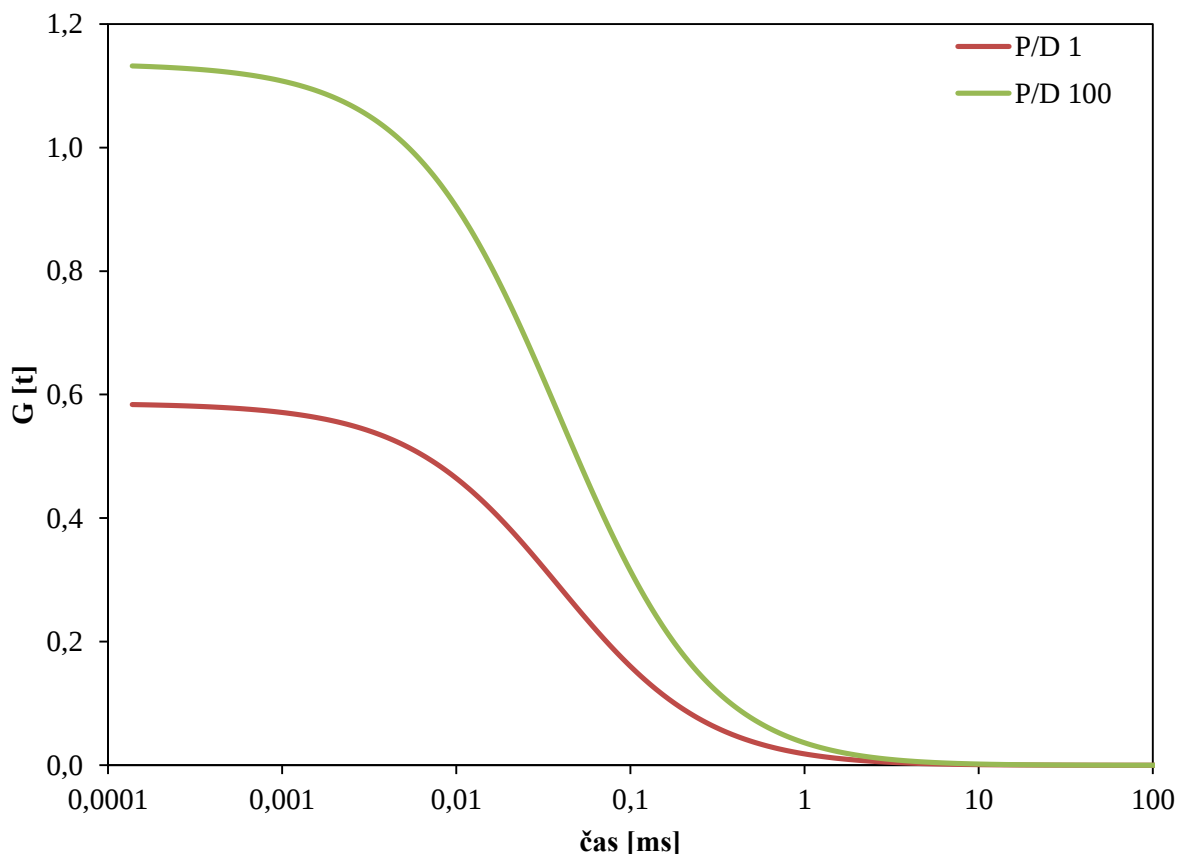
Tabulka 12: Hodnoty difúzních časů, difúzních koeficientů a tripletů pro systém hyaluronanu a Rhodaminu 6G.

P/D	t	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t _{TR}
1	0,04	395	
1,5	0,04	368	
2	0,04	391	
100	0,04	396	
150	0,04	389	
200	0,05	351	20
250	0,04	377	33
300	0,04	365	26

Z tabulky je patrné, že difúzní časy a k nim přináležející difúzní koeficienty se v průběhu zvolených P/D nemění, sonda tedy není nijak zadržována a putuje volně, ale od P/D = 200 byl analyzován ještě tripletní čas, což nasvědčuje, že v systému nějaká interakce probíhá.

5.2.3 Chondroitin sulfát sodný a Rhodamin 6G

Chondroitin sulfát sodný obsahuje záporně nabitě sulfátové skupiny, které by se měly podílet na interakci s kladně nabitými skupinami Rhodaminu 6G. Ovšem na této molekule se vyskytuje i karboxylová skupina, která taktéž nese záporný náboj a může se tak podílet na vazbě s fluorescenční sondou. FLCS analýza neprokázala změny v rámci změny poměru P/D, doba života byla neměnná, a to 3,9 ns.



Obr. 25: Difúzní křivky chondroitin sulfátu sodného a Rhodaminu 6G

Na obrázku 25 vidíme koncentrační vliv polyelektrolytu na hodnotě autokorelační funkce. Se zvyšujícím se poměrem P/D roste v systému koncentrace a roste i hodnota autokorelační funkce. U hodnoty P/D = 200 byl analyzován triplet, což nasvědčuje interakci v systému. Hodnoty tripletu a difúzních časů jsou zaznamenány v tabulce níže.

Tabulka 13: Hodnoty difúzních času, difúzních koeficientů a hodnoty tripletu pro systém chondroitin sulfátu a Rhodaminu 6G

P/D	t [ms]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	t _{TR} [μs]
1	0,04	388	
1,5	0,04	394	
2	0,04	386	
100	0,04	395	
150	0,04	397	
200	0,05	360	21
250	0,04	338	
300	0,04	362	

Z výsledků pro systém chondroitin sulfát a Rhodamin 6G můžeme usuzovat, že dochází ke zpomalování frakce molekul při poměru $P/D = 200$, protože při této hodnotě se i mírně prodloužil difúzní čas, ale s jistotou nelze říci, že došlo k fyzikální interakci mezi kladně nabitým Rhodaminem 6G a chondroitin sulfátem sodným, který nese záporný náboj. Je možné, že tento polyelektrolyt nenese dostatečně silný náboj, aby si přitáhl molekulu Rhodaminu 6G a nebo zde dochází ke sterickému bránění z hlediska struktury samotné molekuly chondroitin sulfátu. Molekula Rhodaminu je poměrně prostorná a rozhodně nemůže dojít k interakci mezi dvěma molekulami Rhodaminu a dvěma vaznými místy na polyelektrolytu, které se nacházejí v bezprostřední blízkosti. Řekněme, že reálná je interakce s každou 10. záporně nabitou skupinou chondroitinu. Tento názor je podpořen i výsledky, neboť z hlediska amplitud jednotlivých časů je tento poměr jejich zastoupení skutečně v poměru 1:10, kde 1 patří tripletnímu času a 10 volně difundující molekule. Tedy k jisté interakci zde došlo, ale přímé potvrzení by nastalo až po výraznějším snížení difúzního koeficientu, jak to bylo např. u systému PSS–Rhodamin 6G.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou fyzikálních interakcí mezi kladně nabitými fluorescenčními sondami a polyelektrolyty nesoucími záporný náboj. Jako stěžejní metoda pro studium těchto systémů a jejich charakterizaci byla zvolena fluorescenční korelační spektroskopie.

Dle zadání byla provedena literární rešerše na téma stanovení difúzních vlastností fluoreskujících malých molekul v roztocích polymerů s přihlédnutím k technikám fluorescenční spektroskopie. Z rešerše vyplývá, že pro studium difúzních vlastností je zvolená metoda velmi vhodná a široce využívaná. Co se týče akridinové oranže, převážně se s touto molekulou pracuje v řádově mnohem vyšších koncentracích, než vyžaduje FCS, tudíž se z této problematiky stává neprobádaná část. Proto byla kromě srovnávacího polymeru zvolena i srovnávací fluorescenční sonda – Rhodamin 6G.

Pro studium vlivu koncentrace polyelektrolytu na difúzní vlastnosti byl zaveden poměr P/D . Byla mapována široká škála tohoto parametru a bylo zjištěno, že v oblastech nad $P/D = 12\,000$ nedochází k žádným změnám v difúzních vlastnostech, tedy tato hodnota se stala maximální hodnotou pro naše experimenty.

V první části byly mapovány interakce s akridinovou oranží. Ze dvou navržených polyelektrolytů – hyaluronanu sodného a polystyren sulfonátu sodného – ani jeden neprokázal změnu doby života v rámci zvyšování poměru P/D . Co se týče dalších analýz, bylo zjištěno, že v případě PSS byly difúzní křivky prokládány modelem Triplet a od hodnoty $P/D = 100$ došlo k řádové změně difúzního koeficientu, což pokládáme jednoznačně za potvrzení fyzikální interakce polyelektrolytu s akridinovou oranží. V případě hyaluronanu došlo k řádové změně tripletního času, a to v rozmezí $P/D = 10\text{--}100$. V rámci této změny ale nedošlo ke změně difúzních koeficientů, tedy potvrzení interakce není jisté. Molekula akridinové oranže byla zhodnocena jako nevhodná sonda pro studium těchto interakcí, neboť v rámci opakovatelnosti nebylo dosaženo vhodných odchylek. Přestože byla sonda na základě rešerše zvolena jako vhodná, žádný z autorů nepoužil tuto fluorescenční sondu pro studium s FCS. Jedním z důvodů, proč je měření s touto molekulou problémové, může být koncentrace. Pro FCS je důležitá velmi nízká koncentrace – řádově nanomolární, a tato koncentrace vykazovala velmi nízkou intenzitu fluorescence připadající na jednu molekulu (parametr „*Molecular Brightness*“, což komplikuje samotný sběr dat i jejich následné vyhodnocení.

Vzhledem k problémům, které se vyskytovaly s touto sondou, byla pro další měření a zhodnocení využitelnosti FCS pro studium fyzikálních interakcí tohoto typu použita sonda Rhodamin 6G. Tato fluorescenční sonda je široce využívána a na naší fakultě existuje nespočet experimentů s touto molekulou. Je znám její absolutní difúzní koeficient a tak slouží i jako sonda pro kalibraci konfokálního objemu. Opět bylo studováno prostředí hyaluronanu sodného a polystyren sulfonátu sodného a navíc byl prozkoumán ještě chondroitin sulfát sodný. V případě hyaluronanu nedošlo ke změně doby života, tedy prvotní analýza nasvědčuje, že sonda difunduje volně a k interakci nedochází. Po podrobnější analýze je však zjištěno, že od hodnoty $P/D = 200$, což je dle [72] bod ekvivalence, je nutno použít model Triplet, ale stejně jako u akridinové oranže nedochází ke snižování difúzního koeficientu. Je tedy obtížně interpretovatelné, k jakým interakcím v systému dochází. Je možné, že hyaluronan nenesou dost silný náboj na to, aby k sobě přitáhl molekulu Rhodaminu 6G. Jako srovnávací polymer byl zvolen PSS. Zde byly použity dvě molekulové hmotnosti, přičemž obě vykazovaly při analýze doby života zvyšování hodnoty s rostoucí hodnotou P/D .

Zpomalování difúze je rovnoměrné a je tedy přičítáno složitosti systému, neboť polystyren sulfonát netvoří uspořádané struktury, ale spíše náhodné shluky řetězců a s rostoucím poměrem P/D je tedy větší pravděpodobnost jistého zpomalování molekuly Rhodaminu 6G. V bodě ekvivalence při $P/D = 200$ nám dochází ke zvyšování difúzního času a tedy ke zpomalování molekuly úměrně s rostoucím P/D . Navíc od bodu ekvivalence bylo nutné použít pro analýzu jiný matematický model. Z těchto dvou aspektů soudíme, že k fyzikální interakci dochází právě od této hodnoty, tedy ve stavu, kdy v systému je 200 násobek vazných míst polymeru oproti vazným místům na sondě. Porovnání výsledků obou molekulových hmotností vychází dle očekávání – při analýze 1 MDa vzorků dochází k horší opakovatelnosti, než u vzorků, kde byl použit 70 kDa PSS, ale výsledky spolu korelují. U PSS byla studována také stabilita vzorků a bylo zjištěno, že i přes několikaměsíční skladování vzorků nedochází ke změnám difúzních vlastností.

Co se týče posledního zmiňovaného polyelektrolytu, chondroitin sulfátu sodného, nedochází ke změně doby života, ani ke změně difúzních koeficientů. Pouze při $P/D = 200$ byl pro analýzu použit model triplet. Chondroitin se chováním více podobá hyaluronanu, než PSS, dalo by se tedy říci, že nenese dostatečný náboj pro to, aby dokázal interagovat s kladně nabitou sondou.

V rámci práce byl diskutován také vliv vyhodnocování výsledků, neboť analýza je nejkompexnější částí a je důležité, aby byly eliminovány chyby způsobené špatným vyhodnocením naměřených dat. Je třeba přistupovat s velkou kritikou k aplikaci matematického modelu na naměřená data.

Závěrem lze říci, že se podařilo navrhnout experimenty pro ověření difúzních vlastností zvolených systémů. Jednou ze stěžejních částí je správná volba fluorescenční sondy, díky které pak získáme informace o systému.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NECAS, J., BARTOSIKOVA, L.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, vol. 53, no. 8, s. 397–411
- [2] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, no. 1, s. 17–25
- [3] POGÁNY, P., KOVÁCS, A.: Theoretical study of hyaluronan oligosaccharides. *Structural chemistry*, 2010, vol. 21, no. 6, s. 1185–1194
- [4] FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, 242(1): 27–33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x. ISSN 09546820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>
- [5] REED, R. K., K. LILJA a T. C. LAURENT. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1988, 134(3): 405–411. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1988.tb08508.x. ISSN 00016772. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08508.x>
- [6] PETHRICK, R. A.: *Handbook of Polymer Research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites*. New York: NOVA PUBLISHERS, 2007. 459 s. ISBN 978-1-60021-652-0.
- [7] ROHRICH, R. J., GHAVAMI, A, CROSBY M. A.: The role of hyaluronic acid Fillem (Restylane) in facial cosmetic Sumery: review and technical considerations. *Plastic and reconstructive surgery*, 2007, vol. 120, no. 6, s. 41–54
- [8] SCOTT, J.E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *The FASEB journal*. 1987, : 2639–45. ISSN 0892-6638.
- [9] SCOTT, J E, C CUMMINGS, A BRASS a Y CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, 274(3): 699–705. DOI: 10.1042/bj2740699. ISSN 0264-6021. Dostupné také z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj2740699>
- [10] SCOTT, J. E. Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications. DOI: 10.1002/9780470513774.ch2. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470513774.ch2>
- [11] HASCALL, V. C., LAURENT, T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* Glycoforum [online]. 1997, [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [12] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Schiller, J., Mendichi, R. Hyaluronic acid: its function and degradation in in vivo systems. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 34 (2008) 789–882.
- [13] LIU, L., LIU, Y.: *Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges and perspectives* Microbial Cell Factories [online]. 2011, [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/P/Df/1475-2859-10-99.pdf>
- [14] PEYRATOUT, Claire, Edwin DONATH a Lars DAEHNE. Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2001, 142(1), 51–57. DOI: 10.1016/S1010-6030(01)00490-7. ISSN 10106030. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603001004907>

- [15] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.
- [16] *Draselný iont a poruchy jeho homeostázy* [online], [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/?p=2848>
- [17] PINERI, Michel a A EISENBERG. *Structure and properties of ionomers*. Norwell, MA, U.S.A.: Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers, c1987, xvi, 581 p. NATO ASI series, no. 198. ISBN 90-277-2458-X.
- [18] ZEBROWSKI, B. E. a G. G. FULLER. Rheo-Optical Studies of Polyelectrolyte Solutions in Simple Shear Flow. *Journal of Rheology*. 1985, č. 29.
- [19] ROGERS, Frederick B. a Shuan C. LI. Acute Colonic Necrosis Associated with Sodium Polystyrene Sulfonate (Kayexalate) Enemas in a Critically Ill Patient: Case Report and Review of the Literature. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2001, 51(2), 395-397. DOI: 10.1097/00005373-200108000-00031. ISSN 0022-5282.
- [20] GÁLVEZ, Erik, Pedro ROMEA a Fèlix URPI. Stereoselective Synthesis of anti α -Methyl- β -Methoxy Carboxylic Compounds. *Organic Syntheses*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2003, , 81. DOI: 10.1002/0471264229.os086.09. ISBN 0471264229. ISSN 2333-3553.
- [21] SEIFTER, J.L. *Potassium disorders*. [EDITED BY] LEE GOLDMAN, Andrew I. Cecil Medicine Expert Consult Premium Edition. 24th ed. London: Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN 1437736084.
- [22] Sodium polystyrene sulfonate. In: Medications.li: Health information and media syndication[online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://www.medications.li/medications/sodium-polystyrene-sulfonate>
- [23] RONCA, Francesca, Lina PALMIERI, Patrizia PANICUCCI a Giovanni RONCA. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998, 6, 14-21. DOI: 10.1016/S1063-4584(98)80006-X. ISSN 10634584. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S106345849880006X>
- [24] YAMAGUCHI, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, 57(2), 276-289. DOI: 10.1007/PL00000690. ISSN 1420-682x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/PL00000690>
- [25] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3. Dostupné také z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-745-3
- [26] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupné z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [27] COSTANTINO, Lucia; GUARINO, Gennaro; ORTONA, Ornella; VITAGLIANO, Vincenzo. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1984, 29, s. 62-66
- [28] LAURETTI, Flávio, et al. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods*. December 2003, 114, 1, s. 29-35
- [29] TAN, J. S.; SCHNEIDER, R. L. Dye Binding and Its Relation to polyelectrolyte Conformation. *The Journal of Physical Chemistry*. 1975, Vol. 79, No. 14, s. 1380-1386

- [30] GHASEMI, Jahanbakhsh, Ali NIAZI a Mikael KUBISTA. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titration and chemometrics method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005, vol. 62, 1–3, s. 649–656. DOI: 10.1016/j.saa.2005.02.012.
- [31] SHANKARLING, G. S. a K. J. JARAG. Laser Dyes. *Resonance*. 2010, Number 9, s. 804–818.
- [32] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [33] FISCHER, M a J GEORGES. Use of thermal lens spectrometry for the investigation of dimerization equilibria of rhodamine 6G in water and aqueous micellar solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1997, vol. 53, issue 9, s. 1 419–1 430. DOI: 10.1016/S0584-8539(97)00027-5.
- [34] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [35] PENZKOFER, A. a W. LEUPACHER. Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions. *Journal of Luminescence*. 1987, vol. 37, issue 2, s. 61–72. DOI: 10.1016/0022-2313(87)90167-0.
- [36] ZHANG, Xian-Fu, Yakui ZHANG a Limin LIU. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: Structural effect on emission mechanism in different solvents. *Journal of Luminescence*. 2014, vol. 145. DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.07.066.
- [37] MARTIN, Bruce a Frederick S. RICHARDSON. Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1979, 12(02): 181-. DOI: 10.1017/S0033583500002754. ISSN 0033-5835. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0033583500002754
- [38] JABŁOŃSKI, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik*. 1935, 94(1-2): 38-46. DOI: 10.1007/BF01330795. ISSN 1434-6001. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01330795>
- [39] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jörg ENDERLEIN. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [40] STOKES, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1852, 142: 463-562. DOI: 10.1098/rstl.1852.0022. ISSN 0261-0523. Dostupné také z: <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1852.0022>
- [41] WÜRTHNER, Frank, Theo E. KAISER a Chantu R. SAHA-MÖLLER. J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, 50(15): 3376-3410. DOI: 10.1002/anie.201002307. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201002307>
- [42] SCHEIBE, G., L. KANDLER a H. ECKER. Polymerisation und polymere Adsorption als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von organischen Farbstoffen. *Die*

- Naturwissenschaften*. 1937, 25(5): 75-75. DOI: 10.1007/BF01493278. ISSN 0028-1042. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01493278>
- [43] KASHA, M., H. R. RAWLS a M. ASHRAF EL-BAYOUMI. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*. 1965-01-1, 11(3-4): -. DOI: 10.1351/pac196511030371. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1965.11.issue34/pac196511030371/pac196511030371.xml>
- [44] LIANG, W Y. Excitons. *Physics Education*. 5(4): 226-228. DOI: 10.1088/0031-9120/5/4/003. ISSN 00319120. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0031-9120/5/i=4/a=003?key=crossref.7b2e23175245127b3f5e590926c56103>
- [45] BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*. 2007-01-1, 79(3): -. DOI: 10.1351/pac200779030293. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2007.79.issue3/pac200779030293/pac200779030293.xml>
- [46] MISHRA, Amaresh, Rajani K. BEHERA, Pradipta K. BEHERA, Bijaya K. MISHRA a Gopa B. BEHERA. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chemical Reviews*. 2000, 100(6): 1973-2012. DOI: 10.1021/cr990402t. ISSN 0009-2665. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr990402t>
- [47] DOOSE, Sören, Hannes NEUWEILER a Markus SAUER. A Close Look at Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *ChemPhysChem*. 2005, 6(11): 2277-2285. DOI: 10.1002/cphc.200500191. ISSN 1439-4235. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200500191>
- [48] HEINLEIN, Thomas, Jens-Peter KNEMEYER, Oliver PIESTERT a Markus SAUER. Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, 107(31): 7957-7964. DOI: 10.1021/jp0348068. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0348068>
- [49] SEIDEL, Claus A. M., Andreas SCHULZ a Markus H. M. SAUER. Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, 100(13): 5541-5553. DOI: 10.1021/jp951507c. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp951507c>
- [50] MATAGA, Noboru a Tanekazu KUBOTA. Molecular interactions and electronic spectra. New York, N.Y: Dekker, 1970, xi, 504 p. ISBN 978-082-4714-444.
- [51] SCHWILLE, Petra and Elke HAUSTEIN. Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications. *Biophysics Textbook Online* [online]. 2004. [cit. 2014-11-16] DOI: 10.1.1.405.2487. Article availability: <http://www.biophysics.org/Portals/1/P/DFs/Education/schwille.pdf>
- [52] KAPUSTA, Peter, Michael WAHL, Aleš BENDA, Martin HOF a Jörg ENDERLEIN. Application Note: FLCS - Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. PicoQuant GmbH [online]. Germany, 2006 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7272/appnote_flcs.pdf
- [53] GREGOR, Ingo, Jörg ENDERLEIN a R. LOPEZ-DELGADO. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy.

- Photochemical*. 2007, vol. 6, issue 1, s. 615-620. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-1634-4_32
- [54] HUMPOLÍČKOVÁ, Jana, Aleš BENDA, Jan SÝKORA, Radek MACHÁŇ, Teresa KRAL, Barbara GASINSKA, Joerg ENDERLEIN a Martin HOF. Equilibrium Dynamics of Spermine-Induced Plasmid DNA Condensation Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2008, vol. 94, issue 3, L17-L19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.122408>.
- [55] RICH, Ryan M., Mark MUMMERT, Zeno FOLDES-PAPP, Zygmunt GRZYCZYNSKI, Julian BOREJDO, Ignacy GRZYCZYNSKI a Rafal FUDALA. Detection of hyaluronidase activity using fluorescein labeled hyaluronic acid and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012, 116: 7-12. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.07.007. ISSN 10111344. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134412001637>
- [56] VUKOJEVIĆ, V., A. PRAMANIK, T. YAKOVLEVA, R. RIGLER, L. TERENIUS a G. BAKALKIN. Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62(5): 535-550. DOI: 10.1007/s00018-004-4305-7. ISSN 1420-682x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4305-7>
- [57] ZETTL, Heiko, Ute ZETTL, Georg KRAUSCH, Jörg ENDERLEIN a Matthias BALLAUFF. Direct observation of single molecule mobility in semidilute polymer solutions. *Physical Review E*. 2007, vol. 75, issue 6, s. -. DOI: 10.1103/PhysRevE.75.061804. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.75.061804>
- [58] MICHELMAN-RIBEIRO, Ariel, Ferenc HORKAY, Ralph NOSSAL a Hacène BOUKARI. Probe Diffusion in Aqueous Poly(vinyl alcohol) Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biomacromolecules*. 2007, vol. 8, issue 5, s. 1595-1600. DOI: 10.1021/bm061195r.
- [59] FALCONE, R. Darío, N. Mariano CORREA, M. Alicia BIASUTTI a Juana J. SILBER. Acid-Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in n - Heptane/AOT/Water Reverse Micelles. *Langmuir*. 2002, 18(6): 2039-2047. DOI: 10.1021/la011411b. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la011411b>
- [60] SARANGI, Manas Kumar a Samita BASU. Photophysical behavior of acridine with amines within the micellar microenvironment of SDS: a time-resolved fluorescence and laser flash photolysis study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011, 13(37): 16821-. DOI: 10.1039/c1cp20844f. ISSN 1463-9076. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1cp20844f>
- [61] NGEN, Ethel J., Pallavi RAJAPUTRA a Youngjae YOU. Evaluation of delocalized lipophilic cationic dyes as delivery vehicles for photosensitizers to mitochondria. *Bioorganic*. 2009, 17(18): 6631-6640. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.07.074. ISSN 09680896. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089609007421>
- [62] KONONOV, Alexei I., Evgeniya B. MOROSHKINA, Nikolai V. TKACHENKO a Helge LEMMETYINEN. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study. *The Journal of*

- Physical Chemistry B*. 2001, 105(2): 535-541. DOI: 10.1021/jp002615o. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp002615o>
- [63] GHOSH, Amit K., Avik SAMANTA a Prasun BANDYOPADHYAY. Cu 2 -Induced Micellar Charge Selective Fluorescence Response of Acridine Orange: Effect of Micellar Charge, pH, and Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011,115(41): 11823-11830. DOI: 10.1021/jp206644b. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp206644b>
- [64] MARKARIAN, Shiraz A. a Gohar A. SHAHINYAN. The effect of dimethylsulfoxide on absorption and fluorescence spectra of aqueous solutions of acridine orange base. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015,151: 662-666. DOI: 10.1016/j.saa.2015.06.126. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142515300238>
- [65] WANG, Fei, Jinghe YANG, Xia WU, Xiaobo WANG, Lishun FENG, Zhen JIA a Changying GUO. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, 298(2): 757-764. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.01.028. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706000348>
- [66] WEI, Xiaoling, Xiaojun WANG, Qi GONG, Lisheng WANG a Shiwu ZHOU. Enhanced fluorescence quenching in an acridine orange – alizarin red system through matrine and its analytical application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, 134: 413-418. DOI: 10.1016/j.saa.2014.06.115. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142514010142>
- [67] BHATTACHARJEE, J., S.A. HUSSAIN a D. BHATTACHARJEE. Control of H-dimer formation of acridine orange using nano clay platelets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013,116: 148-153. DOI: 10.1016/j.saa.2013.07.018. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142513007555>
- [68] KUSUZAKI, Katsuyuki, Katsuyuki KUSUZAKI, Takao MATSUBARA, Haruhiko SATONAKA, Toru WAKABAYASHI a Akihiko MATSUMINE. Acridine Orange could be an Innovative Anticancer Agent under Photon Energy. *IN VIVO*. 2007, **21**(2): 205-214. ISSN 0258-851X. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/6391120_Acridine_Orange_could_be_an_Innovative_Anticancer_Agent_under_Photon_Energy
- [69] LAMM, Michael E. a David M. NEVILLE. The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry*. 1965, **69**(11): 3872-3877. DOI: 10.1021/j100895a039. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100895a039>
- [70] YUNJING, Luo a Shen HANXI. Study on Acridine Orange dimer as a new fluorescent probe for the determination of protein. *Analytical Communications*. 1999, **36**(4): 135-137. DOI: 10.1039/a900601j. ISSN 13597337. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a900601j>
- [71] VITAGLIANO, Vincenzo. Interaction between Cationic Dyes and Polyelectrolytes. Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry. *Dordrecht: Springer Netherlands*, 1975, , 437. DOI: 10.1007/978-94-010-1855-5_50.

- ISBN 978-94-010-1857-9. ISSN 1389-2185. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-010-1855-5_50
- [72] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la502011s>
- [73] KAPUSTA, Peter. Application Note: Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration. PicoQuant GmbH [online]. 2010 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7353/appnote_diffusioncoefficients.pdf
- [74] Weigel, P. H.: Bacterial Hyaluronan synthases. Glycoforum [online], 1998, [cit. 30. 12. 2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [75] SCHEIBE, G. Lichtabsorption und Energiefortleitung bei lockeren Komplexen organischer Farbstoffe. Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie. Halle: Knapp, 1941, (47): 73-80. DOI: 10.1002/bbpc.19410470114. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbpc.19410470114/abstract>
- [76] JELLEY, EDWIN E. Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State. *Nature*. 1936, 138(3502): 1009-1010. DOI: 10.1038/1381009a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/1381009a0>
- [76] WANG, Fei, et al. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, 298, s. 757-764. Dostupný také z WWW: www.sciencedirect.com
- [77] ŽÁKOVÁ, M.: Optická emisní spektroskopie dohasínajícího plazmatu ve směsi dusíkargon. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 54 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.
- [78] RABINOWITCH, Eugene a Leo F. EPSTEIN. Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue 1. *Journal of the American Chemical Society*. 1941, 63(1), 69-78. DOI: 10.1021/ja01846a011. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01846a011>
- [79] MICHAELIS, L. The Reversible Polymerization and Molecular Aggregation. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*. 1950, 54(1), 1-17. DOI: 10.1021/j150475a001. ISSN 0092-7023. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150475a001>
- [80] SCHWARZ, Gerhard, Sigmar KLOSE a Wolff BALTHASAR. Cooperative Binding to Linear Biopolymers. 2. Thermodynamic Analysis of the Proflavine-Poly(l-Glutamic Acid) System. *European Journal of Biochemistry*. 1970, 12(3), 454-460. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00872.x. ISSN 0014-2956. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00872.x>
- [81] ZEHENTBAUER, Florian M., Claudia MORETTO, Ryan STEPHEN, Thangavel THEVAR, John R. GILCHRIST, Dubravka POKRAJAC, Katherine L. RICHARD a 70 Johannes KIEFER. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, vol. 121, s. 147–151. DOI: 10.1016/j.saa.2013.10.062.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratk

AO	Akridinová oranž
AP/D	lavinová fotodioda
AR	Alizarinová červeň
CBB	Coomassie brilantní modř
Cnts	counts (počet fotonů prošlých jednotkovým objemem za jednotku času)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy (fluorescenční korelační spektroskopie)
FLCS	Fluorescence life-time correlation spectroscopy (časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie)
HA	Hyaluronan
HAS1-3	hyaluronansyntázy
GAG	glykosaminoglykany
IRF	instrument response function (funkce přístrojové odezvy)
LDPE	polyetylen s nízkou hustotou
POPOP	1,4-bis(5- phenyloxazol-2-yl)benzen
PSSS	polystyren sulfonát sodný
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	Dodecyl sulfonát sodný
TCSPC	Time-correlated single photon counting (metoda časově korelovaného čítání fotonů)

8.2 Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
C	koncentrace částic
D	difúzní koeficient
δ	okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty
$G(\tau)$	autokorelační funkce
Γ	rychlost emise fluoroforu
I	intenzita signálu
k	Boltzmannova konstanta
η	počet fotonů detekovaných z jedné molekuly za jednu sekundu
N	počet molekul
r	hydrodynamický poloměr
T	celkový čas
τ_D	difúzní čas
τ_r	tripletní čas
τ_n	doba života fluoroforu
V_{eff}	efektivní objem
W	prostorové rozložení emitovaného světla
w_0	charakteristický rozměr detekčního objemu v ohniskové rovině objektivu
z_0	charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu