

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

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ POLYSACHARIDŮ

FLUORESCENCE LABELING OF POLYSACCHARIDES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTORPRÁCE

AUTHOR

Viktória Mrázová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1395/2018 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Viktória Mrázová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Fluorescenční značení polysacharidů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na postupy kovalentního vázání fluoroforů na polysacharidy.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodné postupy pro vázání fluoroforů na dextran, hyaluronan a chitosan nebo jejich deriváty.
- 3) Otestovat nalezené postupy přípravou kovalentně značených polymerů a pomocí technik dostupných na FCH prokázat kovalentní vázání fluoroforů.
- 4) Zhodnotit použité postupy a porovnat ekonomickou náročnost ve srovnání s nákupem komerčně dostupných analogů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Viktória Mrázová
student(ka)

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiom fluorescenčne značených polysacharidov. Predmetom práce bolo pripraviť a charakterizovať fluorescenčne značený dextrans, chitosan, hyaluronan a ich deriváty. Tieto látky boli pripravené naviazaním fluorescenčnej značky na polysacharid kovalentnou väzbou. Najskôr boli pripravené vzorky polysacharidu, ktoré boli označené fluorofórom. Ako vhodné pre túto metódu boli navrhnuté kombinácie FITC+dextrans, FITC+chitosan a fluoresceínamin+hyaluronan. Následne boli vzorky charakterizované pomocou merania na fluorescenčnom spektrometri, kde boli premerané fluorescenčné vlastnosti roztokov jednotlivých značených polysacharidov. Meraním bolo zistené, či vznikli kovalentné väzby medzi fluorescenčnou značkou a polysacharidmi. Nakoniec bola porovnaná ekonomická náročnosť výroby týchto látok v porovnaní s nákupom komerčných analógov.

ABSTRACT

This bachelor's dissertation deals with the study of fluorescence-marked polysaccharides. The aim of this project was to develop and define fluorescence-marked dextran, chitosan, hyaluronan, and their derivatives. These substances were developed by binding a fluorescent marker and a polysaccharide through covalent bonding. First, we developed samples of a polysaccharide that were marked with a fluorophore. For utilising this method, we considered suitable the following combinations: FITC+ dextran, FITC+ chitosan, and fluorescein amine+ hyaluronan. Following this, we defined these samples using a fluorescence spectrometer, which allowed us to measure the fluorescence properties of the derivatives of the selected marked polysaccharides. Using this measuring method, we found that a covalent bond does occur between the fluorescent marker and the polysaccharides. Finally, we compared the economic cost of developing these substances, as opposed to buying them commercially.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

polysacharid, hyaluronan, dextrans, chitosan, fluoresceín izotiokyanát, fluorescencia

KEYWORDS

polysaccharide, hyaluronan, dextran, chitosan, fluorescein isothiocyanate, fluorescence

MRÁZOVÁ, Viktória. *Fluorescenční značení polysacharidů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113585>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa chcela pekne poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, pripomienky, cenné rady a čas, ktorý mi venoval. Taktiež by som sa rada poďakovala mojej rodine za ich podporu počas štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Polysacharidy	8
2.1.1	Štruktúra a vlastnosti	8
2.1.2	Využitie	8
2.2	Dextrán	8
2.2.1	Štruktúra a vlastnosti	8
2.2.2	Využitie	9
2.2.3	Dextrán DEAE	10
2.3	Chitosan	11
2.3.1	Štruktúra a vlastnosti	11
2.3.2	Využitie	12
2.4	Trimetylchitosan	12
2.4.1	Štruktúra a vlastnosti	12
2.4.2	Využitie	13
2.5	Hyaluronan	13
2.5.1	Štruktúra a vlastnosti	13
2.5.2	Využitie	14
2.6	Luminiscencia	15
2.7	Fluorescencia	15
2.7.1	Princíp fluorescencie	16
2.7.2	Intenzita fluorescencie	16
2.7.3	Jabloňského diagram	17
2.7.4	Stokesov posun	18
2.7.5	Lambert – Beerov zákon	19
2.7.6	Kvantový výťažok	19
2.7.7	Zhášanie fluorescencie	20
2.7.8	Emisné a excitačné spektrum	20
2.7.8.1	Absorpcia žiarenia	20
2.7.8.2	Emisia žiarenia	20
2.7.9	Spektrofluorometer	21

2.7.10	Fluorescenčné značky	22
2.7.10.1	Fluoresceín izotiokyanát	24
2.7.10.2	Fluoresceínamín	25
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	26
3.1	Fluorescenčné značenie chitosanu a jeho derivátov	26
3.2	Fluorescenčné značenie hyaluronanu	27
3.3	Fluorescenčné značenie dextránu	28
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1	Použité chemikálie a prístroje.....	31
4.2	Príprava fluorescenčne značených polysacharidov	32
4.2.1	Syntéza FITC- dextránu DEAE.....	32
4.2.2	Syntéza FITC- chitosanu	33
4.2.3	Syntéza FITC- trimetylchitosanu	33
4.2.4	Syntéza fluoresceíamín-hyaluronanu	34
4.3	Metódy merania	34
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
5.1	FITC-Dextrán	35
5.2	FITC-Chitosan	40
5.3	FITC-trimetylchitosan	41
5.4	Fluoresceínamín-hyaluronan	41
5.5	Ekonomická náročnosť	42
6	ZÁVER.....	44
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	45
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	52
8.1	Použité skratky	52
8.2	Použité symboly	53

1 ÚVOD

Prvá zmienka o fluorescencii bola opísaná v 16. storočí vďaka pozorovaniu obličkového dreva (lat. *lignum nephriticum*). Ďalším významným objavom bola v 19. storočí fluorescencia fluoritov. Významný objav vo fluorescencii priniesol George G. Stokes, a to Stokesov posun. Fluorescencia ako veda zaznamenala v 20. storočí obrovský posun vo výskume. Dnes sa fluorescenčné metódy využívajú v rôznych oblastiach vedy a výskumu. Vďaka moderným prístrojom a novým metódam sa fluorescencia dostáva stále viac do popredia.

Polysacharidy sú polymérne sacharidy, tvorené monosacharidovými podjednotkami. Pre polysacharidy sa využíva obecný vzorec $C_n(H_2O)_{n-1}$. Sú nerozpustné vo vode (len napučievajú) a nemajú sladkú chuť. Polysacharidy tvoria veľmi rozšírenú skupinu látok. Majú rôzne funkcie (zásobné alebo stavebné). Ich štruktúra je od lineárnej až po veľmi rozvetvenú. Ak sa molekula polysacharidu skladá z jedného druhu monosacharidových jednotiek, hovoríme o homopolysacharide. Heteropolysacharid označuje polysacharid tvorený z rôznych druhov monosacharidových jednotiek. Polysacharidy majú veľa praktických využití. Ľudia konzumujú polysacharidy ako súčasť stravy. Od staroveku ľudia pestovali plodiny, napríklad pšenicu, ryžu či iné zrná. Chápali, že potrebujú konzumovať tieto potraviny ako zdroj energie. Polysacharidy sa využívajú taktiež pri liečbe bakteriálnych infekcií. Niektoré polysacharidy chránia bunky pred škodlivými baktériami.

Vzhľadom k tomu, že fluorescenčné značenie polysacharidov u nás na fakulte ešte nebolo skúmané, nasledujúca bakalárska práca je zameraná na vyhľadávanie postupov kovalentného naviazania fluorescenčnej značky na vybrané polysacharidy. K týmto účelom boli vybraté najvhodnejšie postupy pre viazanie fluorofórov na dextrán, hyaluronan, chitosan a ich deriváty, a to naviazanie FITC na dextrán a chitosan, fluoresceínaminu na hyaluronan. Týmto postupmi boli pripravené kovalentne značené polyméry. Pomocou techník, ktoré sú dostupné na Fakulte chemickej sa vie dokázať vznik kovalentnej väzby medzi fluorescenčnou značkou a polysacharidom. Meranie sa uskutočnilo pomocou fluorescenčnej spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polysacharidy

Termín "sacharid" pochádza z gréckeho slova sakchar, čo znamená "cukor alebo sladkosť" [1].

2.1.1 Štruktúra a vlastnosti

Polysacharidy môžu byť definované ako kondenzačné polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou (niekoľko miliónov daltonov) založené na jednoduchých monosacharidových jednotkách. Jedna monosacharidová jednotka je spojená s ďalšou monosacharidovou jednotkou glykozidickou väzbou [2]. Termín polysacharid sa používa pre materiály, ktoré obsahujú viac ako desať cukrových zvyškov. Polysacharidy môžu byť homopolyméry (napríklad glykogén, škrob, celulóza), ktoré obsahujú iba jeden typ monomérnych zvyškov alebo heteropolyméry, ktoré pozostávajú z dvoch alebo viacerých rôznych typov monosacharidových jednotiek. Heteropolysacharidy majú zložité štruktúry a môžu tiež byť kovalentne spojené s proteínmi a lipidmi (napríklad proteoglykány a glykosfingolipidy) [3] [4]. Môžu byť neutrálne (napríklad galaktomány, pullulány, dextrány), polyaniónové (alginát, pektín, xantán) alebo polykatiónové (chitosany, aminocelulózy) [5]. Polysacharidy môžu byť vo vode nerozpustné, tvoriť pravé roztoky, koloidné disperzie a gély. V zmiešaných polysacharidových systémoch môžu byť polyméry rozptýlené a vytvárajú množstvo interaktívnych stavov [6].

2.1.2 Využitie

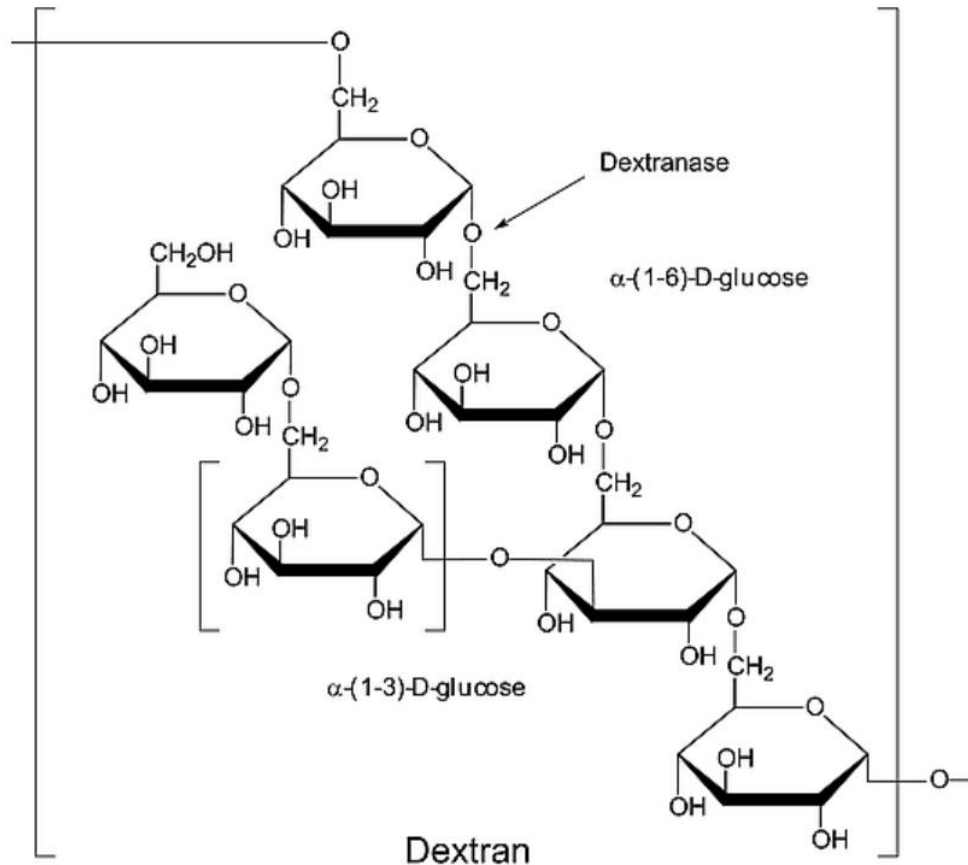
Polysacharidy sú prirodzené makromolekuly univerzálneho výskytu v živých organizmoch [2]. Sú v prírode široko distribuované a sú produkované všetkými organizmami vrátane rastlín, zvierat a mikroorganizmov. Tieto molekuly majú rôzne biologické funkcie, ako je skladovanie energie či ako bunková komunikácia [3]. Môžu sa vyskytovať ako funkčné a štruktúrne zložky buniek (napr. glykoproteíny a glykolipidy) [1].

2.2 Dextrán

2.2.1 Štruktúra a vlastnosti

Dextrány, ktoré sa produkujú hlavne z druhov *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Weissella*, sa líšia stupňom a typom vetvy, dĺžkou reťazca, distribúciou molekulovej hmotnosti a konformáciou polymérneho reťazca [7][8]. Okrem procesu prirodzenej fermentácie môže byť dextrán chemicky syntetizovaný pomocou katiónovej polymerizácie. Výskyt týchto baktérií v rafinériách cukru je zodpovedný za problémy v procesoch filtrácie kvôli zvýšenej viskozite prítomnosťou rozpustného dextránu [9]. Dextrán spomaľuje rýchlosť kryštalizácie sacharózy a nepriaznivo ovplyvňuje tvar kryštálu [10].

Dextrán je homopolymér pozostávajú z glukánu viazaného α -(1 \rightarrow 6) s bočnými reťazcami pripojenými do polôh troch základných jednotiek glukózy [9][10]. Okrem chemickej modifikácie a degradácie kostry polyméru, NMR spektroskopia je jednou z najdôležitejších metód získavania podrobných informácií o jeho štruktúre [11][12].



Obrázok 1: Vzorec dextránu [13]

Dextrán je ľahko rozpustný vo vode, dimetylsulfoxide, formamide, etylénglykole, glycerole. Je vysokomolekulárny a hydrolyzuje iba za vysoko kyslých alebo alkalických podmienok [14]. Syntetický dextrán má vlastnosti podobné prírodnému produktu, čo sa týka rozpustnosti, optickej rotácie a spektroskopických charakteristík. Molekulová hmotnosť natívneho dextránu je od $9 \cdot 10^6$ do $500 \cdot 10^6$ g/mol, môže sa určiť rozptylom svetla, ultracentrifugáciou či viskozimetriou. Reaktivita dextránu zahŕňa predovšetkým štúdium relatívnej reaktivity sekundárnych ekvatoriálne orientovaných hydroxylových skupín. Malé percento hydroxylových skupín v dextráne je primárnych, hoci tento údaj sa mierne zvyšuje pri nízkych molekulových hmotnostiach v dôsledku príspevku z neredukujúcich koncových skupín [10].

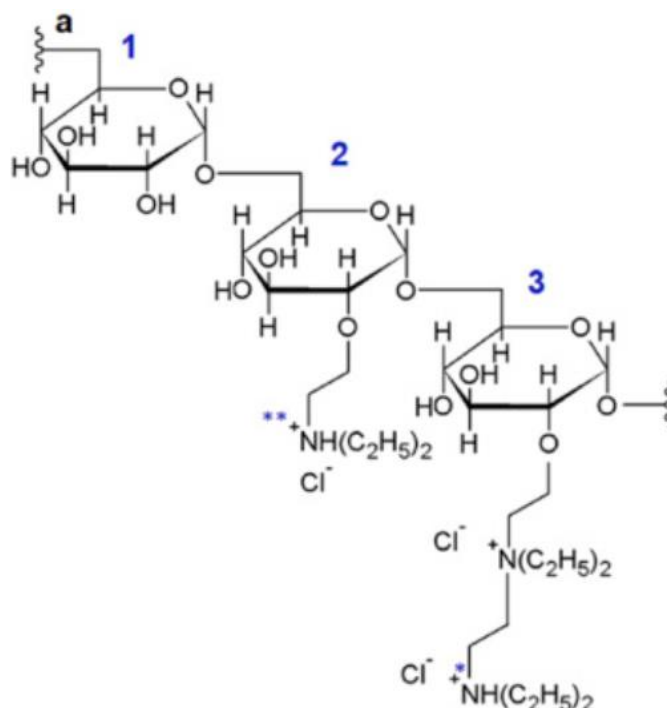
2.2.2 Využitie

Dextrán s molekulovou hmotnosťou 40 000, 60 000 a 70 000 g/mol (označený ako dextrán 40, 60 a 70) v 6 alebo 10 % vodných roztokoch, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii,

sa využívajú na nahradenie miernych krvných strát. Polymér v podstate nahradzuje krvné proteíny, napríklad albumíny. Antitrombotický účinok klinických dextransových frakcií poskytuje profylaktické liečenie hlbokaj žilovej trombózy a pooperačnej pľúcnej embólie [24]. Známý dextrans produkovaný *Leuconostoc mesenteroides* B-512F sa široko používa ako náhrada krvnej plazmy kvôli nízkej antigénnosti, vysokej rozpustnosti vo vode a vysokej biologickej stability v ľudskom krvnom obeh. Dextrans produkované *Leuconostoc* sa tiež aplikujú v potravinách (pekárske výrobky) a v chemickom priemysle [15][16][17]. Aplikácia dextrans sa rozširuje na produkty starostlivosti o oči a starostlivosť o pokožku kvôli ich vynikajúcej biokompatibilite, zvlhčujúcim vlastnostiam a stabilite [18]. Dextrans našiel tiež popularitu v oblasti tkanivového inžinierstva, pretože môže byť enzymaticky degradovaný dextranázou, ktorá sa nachádza v tkanive cicavcov [19]. Mikročastice dextransu sú študované pre biomedicínske aplikácie od liekov a bunkovej terapie po diagnostiku a biosenzory [20].

2.2.3 Dextrans DEAE

Dextrans môže byť prispôbený tak, aby bol stabilnejší a lepšie prispôsobivý. Napríklad derivát dextransu s vysokou molekulovou hmotnosťou, polykatiónový polymér DEAE dextrans. DEAE-dextrans je chemicky modifikovaný dextrans, kde spájanie s dietylamoetyllovými skupinami vedie k amidácii dextransového reťazca a tým k protonácii [23]. Vykazuje zlepšené adjuvantné vlastnosti proti slintačke, krívačke či venezuelskej encefalomyelitíde koní u cicavcov [21]. Dietylamoetyl-dextrans (DEAE-Dx) má vynikajúce vlastnosti, ako je biologická odbúrateľnosť [22]. Taktiež je to biokompatibilný derivát s farmakologickými a terapeutickými vlastnosťami [24].



Obrázok 2: Chemická štruktúra DEAE- dextransu [23]

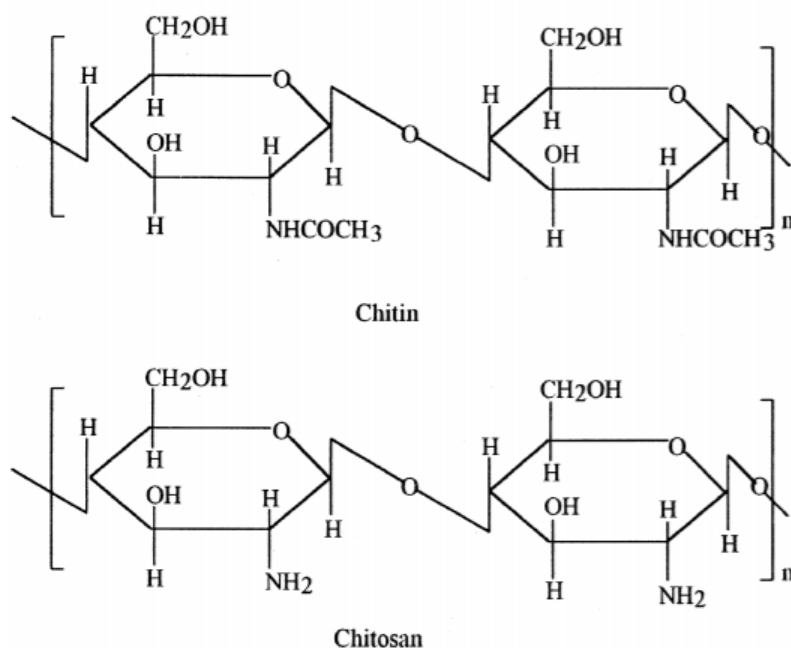
2.3 Chitosan

2.3.1 Štruktúra a vlastnosti

Chitosan alebo (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukán patrí medzi kationové polyméry. Získava sa N-deacetyláciou chitínu, jedným z najpočetnejších prirodzene sa vyskytujúcich polysacharidov [25]. Niektoré kvasinky a huby, napríklad *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* či *Lentinus edodes*, majú vo svojej bunkovej stene chitín a chitosan. Môžu byť ľahko kultivované v jednoduchých živinách a použité ako alternatívny zdroj chitosanu [27]. V porovnaní s chitínom má väčšiu chemickú a biochemickú reaktivitu. Chitosan je prírodný a biologicky rozložiteľný biopolymér [26].

Molekula chitosanu má tri reaktívne centrá: primárnu aminoskupinu, primárnu hydroxyskupinu a sekundárnu hydroxyskupinu. Aminoskupina ľahko podlieha kvarternizácii, čím sa zvyšuje rozpustnosť chitosanu vo vode a tvorí komplexy s iónmi kovov. Primárna hydroxyskupina býva najčastejšie substituovaná spojovacími článkami „spacery“, na ktoré sa viaže aktívna zložka - liečivo alebo skupina, ktorá je zodpovedná za cielenie liečiva alebo zvýšenie rozpustnosti vo vode. Sekundárna hydroxyskupina je modifikovaná predovšetkým za účelom zvýšiť rozpustnosť vo vode [26]. Chitosan je rozpustný iba vo vodných roztokoch niektorých kyselín. Podlieha reakciám typickým pre amíny, z ktorých najdôležitejšie sú N-acylácia a Schiffové reakcie [28].

Chemické vlastnosti chitosanu sú nasledovné: je to lineárny polyamín, obsahuje reaktívne aminoskupiny a hydroxylové skupiny, sú to cheláty mnohých prechodných kovových iónov. Biologické vlastnosti chitosanu sú: je biokompatibilný – prírodný polymér, je biologicky odbúrateľný, bezpečný a netoxický, viaže sa na bunky cicavcov a mikrobiálne bunky, je hemostatikum a fungistikum [28].



Obrázok 3: Štruktúra chitínu a chitosanu [28]

2.3.2 Využitie

Môže sa použiť ako prostriedok na kontrolu permeability, lepidlo, činidlo na výrobu a úpravu papiera, chelatačné činidlo alebo ako chromatografický nosič. Okrem toho sa môže aplikovať na imobilizáciu enzýmov [27]. Bolo navrhnuté, že chitosan môže byť použitý na inhibíciu fibroplázie pri hojení rán a na podporu rastu tkaniva. Vlákná vyrobené z chitínu a chitosanu sú použiteľné ako absorbovateľné stehy a obvazy. Okrem ich použitia v medicínskej oblasti majú vlákna chitosanu potenciálne uplatnenie pri čistení odpadových vôd. Chitosan je kompatibilný s množstvom biologicky aktívnych zložiek obsiahnutých v kozmetických výrobkoch: starostlivosti o vlasy, starostlivosti o pleť a starostlivosti o ústnu dutinu. Môže sa používať v šampónoch a vo farbách na vlasy. Nachádza sa taktiež v krémoch, pleťových vodách či lakoch na nechty. Chitosan sa môže použiť v zubných pastách, ústnych vodách a žuvačke. Je tiež účinný pri odstraňovaní ropy a ropných produktov z odpadových vôd. Regenerovaný chitosan by mohol byť široko používaný pre také procesy, ako je osmóza, reverzná osmóza, mikrofiltrácia, odsolovanie, dialýza a hemodialýza. Biologicky odbúrateľný chitosan môže posilniť recyklovaný papier a zvýšiť ekologickosť obalov a iných výrobkov. Nahradil syntetické polyméry v oftalmologických aplikáciách (kontaktné šošovky, optická jasnosť, mechanická stabilita, dostatočná optická korekcia). Antimikrobiálne a hojivé vlastnosti rán chitosanu spolu s vynikajúcou schopnosťou tvorby filmov robia chitosan vhodný na vývoj očnej bandáže šošovky [28].

2.4 Trimetylchitosan

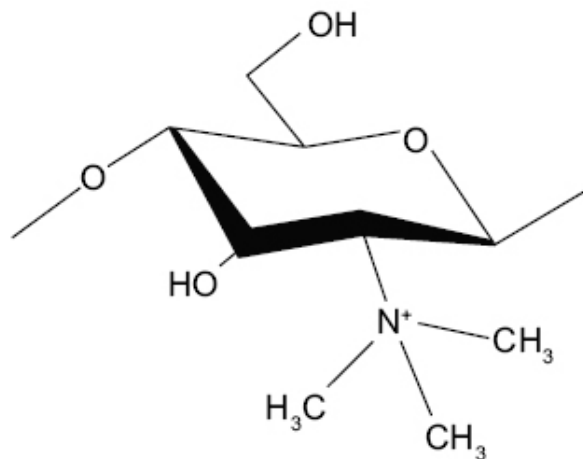
2.4.1 Štruktúra a vlastnosti

Trimetylchitosan bol prvýkrát syntetizovaný v polovici dvadsiateho storočia a vtedy bol pomenovaný ako Macramin [29]. TMC sa môže syntetizovať tromi všeobecnými metódami: nepriamou trimetyláciou, priamou trimetyláciou a ochranou hydroxylových skupín chitosanu (v polohách C-3 a C-6) O-silyláciou. Trimetylchitosan je derivát chitosanu, ktorý je pozitívne nabitý. Má oveľa širšie rozmedzie pH rozpustnosti ako nemodifikovaný chitosan v dôsledku prítomnosti protónovaných skupín ($-N^+(CH_3)_3$) [30]. Pri jednokrokovej metóde je kvarternizácia aj rozpustnosť vo vode nízka. V dvojkrokovej metóde je minimálny stupeň kvarternizácie 40 %, vo vode je optimálne rozpustný. V trojstupňovom spôsobe má výsledný polymér vyšší stupeň kvarternizácie (viac ako 80 %) kvôli dokončeniu O-metylácie, ale jeho rozpustnosť vo vode klesá v dôsledku poklesu vodíkových väzieb s vodou [31]. Tiež môže byť z veľkej časti odvodený od chitosanu reakciou s jódmetánom v prísnych bázičných podmienkach po rozpustení v N-metyl-2-pyrolidóne a pri použití jodidu sodného ako katalyzátora [32].

Jeho molekulová hmotnosť sa stanovuje gélovou permeačnou chromatografiou [32]. Polomer a polydisperzita trimetylchitosanových polymérov s rôznymi stupňami kvarternizácie sa určujú pomocou vylučovacej chromatografie (SEC) a viacnásobného rozptylu laserového svetla (MALLS) [33].

Rozpustný trimetylchitosan má mukoadhezívne vlastnosti a vynikajúci účinok zvyšujúci absorpciu aj pri neutrálnom pH. TMC je navyše atraktívnou alternatívou chitosanu pre navrhovanie proteínom nabitých častíc iónovým zosieťovaním [31].

Trimetylchitosan získal veľkú pozornosť v posledných 15 rokoch vďaka svojim vynikajúcim vlastnostiam biologickej odbúrateľnosti, biokompatibility, vynikajúcej rozpustnosti vo vode a antimikrobiálneho potenciálu. TMC môže vykazovať baktericídnu aktivitu až 700krát väčšiu ako čistý chitosan [33].



Obrázok 4: Chemická štruktúra trimetylchitosanu [32]

2.4.2 Využitie

Trimetylchitosan možno aplikovať vo farmaceutickej a lekárskej oblasti, ako aj v potravinárskom priemysle. Materiály na báze TMC, ako napríklad tenké filmy, perličky, termosenzitívne hydrogély, polyelektrolytové komplexy, nanočastice, a ďalšie môžu byť navrhnuté ako matrice pre dodávanie liečiv. Trimetylchitosanová baktericídna aktivita je najcielenejším parametrom vo farmácii a medicíne. Trimetylchitosan vykazuje svoj potenciál usmrtiť niekoľko typov baktérií, ako sú *Escherichia coli* či *Staphylococcus aureus*. Katiónová vlastnosť TMC umožňuje jeho spojenie s polyaniónovými makromolekulami, ako je napríklad heparín či alginát sodný. Trimetylchitosanové vlákno má potenciál byť použité ako zložka pre hojenie rán, taktiež sú vhodné na ortopedické aplikácie, formulácie zubných živíc [34].

2.5 Hyaluronan

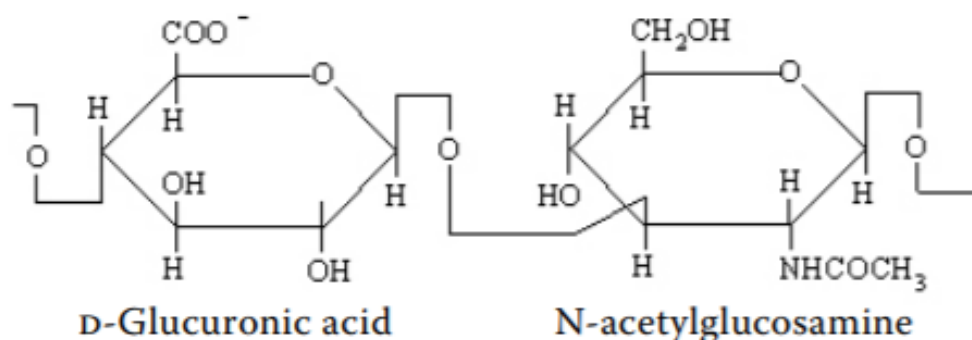
2.5.1 Štruktúra a vlastnosti

Kyselina hyalurónová sa prvýkrát spomína v roku 1934 Karlom Meyerom a jeho asistentom Johnom Palmerom. Zistili, že v sklenenom tele oka hovädzieho dobytku je priehľadná viskózna kvapalina. Vzhľadom na jej fyzikálno-chemické vlastnosti (hyalos [greek-lat.]-priesvitné, sklovité) a prítomnosť kyseliny urónovej, túto látku nazvali ako kyselina hyalurónová [35].

Dnes je táto makromolekula najčastejšie označovaná ako „hyaluronan“, čo odráža skutočnosť, že existuje in vivo ako polyanión a nie vo forme protónovej kyseliny [36].

Kyselina hyalurónová (HA) je uhľohydrát, konkrétne mukopolysacharid, vyskytujúci sa prirodzene v živých organizmoch. Je to biopolymér, ktorý má dôležité biologické funkcie v baktériách a vyšších zvieratách vrátane ľudí. Nachádza sa vo väčšine spojivového tkaniva a je koncentrovaný najmä v synoviálnej tekutine, sklovcovej tekutine oka, pupočníkových šnúrach. Hyaluronanové molekuly sú priame reťazce obsahujúce stovky alebo tisíce cukrových jednotiek (sacharidov), ktoré sú iba dvoch druhov: N-acetylglukozamín a glukuronát. Sú spojené prostredníctvom striedajúcich sa glykozidových väzieb beta- 1,4 a beta- 1,3. Tieto glykozidické väzby pozostávajú z jedného atómu kyslíka, ktorý spája jeden cukor s druhým [37]. Počet opakovaných disacharidov hyaluronanovej molekuly môže dosiahnuť 10 000 a viac, je biopolysacharid s vysokou molekulovou hmotnosťou ~ 4 milión daltonov. Priemerná dĺžka disacharidu je ~ 1 nm [36][38].

V súčasnosti existujú dve konkurenčné metódy pre priemyselnú produkciu hyaluronanu, ktoré sa extrahujú zo živočíšnych zdrojov, ako sú oči hovädzieho dobytku, hrebene kohútov a mikrobiálna produkcia pomocou veľkokapacitných fermentorov. Tradičný spôsob výroby kyseliny hyalurónovej je založený na extrakcii rozpúšťadlom zo živočíšneho tkaniva. Baktérie, o ktorých je známe, že sú schopné syntézy hyaluronan sú Streptokoky skupín A a C, Streptococcus equi, Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes a Streptococcus uberis. Baktérie Pasteurella multocida, produkujú kyselinu hyalurónovú v ich kapsulách. Streptococcus zooepidemicus produkuje HA aktivované substráty (nukleotidové cukry) prostredníctvom špecifickej viazanej membrány glykozylntransferázy, takzvané HA syntázy. Súčasný priemyselný výrobný proces je však založený na fermentácii mutovaných streptokokových buniek [39].



Obrázok 5: Chemická štruktúra kyseliny hyalurónovej [38]

2.5.2 Využitie

Hyaluronan sa nachádza primárne v extracelulárnej matrix, ale je preukázané, že sa vyskytuje aj v intracelulárnej matrix. Medzi biologické funkcie kyseliny hyalurónovej patrí údržba elaskoviskozity kvapaliny, kontrola hydratácie tkaniva a transport. Hyaluronan nie je cytotoxický, vykazuje biokompatibilitu a je dobre biologicky odbúrateľný [38].

Prvé lekárske použitie hyaluronanu pre ľudí bolo vhodné ako doplnok sklovca v očnej chirurgii koncom 50. rokov. Použitý hyaluronan bol izolovaný spočiatku z ľudského pupočníka a krátko potom z kohútových hrebeňov vo vysoko purifikovanej forme s vysokou molekulovou hmotnosťou. Tento prípravok je v súčasnej dobe široko používaný na oftalmologickú viskochirurgiu [36][37]. Jeho upevňovacie schopnosti a viskoelastické vlastnosti sú široko využívané v lekárskejších aplikáciách [40]. HA sa používa hlavne pri liečbe osteoartritídy, v kozmetike, v estetickej medicíne, chirurgii, pri lokálnom podávaní liečiva a v tkanivovom inžinierstve. Prípravky založené na lineárnej kyseline hyalurónovej sa používajú na podporu hojenia pri všeobecnej liečbe podráždenia a poranenia kože, napríklad odreniny, oblasti kožných štepov, pooperačné rezy, popáleniny prvého a druhého stupňa, metabolické a vaskulárne vredy či otlaky. V oftalmologickej chirurgii sa používajú fyziologické roztoky HA na ochranu jemných očných tkanív. V oftalmológii sa hyaluronan tiež používa ako účinná zložka mnohých očných kvapiek. Tiež je užitočný pri zvyšovaní komfortu pri aplikácii kontaktných šošoviek. Zosieťované deriváty HA nájdu uplatnenie najmä v oblasti tkanivového inžinierstva. V skutočnosti sa dermálne výplne na báze HA stali najúspešnejšími odpoveďami na súčasnú masívnu požiadavku na nechirurgickú augmentáciu mäkkých tkanív. Intradermálne injekcie HA sa využívajú na vyplnenie vrások a na zvýšenie objemu mäkkých tkanív, ako sú pery a prsia. V kozmetike sa používa ako zvlhčujúca zložka vďaka svojej hydrofilnej povahe [39].

2.6 Luminiscencia

Luminiscencia je proces, pri ktorom excitované molekuly prechádzajú do základného stavu za súčasného vyžiarovania energie – svetelného žiarenia a zanedbateľného množstva tepla [41]. Je to prebytok žiarenia nad tepelným vyžarovaním telesa v tom prípade, ak má toto prebytočné žiarenie konečnú dobu trvania, ktorá podstatne preyšuje periódu svetelných kmitov [42]. Excitovaný stav (stav s vyššou energiou) vzniká prijatím vymedzeného množstva (kvanta) energie. Takýto energetický stav je nestabilný a prechádzajú späť do základného stavu za vyžiarovania energie. Podľa druhu budiacej energie rozlišujeme niekoľko typov luminiscencie: chemiluminiscencia (premena chemickej energie) a fotoluminiscencia (energia fotónu UV- VIS žiarenia) [41].

2.7 Fluorescencia

Fluorimetria je analytická metóda využívajúca schopnosti látok vysielat' (emitovat') po predchádzajúcom prevedení do vzbuđeného (excitovaného) stavu fluorescencné žiarenie v ultrafialovej alebo viditeľnej oblasti. K prevedeniu do vzbuđeného stavu (k excitácii vzorky) je spravidla využívaná absorpcia ultrafialového alebo viditeľného žiarenia [43].

Fluorescencia je fyzikálny jav, pri ktorom molekuly niektorých látok absorbujú svetelné žiarenie určitej vlnovej dĺžky (excitácia) a časť energie, ktorú týmto spôsobom získa vo veľmi krátkom čase (10^{-15} s) opäť vyžiari (emisía) v podobe svetla s dlhšou vlnovou dĺžkou. Tento posun vo vlnovej dĺžke (Stokesov posun) súvisí so stratou časti energie nefluorescencnými procesmi (uvolnenie tepla, rezonančný prenos na okolité molekuly

a podobne). Rozdiel medzi absorpčným a emisným maximom zodpovedá práve Stokesovmu posunu. Absorpčné a emisné spektrum fluorescenčnej látky je tiež ovplyvňované podmienkami prostredia, ako je pH, koncentrácia niektorých iónov alebo konjugácie s inými molekulami [44].

Fluorescenčná spektroskopia je v súčasnej dobe široko rozšírený prístup. Intenzívny rozvoj prináša nové postupy pre detekciu štruktúr či jednotlivých molekúl. Jedným z hlavných dôvodov častého využitia fluorescenčnej spektroskopie je jej vysoká citlivosť. Fluoreskujúce molekuly môžu byť detekované pri veľmi malých koncentráciách. Zdrojom tejto vysokej citlivosti je vysoký kontrast voči pozadiu. U fluorescencie zvyčajne máme jasný (svetlý) signál na temnom pozadí. Toto je dosiahnuté použitím dvoch filtrov, ktoré nám oddelí na základe vlnových dĺžok excitačné a emisné žiarenie [44].

2.7.1 Princíp fluorescencie

V základnom stave S_0 väčšinou obsadzujú vždy dva elektróny rovnaký elektrónový stav s opačným spinom. Takýto stav molekuly je označovaný ako singletný. Po excitácii jedného valenčného elektrónu na elektrónovú hladinu môžu elektróny zachovať svoj celkový spin, čo je vyznačené radom excitovaných singletných stavov molekuly S_1 , S_2 atď. Po excitácii dva elektróny nie sú spárované a ich spinové kvantové číslo môže mať hodnotu 1. Molekula sa nachádza v stave označovanom ako tripletový (T_1 , T_2 , ...). Každý elektrónový stav je v dôsledku vibračného pohybu molekuly tvorený sériou vibračných hladín. Hladina elektrónového stavu s najnižšou vibračnou energiou je označovaná ako základná vibračná hladina elektrónového stavu. V stave tepelnej rovnováhy sa za normálnych teplôt prevažná časť molekúl nachádza na základnej vibračnej hladine stavu S_0 . Pri absorpcii žiarenia je energia absorbovaného fotónu spotrebovaná na prevedenie molekuly do excitovaného stavu [43].

Po absorpcii fotónu excitovaná molekula veľmi rýchlo odovzdáva získanú energiu svojmu okoliu a dostáva sa postupne do nižších excitovaných stavov. Pomalší býva väčšinou až nežiarivý prechod zo základnej vibračnej hladiny prvého excitovaného stavu S_1 do základného stavu S_0 . Až medzi týmito hladinami sa vedľa nežiarivých prechodov môže uplatniť prechod spojený s emisiou fotónu. Táto emisia žiarenia je označovaná ako fluorescencia. Jej doba dosvitu po prerušení excitácie býva rádovo 10^{-6} až 10^{-9} s. Väčšinou až z hladiny S_1 sa prípadne uplatní aj nežiarivý medzisystémový prechod do niektorého z tripletných stavov. Žiarivý prechod zo základnej vibračnej hladiny najnižšieho tripletného stavu T_1 do základného stavu S_0 má dlhú dobu dosvitu 10^{-3} až 10^1 s a dej sa označuje ako fosforescencia [43].

2.7.2 Intenzita fluorescencie

Intenzitu fluorescencie v rovnovážnom stave pre absorbovaný fotón je možné vyjadriť ako funkciu vlnovej dĺžky emitovaných fotónov, označených F_λ (λ_F) (v m^{-1} alebo nm^{-1}),

$$\int_0^\infty F_\lambda(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F \quad (1)$$

kde ϕ_F je kvantový výťažok fluorescence definovaný vyššie. $F_\lambda (\lambda_F)$ predstavuje fluorescenčné spektrum alebo emisné spektrum: odráža distribúciu pravdepodobnosti rôznych prechodov z najnižšej úrovne vibrácií S_1 do rôznych úrovní vibrácií S_0 . Emisné spektrum je charakteristické pre danú zlúčeninu.

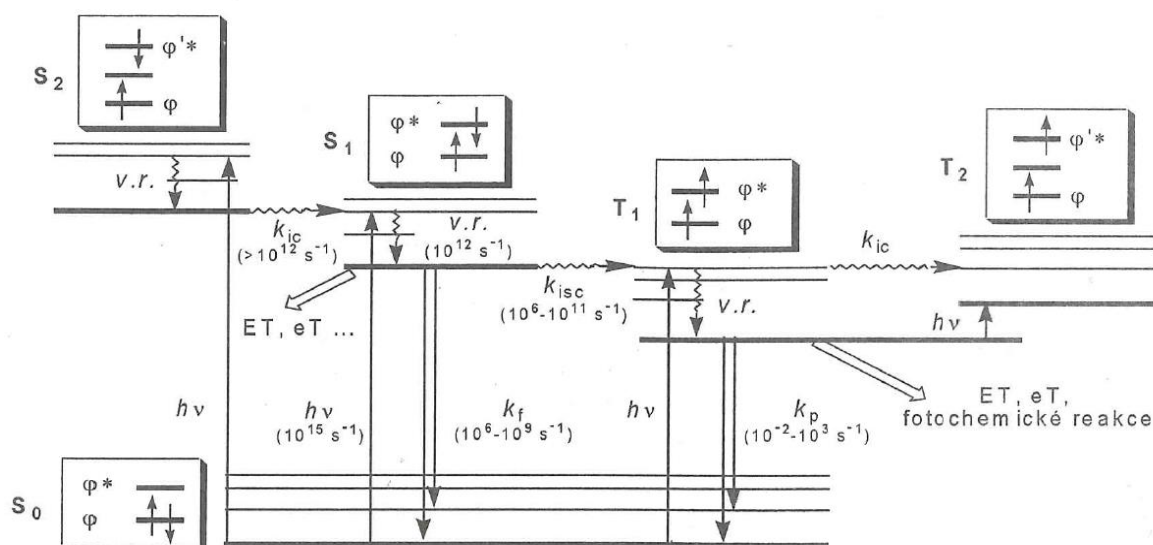
V praxi meraná intenzita fluorescence v ustálenom stave $I_F (\lambda_F)$ meraná pri vlnovej dĺžke λ_F je úmerná $F_\lambda (\lambda_F)$ a počtu fotónov absorbovaných pri excitačnej vlnovej dĺžke λ_E . Je vhodné tento počet fotónov nahradiť absorbovanou intenzitou $I_A (\lambda_E)$, ktorá je definovaná ako rozdiel medzi intenzitou dopadajúceho svetla $I_0 (\lambda_E)$ a intenzita prechádzajúceho svetla $I_T (\lambda_E)$:

$$I_A (\lambda_E) = I_0 (\lambda_E) - I_T (\lambda_E) \quad (2)$$

Ak môžeme kompenzovať vlnovú závislosť dopadajúceho svetla, jediný výraz, ktorý sa má vziať do úvahy, je $A (\lambda_E)$, ktorý predstavuje absorpčné spektrum. Korigované excitačné spektrum je totožné s absorpčným spektrom, za predpokladu, že existuje jeden druh základného stavu. Na rozdiel od toho, keď je prítomných niekoľko druhov, alebo keď ide o jediný druh existujúci v rôznych formách v základnom stave (agregáty, komplexy, tautomérne formy, atď.), excitačné a absorpčné spektrá už nie sú superponovateľné [45].

2.7.3 Jabloňského diagram

Jabloňského diagram zobrazuje relatívnu energiu molekuly v stave základnom a excitovaných stavoch pre danú nukleárnu geometriu. Predpokladá sa, že geometria všetkých stavov nie je príliš rozdielna od geometrie stavu základného. Diagram nepopisuje tvar a veľkosť molekuly a navyše vibračné hladiny zobrazené pre každý stav obvykle neodpovedajú skutočnosti. V tomto diagrame sú schematicky naznačené základné elektrónové stavy a fotochemické procesy [46].



Obrázok 6: Jablonskiho diagram (hodnoty v zátvorkách ukazujú veľkosť rýchlostných konštánt pre jednotlivé procesy) [46]

Nežiarivé procesy sú v diagrame označené vlnovkami a uskutočňujú sa medzi vibračnými rotačnými hladinami rôznych elektrónových stavov: isoenergetickými (vodorovne) alebo s rôznou energiou (zvisle). Keďže sa pri nich nemení celková energia systému, nedochádza k emisii žiarenia. Žiarivé procesy sú charakterizované prechodom molekúl z vyššieho energetického stavu na nižší (alebo naopak), teda vyžiarovaním fotónu. V diagrame sú označované ako priame šípky [46].

2.7.4 Stokesov posun

Skúmanie Jablonskiho diagramu ukazuje, že energia emisie je zvyčajne nižšia ako energia absorpcie. Fluorescencia sa typicky vyskytuje pri nižších energiách alebo dlhších vlnových dĺžkach. Tento jav bol prvýkrát pozorovaný pánom Georgeom Gabrielom Stokesom v roku 1852. Zdrojom ultrafialovej excitácie bol zabezpečený slnečným svetlom a modrým skleneným filtrom, ktorý bol súčasťou vitráže. Tento filter selektívne prenášal svetlo pod 400 nm, ktoré bolo absorbované chinínom. Fluorescencia chinínu sa vyskytuje blízko 450 nm a je ľahko viditeľná [47].

Roztok chinínu je bezfarebný, pretože sa absorbuje v ultrafialovom žiarení, ktoré nevidíme. Modrá farba prichádza len z a v blízkosti povrchu. Je to preto, že roztok chinínu je relatívne koncentrovaný a absorbuje celé UV žiarenie prvých niekoľko milimetrov. Preto pán Stokes pozoroval vnútorný efekt filtra. Po prechode cez roztok bolo svetlo "oslabené" a nebolo schopné spôsobiť modrú žiaru. Došlo k tomu, pretože UV bolo odstránené a "oslabené" svetlo už nemohlo excitovať chinín. Energetické straty medzi excitáciou a emisiou sú univerzálne pre fluorescenčné molekuly v roztoku. Jednou zo spoločných príčin Stokesovej zmeny je rýchly rozklad najnižšej úrovne vibrácií S₁. Okrem toho, fluorofóry sa všeobecne rozkladajú na vyššie

úrovne vibrácií S_0 , čo má za následok ďalšiu stratu excitačnej energie. Navyše na tieto účinky môžu fluorofóry zobrazit' ďalšie Stokesove posuny spôsobené účinkami rozpúšťadla, reakciami excitovaného stavu, tvorbou komplexu a/ alebo prenosom energie [47].

2.7.5 Lambert – Beerov zákon

Lambert-Beerov zákon je matematickým prostriedkom na vyjadrenie ako je svetlo hmoty (kvapalný roztok, tuhá látka alebo plyn) absorbované. Vzhľadom na vzorku absorbujúcej látky umiestnenej medzi dvoma paralelnými oknami, ktoré prenášajú svetlo a predpokladajú, že svetlo intenzity I_0 dopadá zľava, šíri sa v smere x , intenzita I klesá plynule zľava doprava a končí intenzitou I_t [48].

Roztok závisí lineárne od koncentrácie absorbujúcej molekuly, zlomková zmena intenzity svetla dI/I môže byť zapísaná ako:

$$-\frac{dI}{I} = a c dx \quad (3)$$

Kde a je konštanta proporcionality. Pretože a ani c nezáleží na x , integrácia medzi limitmi I_0 na $x=0$ a I_t v $x=l$, poskytuje

$$\ln \frac{I_0}{I_t} = a c l \quad (4)$$

Pre merania vykonané s kvetami rôznych dĺžok dráhy, prenášaná intenzita I_t exponenciálne klesá so zvyšujúcou sa dĺžkou dráhy. Alternatívne prenášaná intenzita exponenciálne klesá so zvyšujúcou sa koncentráciou a absorbujúca rozpustenou látkou. Absorbancia alebo optická hustota A je definovaná ako

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon c d \quad (5)$$

Kde $\varepsilon = a/2,303$ je molárny extinkčný koeficient, koncentrácia c a dĺžka dráhy d [48].

2.7.6 Kvantový výťažok

Fluorescenčná schopnosť látky opisuje kvantový výťažok fluorescencie, ktorý je definovaný ako pomer počtu fotónov vyžiarených látkou vo forme fluorescencie ku počtu fotónov látkou absorbovaných. Umožňuje určiť žiarivý tok prechádzajúci vzorkou vo forme fluorescenčného žiarenia vyjadreného ako počet fotónov za jednotku času. Kvantový výťažok je určený podielom rýchlosti vlastného fluorescenčného prechodu a celkovej rýchlosti všetkých dejov, ktoré vychádzajú zo stavu S_1 [43].

2.7.7 Zhášanie fluorescence

Okrem dejov vyššie spomínaných sa môže uplatniť aj vplyv ďalších komponentov prítomných v roztoku, ktoré deaktivujú stav S_1 a tak zhášajú fluorescenciu. Tieto látky sú označované ako zhášadlá (anglicky "Quenchers"). Medzi najbežnejšie zhášadlá patrí kyslík a tiež látky obsahujúce prvky s vyšším atómovým číslom. Aj samotná fluoreskujúca látka môže pri vyšších koncentráciách znižovať kvantový výťažok. V tomto prípade hovoríme o koncentračnom zhášaní fluorescence. Môžu sa pri ňom uplatniť rôzne medzimolekulárne interakcie, ako je tvorba molekulárnych asociátov v základnom či excitovanom stave, prenos energie a podobne [43].

2.7.8 Emisné a excitačné spektrum

Emisné spektrum je závislosť intenzity fluorescence na vlnovej dĺžke (alebo energií, vlnočtu, či frekvencii) pri konštantnej vlnovej dĺžke budiaceho žiarenia. Excitačné spektrum je závislosť intenzity fluorescence na vlnovej dĺžke (alebo energií, vlnočtu či frekvencii) pri konštantnej vlnovej dĺžke emitovaného žiarenia [49].

2.7.8.1 Absorpcia žiarenia

Absorpciu predstavuje interakcia látky X (atóm, molekula) so žiarením s hodnotou energie odpovedajúcej $h\nu$, pri ktorej látka energiu prijíma:



Podľa počtu rôznych energetických hladín látka absorbuje žiarenie s rôznymi frekvenciami. Usporiadáný súbor vlnových dĺžok (frekvencií) žiarenia, ktoré látka absorbuje sa nazýva absorpčné žiarenie. Absorbované vlnové dĺžky sú pre každú látku charakteristické. Absorbované frekvencie sú ukazovateľom kvalitatívnym. Veľkosť absorpcie sa vyjadruje v jednotkách absorbancie [49].

2.7.8.2 Emisia žiarenia

Emisia je dej opačný než absorpcia. Látka, ktorá bola dodaním energie prevedená do vyššieho energetického stavu, prechádza vo veľmi krátkom čase naspäť spontánnou emisiou na niektorý z nižších energetických stavov, niekedy až do základného stavu. Energie sa zbavuje vysielaním žiarenia $h\nu$, ktoré je pre danú látku charakteristické:



Podobne, ako je tomu u absorpcie, usporiadaný súbor vlnových dĺžok, ktoré látka emituje sa nazýva emisné spektrum [49].

2.7.9 Spektrofluorometer

Pri väčšine spektrofluorometrov je možné zaznamenávať excitačné aj emisné spektrá. Takéto spektrá môžu byť prezentované na vlnovej dĺžke alebo na vlnovom rozsahu. Svetlo danej energie možno opísať pomocou vlnovej dĺžky λ a frekvencie ν [47].

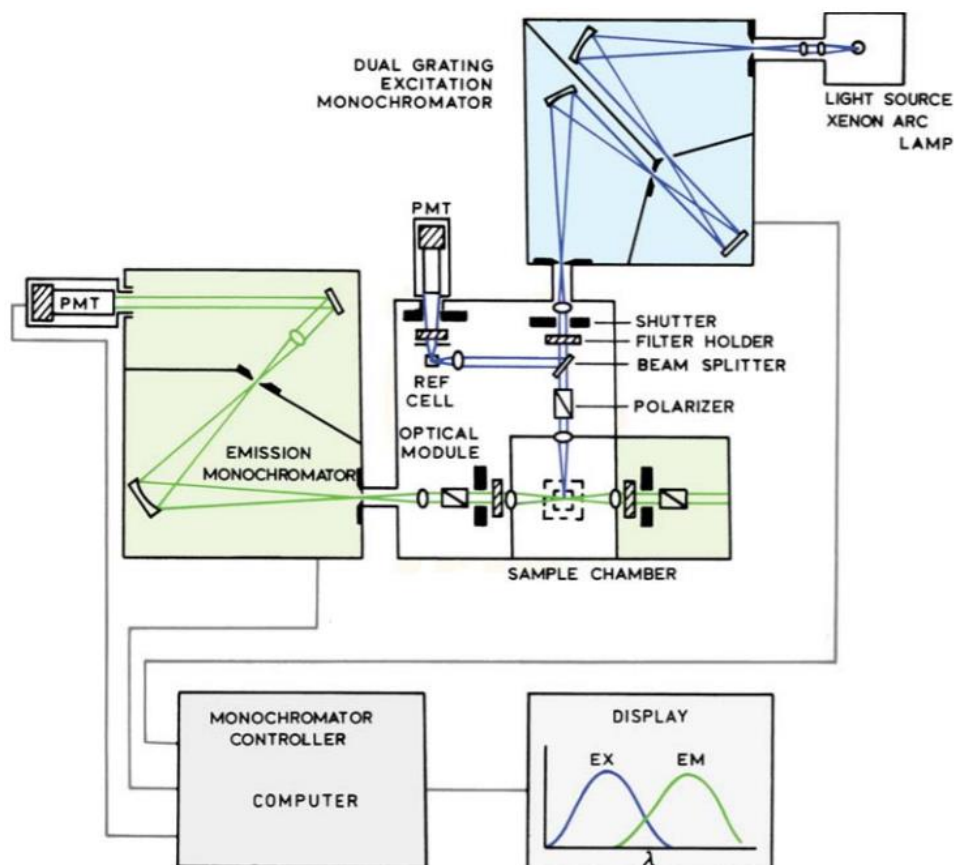
Pre ideálny prístroj by priamo zaznamenané emisné spektrum predstavovalo emisnú rýchlosť fotónu alebo emitovaný výkon pri každej vlnovej dĺžke v intervale vlnových dĺžok určených šírkami štrbín a disperziou emisného monochromátora. Podobne by excitačné spektrum predstavovalo relatívnu emisiu fluorofóru pri každej excitačnej vlnovej dĺžke [47].

Obrázok 7 znázorňuje schematický diagram spektrofluorometra na všeobecné použitie: tento prístroj má xenónovú lampu ako zdroj svetla. Takéto žiarivky sú vhodné z dôvodu ich vysokej intenzity pri všetkých vlnových dĺžkach. Prístroj je vybavený monochromátormi na výber excitačnej a tiež emisnej vlnovej dĺžky. Monochromátor v tejto schéme obsahuje dve mriežky, ktoré znižujú rozptýlené svetlo. Oba monochromátory sú motorizované, aby umožnili automatické skenovanie vlnovej dĺžky. Fluorescencia je detekovaná fotonásobičmi a kvantifikovaná pomocou vhodných elektronických zariadení [47].

Schéma prístroja tiež ukazuje komponenty optického modulu. Okenice sú určené na elimináciu vzrušujúceho svetla alebo na uzavretie emisného kanála. Rozdeľovač lúča je umiestnený v dráhe excitačného svetla. Tento splitter odráža časť excitačného svetla k referenčnej bunke, ktorá všeobecne obsahuje stabilný referenčný fluorofór. Rozdeľovač lúča pozostáva z tenkého čistého kremeňa, ktorý odráža približne 4 % dopadajúceho svetla. Intenzita zo štandardného roztoku je typicky izolovaná pásmovým filtrom a je úmerná intenzite vzrušujúceho svetla [47].

Polarizátory sú prítomné v dráhach excitácie aj emisií svetla. Vo všeobecnosti sú polarizátory odnímateľné, takže môžu byť vložené iba na meranie fluorescenčnej anizotropie, alebo keď je potrebné zvoliť konkrétne polarizované zložky emisie alebo excitácie [47].

Ďalšou užitočnou vlastnosťou je schopnosť umiestniť optické filtre do dráhy excitácie alebo emisného svetla. Filtre sú často potrebné, okrem monochromátorov, na odstránenie nežiaducich vlnových dĺžok v budiacom lúči alebo na odstránenie rozptýleného svetla z emisného kanála [47].



Obrázok 7: Schematický diagram spektrofluorometra [47]

2.7.10 Fluorescenčné značky

Pri látkach, ktoré sú sami o sebe schopné fluorescence hovoríme o primárnej fluorescencii (autofluorescencii). Fluorescencia sa môže tiež vyvolať naviazaním fluorescenčného farbiva alebo sondy na nefluorescenčný cieľ a indukujú tak sekundárnu (nepriamu) fluorescenciu. Látky, ktoré sú fluorescence schopné, a ktoré používame na fluorescenčné farbenie sa označujú ako fluorofóry. Často sú konjugované do komplexu fluorescenčné sondy s ďalšími zložkami, napríklad s krátkymi reťazcami nukleových kyselín alebo protilátkami, ktoré špecifikujú ich interakciu s cieľovými molekulami a štruktúrami. Chemickou štruktúrou sú fluorofóry zvyčajne organické látky s aromatickými kruhmi a delokalizovanými elektrónmi schopnými excitácie [44].

Fluorofóry sa delia do dvoch všeobecných tried:

- vnútorné (intrinsic) - ktoré sa vyskytujú prirodzene,
- vonkajšie (extrinsic) - pridávajú sa k vzorkám, ktoré nemajú vhodné fluorescenčné vlastnosti.

Vonkajšie, čiže nevlastné fluorofóry sa používajú omnoho častejšie ako vnútorné. Pridávajú sa ku študovanej vzorke. Ak sa viažu nekovalentne nazývajú sa fluorescenčné sondy, pokiaľ

sa naň viažu kovalentne, jedná sa fluorescenčné značky. Slúžia k značeniu molekúl, ktoré chceme ďalej pozorovať [50].

Nevlastný fluorofór možno deliť do dvoch skupín:

1. látky, ktorých kvantový výtťažok fluorescencie sa nemení po ich zavedení do biologického systému – sú to fluorescenčné farbivá, ktoré sa používajú v klasickej fluorescencii (napríklad fluoresceín, akridínová oranž, ...)
2. látky, ktorých kvantový výtťažok fluorescencie sa silne mení pri väzbe na bunkové štruktúry a závisí na okolí fluorofóru (napríklad 1-anilinaftalén-8-sulfonát či 1,6- difenyl- 1,3,5- hexatrien)

Fluorescenčné značky sú nevlastné fluorofóry, ktoré sa k sledovaným biomolekulám (proteínom, peptidom, ligandom, oligonukleotidom a iným) viažu kovalentnou väzbou. Najčastejšie sa používajú na fluorescenčnému značenie proteínov, kedy sa kovalentne viažu na ich aminové, sulfhydrylové alebo histidinové bočné reťazce, tiolové skupiny atď [51].

Medzi významné fluorescenčné značky patria:

- fluoresceín-5-izothiokyanát (FITC)
- tetrametylrhodamin-5 (a 6) -izothiokyanát (TRITC)
- 5-dimetylaminaftalén-1-sulfonyl chlorid (DNS-Cl)
- 4-chlór-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) [55].

fluorofór	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtťažek
FITC	492	516-525	0,3-0,85
TRITC	535-545	570-580	
DNS-Cl	340-350	510-560	0,1-0,3
NBD	470	550	
Fluorecamin	380	464	
Lucifer Yellow	430	540	0,2
Eosin	524	544	
Erythrosin	530	555	

Obrázok 8: Fluorescenčné parametre vybraných fluorescenčných značiek [51]

Kvôli ich citlivosti, technickej jednoduchosti a rýchlej dobe odozvy sa fluorescenčné sondy ukazujú ako užitočné nástroje v analytickom snímaní a optickom zobrazovaní. Hlavnými časťami fluorescenčnej sondy sú signalizačná jednotka (chromofór), spacer (chemický mostík) a väzbová jednotka (receptor). Manipulácia s týmito tromi komponentmi umožňuje konštrukciu sondy špecificky prispôbenej konkrétnym cieľom. Organické farbivá, ktoré absorbujú svetlo vo viditeľnej oblasti spektra ($\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$), sa môžu použiť ako fluorofóry. Tieto farbivá

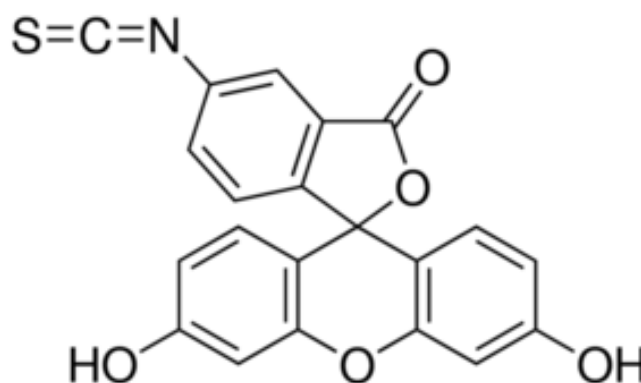
môžu obsahovať rôzne funkčné skupiny. Obsahuje napríklad aminoskupinu, karboxylovú kyselinu, karbonylovú skupinu, hydroxyskupinu, kyselinu sulfónovú a nitroskupinu, ktoré modifikujú schopnosť fluorofóru absorbovať svetlo. Najštudovanejšie zelené farbivá sú fluoresceíny. Červené farbivá pochádzajú typicky z rhodamínov. Fluoresceínové a rhodamínové farbivá majú vynikajúce optické vlastnosti, ako je dlhá excitačná vlnová dĺžka (λ - 500 nm) a vysoké fluorescenčné kvantové výťažky a extinkčné koeficienty, a preto sú široko používané. Selektívne sondy sa používajú v biochémií, imunohistochémií či nanochémií. [52].

2.7.10.1 Fluoresceín izotiokyanát

Fluoresceínové deriváty sú najbežnejšími fluorescenčnými činidlami pre biologický výskum kvôli ich vysokej absorptivite, vynikajúcemu kvantovému výťažku fluorescencie a dobrej rozpustnosti vo vode [53]. Farby na báze fluoresceínu a ich konjugáty majú niekoľko výkonnostných charakteristík, ktoré môžu uľahčiť alebo obmedziť použitie v určitých aplikáciách. Fluoresceín zobrazuje:

- fluorescenčný signál, ktorý je citlivý na zmeny pH,
- relatívne široké spektrum fluorescenčných emisií,
- fluorescenčné kalenie pri konjugácii na biopolyméry [54].

Fluoresceín izotiokyanát (FITC) je najpoužívanejšia fluorescenčná značka pre prípravu konjugátov s biologickými molekulami. Toto xanténové farbivo je zvlášť užitočné z niekoľkých dôvodov: konjugáty sú ľahko pripravené z dôvodu rozpustnosti FITC vo vode, je jasne fluoreskujúce kvôli jeho pomerne veľkým extinkčným koeficientom, poskytujú vysoké kvantové výťažky po konjugácii a má nízku nešpecifickú väzbu s väčšinou biologických tkanív [55].



Obrázok 9: Fluoresceín izotiokyanát [56]

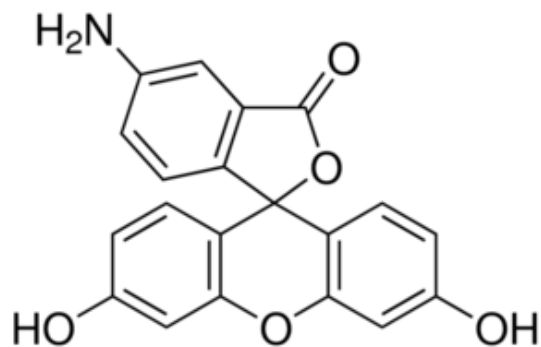
Fluoresceín je maximálne excitovaný modrým svetlom a emituje primárne zelenú až žltú fluorescenciu. Hoci sa excitačné spektrum fluoresceínu neprekrýva so žiadnym z intenzívne emisnej špičky ortuťových oblúkov, výstupná intenzita v rozmedzí 450 až 500 nm je dostatočná

pre excitáciu fluoresceínu konvenčnou fluorescenčnou mikroskopiou. Napriek všeobecnej užitočnosti má fluoresceín niekoľko nepriaznivých vlastností. Nie je fotostabilný, je citlivý na zmeny pH a jeho emisné spektrum sa značne prekrýva s bunkovou autofluorescenciou [55].

Sondy obsahujúce fluoresceín majú jasný signál, sú netoxické, majú mnoho možných reaktívnych miest vo svojich skeletoch. Fluoresceín má niekoľko miest, na ktorých môžu byť zavedené modifikácie, ako sú hydroxylové skupiny, xanténová jednotka a fenylový kruh [52]. Anti-fluoresceínové protilátky môžu byť užitočné pri zosilnení slabého signálu [53].

2.7.10.2 Fluoresceínamín

Rhodamíny sú deriváty xanténu, ktoré sú štrukturálne príbuzné s fluoresceínom, ale s chemickými substitúciami posunú svoje excitačné a emisné spektrá na dlhšie vlnové dĺžky. Hoci konjugáty rhodamínu dosahujú nižšie kvantové výťažky ako fluoresceínové konjugáty, sú všeobecne viac fotostabilnejšie a sú necitlivé na zmeny pH [55].



Obrázok 10: Fluoresceínamín [57]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Fluorescenčné značenie chitosanu a jeho derivátov

Chitosan je študovaný posledné desaťročia mnohými výskumnými tímami po celom svete. *Petra Osvaldová* sa vo svojej diplomovej práci na Islandskej univerzite zaoberala fluorescenčným značením polysacharidu, konkrétne chitosanu a jeho kationových derivátov pre biologické štúdie. Chitosan, amino-polysacharid vyrobený z chitínu sa skúma kvôli jeho vynikajúcim biologickým, fyziologickým a farmakologickým vlastnostiam. Samotný chitosan je nerozpustný v organických rozpúšťadlách aj vo vodných rozpúšťadlách, ale môže byť chemicky modifikovaný na prípravu derivátov s vhodnejšími vlastnosťami. Ako fluorofór využila fluoresceínamin. Chitosan mesylát rozpustila v deionizovanej vode. Fluoresceín izotiokyanát následne rozpustila v dimetylsulfoxide. Reakčnú vialku ponorila do olejového kúpeľa a zmes vo vialke sa miešala. Produkt fluoresceín-chitosanu vyzrážala v acetóne. Nasledovala dialýza, po ktorej bola zmes lyofilizovaná. Reakcia bola spoľahlivá v požadovanom rozsahu značenia, aby neprišlo k zmene aktivity pôvodných polymérov. Syntetizované materiály boli aplikované v konfokálnej mikroskopickej vizualizácii na zistenie interakcii medzi týmito polymérmi a jednou grampozitívnou baktériou (*Staphylococcus aureus*) a jednou z druhu gramnegatívnych baktérií (*Escherichia coli*), ktoré indikovali lokalizáciu polymérov na vonkajšej strane baktérií. Taktiež sa venovala fluorescenčne značenému trimetylchitosanu. Z výsledných meraní bolo dokázané, že fluoresceín-trimetylchitosan bol umiestnený na povrchu bunky, ako aj v perinukleárnej oblasti buniek. Bol pozorovaný v zhlukoch pripomínajúcich vakuoly [58].

Qiang Yang, Li Shuai a Xuejun Pan zo Spojených štátov amerických navrhli postup, pri ktorom chitosan rozpustili v zmesi dimetylformamidu a vodného roztoku kyseliny octovej. Potom do uvedeného roztoku pridali PSE rozpusteného v dimetylformamide. Reakcia sa uskutočňovala 24 hodín pod atmosférou dusíka za miešania. Na konci reakcie pridávali hydroxid sodný, až kým nedošlo k vyzrážaniu. Sediment odfiltrovali, znovu rozpustili v kyseline octovej a potom vyzrážali pridaním hydroxidu sodného. Výsledný svetložltý sediment oddelili filtráciou, premyli THF, a potom vysušili vo vákuu. Fluorescenčný chitosan bol úspešne syntetizovaný jednoduchou substitučnou reakciou na aminoskupinách chitosanu s N-hydroxysukcínimidovým esterom kyseliny 1-pyréntomovej. Pyrén je typická fluorescenčná zlúčenina, ktorá sa široko používa na prípravu fluorescenčných materiálov na báze pyrénu. Na aminoskupinách chitosanu sa môže uskutočniť mnoho derivatizačných reakcií [59].

Vedci z Pardubic sa zaoberali výrobou fluorescenčného chitosan- g- (antracén- 9- yl) - 4,6- dichlór- [1,3,5]-triazín-2-amínu (CH-g-AT), ktorý úspešne pripravili cez nukleofilnú substitučnú reakciu atómu chlóru triazinylu N- (antracén- 9- yl) 4,6- dichlór- [1,3,5]- triazín-2-amínu s aminoskupinou chitosanu. Štruktúra derivátov chitosanu bola dokázaná pomocou FTIR-ATR, NMR, TGA a DSC. Na potvrdenie zmeny intenzity fluorescencie boli pripravené rôzne vzorky fluorescenčného polyméru rôznych molárnych pomerov reaktantov. Bolo zistené, že polymér s veľmi vysokou intenzitou fluorescencie možno získať už použitím molárneho pomeru

chitosanu a fluorofóru 1: 0,3. Tvrdili, že nové deriváty chitosanu sa môžu použiť na rôzne diagnostické lekárske aplikácie a v magnetickej rezonancii [60].

Roula B. Qaqish a **Mansoor M. Amiji** sa počas svojej práce zaoberali fluorescenciou chitosanu. Ich postup zahŕňal tieto kroky: Lyofilizovaný chitosan rozpustili v roztoku kyseliny octovej. K roztoku chitosanu za neustáleho miešania pomaly pridali dehydratovaný metanol. FITC rozpustili v metanole a pridali ho do roztoku chitosanu. Reakciu medzi izotiokyanátovou skupinou FITC a primárnou aminoskupinou d-glukozamínového zvyšku chitosanu nechali prebiehať hodinu v tme pri teplote miestnosti. FITC-chitosan vyzrážali v roztoku hydroxidu sodného. Zrazeninu premyli deionizovanou vodou, pokým nebolo odstránené voľné fluorescenčné farbivo. Značený polymér potom lyofilizovali. Pre štúdie polarizácie bola excitačná vlnová dĺžka nastavená na 470 nm a emisná vlnová dĺžka bola nastavená na 520 nm. Nasyntetizovali chitosan značený FITC, aby mohli preskúmať mechanizmus interakcie medzi chitosanom a mucínom metódou fluorescenčnej polarizácie. Zvýšenie stupňa polarizácie je indikátorom nárastu molekulového objemu fluorofóru. Výsledky tejto štúdie ukazujú, že polarizácia fluorescencie je užitočnou metódou na skúmanie asociačného správania vo vode rozpustných fluorescenčných makromolekúl, ako je spomínaný chitosan [61].

3.2 Fluorescenčné značenie hyaluronanu

Americký vedecký tím okolo **Ryana Richa** a **Marka Mummerta** vo svojom článku uviedli metódu na detekciu aktivity HA-ázy s použitím fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS) a kyseliny hyalurónovej silne zaťaženej fluoresceínom (HA-FI). Nadmerná expresia hyaluronidázy bola pozorovaná u mnohých typov rakoviny, čo naznačuje, že môže byť užitočná na diagnostiku. Ich práca bola zameraná na techniku detekcie hyaluronidázy pomocou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS). Makromolekuly kyseliny hyalurónovej (HA) boli značené fluoresceínamínom. Hyaluronan bol kovalentne konjugovaný s fluoresceínom. Kyselinu hyalurónovú rozpustili v deionizovanej vode. Do roztoku HA pridali dimetylsulfoxid. Predbežne rozpustený roztok fluoresceínamínu v DMSO pridali do reakčnej zmesi. Následne pridali acetaldehyd a cyklohexylizokyanid. Reakciu nechali prebiehať pri laboratórnej teplote. Potom roztok zriedili v zmesi etanol / guanidín HCl. HA nechali precipitovať cez noc pri nízkej teplote. Zrazeninu rozpustili v dH₂O, následne získanú látku nechali dialyzovať proti deionizovanej vode. V prítomnosti hyaluronidázy sa kyselina hyalurónová štiepi na menšie, fluoresceínom značené fragmenty. Takéto štiepenie sa prejavuje zvýšenou priemernou rýchlosťou difúzie fragmentov HA, zvýšenou koncentráciou jednotlivých fluorescenčných fragmentov HA a zvýšenou intenzitou. Všetky tri vlastnosti monitorovali počas meraní FCS, a to ako funkcia času a koncentrácie hyaluronidázy. Dokázali, že predložený spôsob poskytuje citlivé meranie aktivity hyaluronidázy. Prítomnosť HA-ázy môže byť monitorovaná použitím jej štiepenia fluorescenčne označenej HA. Jedným z prístupov je meranie zmien polarizácie fluorescencie z označenej HA. FCS poskytuje analýzu fluktuácií fluorescencie v čase z jednej alebo malého počtu molekúl v mikroskopickom detekčnom objeme. Zo štúdie vyplynulo, že kombinácia fluorescenčnej korelačnej spektroskopie a silne zaťaženej HA-FI poskytuje veľmi citlivé prostriedky na detekciu prítomnosti HA-ázy [62].

Anthony N. de Belder spolu s *K. Ove Wikom* vypracovali štúdiu, kde bol hyaluronát označený fluoresceínovými skupinami. Hyaluronát sodný rozpustili vo formamide. Metylsulfoxid pridali spolu s hydrogenuhličitanom sodným, dibutylcindilaurátom a fluoresceín izotiokyanátom a reakčnú zmes miešali v parnom kúpeli. Produkt zriedili vodou a vyzrážali v etanole. Zrazeninu nechali sedimentovať a supernatant následne dekantovali. FITC-hyaluronát sušili vo vákuu. Získali sa produkty so stupňami substitúcie medzi 0,05 a 0,001. Pomocou fyzikálno-chemickej analýzy, ktorá sa skladala z viskozimetrie, gélovej chromatografie, merania sedimentačných a difúzných koeficientov, materskej zlúčeniny a produktov zistili, že postupy fluorescenčného značenia spôsobili len malú degradáciu polysacharidu. Fluorescenčne značené polyméry boli široko používané pre štúdie mikrocirkulácie, permeability tkanív a distribúcie tkanív fluorescenčnou mikroskopiou. Zistilo sa však, že vzorky hyaluronátu značené fluoresceín izotiokyanátom, ktoré majú významný obsah proteínov, boli hnedo-oranžové, zatiaľ čo vzorky s nevýznamným obsahom boli žlté. Ďalšia analýza fluorescenčného hyaluronátu ukazovala, že degradácia produktu počas označovania bola malá a označenie bolo jednotné. Celkový záver z ich meraní je, že materiál by preto mal byť vhodný na biologickú prácu [63].

Jedným zo zaujímavých typov prípravy fluorescenčne značenej kyseliny hyalurónovej (HA) sa zaoberal *Rafal Fudala*, keď označil hyaluronan dvoma fluorofórmami, a to fluoresceínamínom a rhodamínom B. Tieto dva fluorofóry sú vhodné na prenos fluorescenčnej (Foersterovej) rezonančnej energie (FRET), čo má za následok zhasenie fluoresceínu a zvýšenú emisiu rhodamínu. Študovali fluorescenčné vlastnosti HA – FRET v neprítomnosti a prítomnosti enzýmu hyaluronidázy (HA-áza). Merania fluorescencie s časovým rozlíšením indikujú viac ako 50 % FRET v neprítomnosti HA-ázy. V prítomnosti HA-ázy sa FRET časom znižuje a relatívna intenzita fluorescencie fluoresceínu a rhodamínu sa presúva na fluoresceín, čo indikuje uvoľnenie FRET. Preukázal, že v súčasnosti je možné použiť súčasné merania zelenej a červenej emisie HA – FRET. Toto môže byť využité na konštrukciu spoľahlivého zariadenia na snímanie HA-ázy. V koži HA slúži ako hlavná štruktúrna zložka v dermálnej extracelulárnej matrici a ako výplňový materiál v epiderme. Meral fluorescenčné spektrum HA – FRET sondy v neprítomnosti a prítomnosti enzýmu HA-ázy. V neprítomnosti enzýmu nezaznamenal žiadne zmeny vo fluorescencii HA – FRET. Poznamenal že, pozorované spektrálne zmeny u HA – FRET fluorescencie zodpovedajú redukcii FRET v prítomnosti enzýmu HA-ázy. Uvedené merania ukazujú, že je možné sledovať aktivitu HA-ázy zo zmien v HA-FRET [64].

3.3 Fluorescenčné značenie dextransu

Tím na čele s vedcami *Anthony N. de Belderom* a *Kirsti Granathovou* zo švédskej univerzity Uppsala sa v roku 1973 začali zaoberať fluorescenčne značenými dextransmi. Fluoresceínom značené dextransy sú aj v dnešnej dobre cenným materiálom pre štúdiu permeability a mikrocirkulácie in vivo. Značenie pomocou fluorescencie poskytuje značné množstvo výhod oproti konvenčným farbiacim postupom, najmä oveľa nižší stupeň substitúcie, pri ktorom sa môžu uskutočňovať merania fluorescencie. Fluoresceín izotiokyanát,

ktorý pozostával z 5- a 6- izomérov, nechali reagovať s dextránom v metylsulfoxide pri zvýšených teplotách za vzniku O-(fluoresceínyltiokarbamoyl) dextránu, nazývaný FITC- dextrán. Reakciu katalyzovali dibutylcindilaurátom. Depolymerizácia počas reakcie bola zanedbateľná, ale upozornili, že je potrebné dbať na to, aby neboli prítomné žiadne kyslé nečistoty s činidlami. Hoci fluoresceín-dextrány sú uspokojivé pre väčšinu účelov, alternatívna procedúra s použitím fluoresceínyltriazínového derivátu by bola tiež účinná. Stupeň substitúcie fluoresceín-dextránu bol stanovený spektrofotometricky [65].

Francoise Meunier a **Kevin J. Wilkinson** zo Švajčiarska v roku 2002 publikovali článok, v ktorom bol použitý fluorescenčný postup značenia, ktorý nenarušuje makromolekulové konformácie viažuceho sa derivátu, ktorým bol rhodamín R6113, na redukujúci koniec vo vode rozpustného polysacharidu redukčnou amináciou v prítomnosti kyanoborohydridu sodného. Polysacharid, na ktorom skúmali fluorescenčnú korelačnú spektrometriu bol dextrán. Nové techniky založené na fluorescencii, ako je fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS) alebo skenovanie v blízkosti optickej mikroskopie znižuje limity detekcie a je možné určiť dôležité fyzikálno- chemické vlastnosti, ako sú polymérne konformácie a veľkosť, preto majú veľký význam pre fluorescenčné značenie polysacharidov bez narušenia ich štruktúrnej konformácie. Derivatizáciu uskutočnili zavedením kovalentných väzieb medzi fluorofórmami a polysacharidmi. Na druhej strane kovalentné označovanie všeobecne vyžaduje potenciálne kruté podmienky, ktoré by mohli viesť k degradácii polysacharidu. Aby sa tak zabránilo konformačným modifikáciám polysacharidu, reakcie sa musia uskutočniť pri minimálne rušivých podmienkach pH, teploty a iónovej sily. Uviedli, že pre polysacharidy obsahujúce karboxylové funkčné skupiny, fluorescenčná značka môže byť viazaná cez amidovú väzbu s použitím karbodiimidu, avšak táto funkčná skupina nie je prítomná vo všetkých polysacharidoch. Amíny môžu byť tiež naviazané na hydroxylové funkčné skupiny polysacharidu s použitím brómkyanu. Okrem toho brómkyan použitý na derivatizáciu je veľmi toxický. Výsledkom bol systém, ktorý bol dostatočne citlivý, aby umožňoval detekciu jednej molekuly. Analýzu uskutočnili pri excitačnej vlnovej dĺžke 488 nm použitím Ar-iónového lasera. Z vedeckej práce vyplýva, že derivát rhodamínu R6113 bol naviazaný kovalentne na redukujúce koncové skupiny niekoľkých polysacharidov. Klasická fluorescencia ukázala, že prítomnosť fluorofóru nemodifikovala fluorescenciu R6113. Pomocou SEC, fluorescenčnej korelačnej spektroskopie a Tm-AFM sa ukázalo, že konformácie molekúl polysacharidu neboli modifikované postupom derivatizácie [66].

Vedkyňa **Katherine Luby-Phelps** navrhla postup fluorescenčného značenia dextránu, ktorý zahŕňal konverziu hydroxylových skupín na O-karboxymetylétery a následnú amidáciu týchto skupín etyléndiamínom v prítomnosti vo vode rozpustného karbodiimidu. Tento derivát aminoetylkarboxymetyl potom môže reagovať priamo s amino-selektívnymi činidlami, ako sú FITC a TRITC, na získanie fluorescenčných derivátov látky. Postup práce bol nasledovný: Polysacharid dextrán rozpustila v tlmivom roztoku uhličitan- hydrogenuhličitanu. Rozpustila farbivo tetrametylrhodamín (TRITC) v dimetylformamide (DMF) a pridala ho po kvapkách do uhličitan-hydrogenuhličitanového pufra. Fluoresceín izotiokyanát rozpustila v pufre. Roztok farbiva pridala do roztoku dextránu a nechala inkubovať. Nakoniec prebehla dialýza proti destilovanej vode, po ktorej nasledovala

lyofilizácia. Počet karboxylov zavedených do polyméru v prvom kroku je funkciou času a teploty. Konečný stupeň substitúcie bol riadený zmenou týchto parametrov v prvom kroku a použitím nadbytku etyléndiamínu a nadbytku fluorofôru v nasledujúcom kroku. Úprava trvania karboxymetylačnej reakcie bola v tomto prípade nevyhnutná na dosiahnutie požadovaného stupňa substitúcie. Výsledkom toho bolo, že v zásade môže byť dextrán označený akýmkoľvek činidlom selektívnym na aminoskupinu [67].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Táto kapitola obsahuje chemikálie, ktoré boli použité pri príprave fluorescenčne značených polysacharidov, taktiež postupy, ako boli látky pripravované a metódy merania vzniknutých látok.

4.1 Použité chemikálie a prístroje

Polysacharidy

Dextrán DEAE

CAS: 9064-91-9, č. šarže: BCBM1585, Sigma Aldrich

Hyaluronan sodný

Hya č. 15 (250-450 kDa), č. šarže: 230215-E1

Chitosan

$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$, $M_w = 168$ kDa, CAS: 9012-76-4, Sigma Aldrich

Trimetylchitosan

Fakulta chemická VUT Brno

Fluorescenčné značky

Fluoresceín izotiokyanát izomér I

$C_{21}H_{11}NO_5S$, $M_w = 389,38$ g/mol, CAS: 3326-32-7, Sigma Aldrich

Fluoresceínamín

$C_{20}H_{13}NO_5$, $M_w = 347,32$ g/mol, CAS: 3326-34-9, Sigma Aldrich

Ostatné použité chemikálie

Deionizovaná voda

H_2O , Systém ELGA

Acetón

C_3H_6O , $M_w = 58,08$ g/mol, CAS: 67-64-1, Penta s.r.o

Guanidín hydrochlorid

$CH_5N_3 \cdot HCl$, $M_w = 95,53$ g/mol, CAS: 50-01-1, Sigma Aldrich

Dibutylcindilaureát

$C_{32}H_{64}O_4Sn$, $M_w = 631,56$ g/mol, CAS: 77-58-7, Sigma Aldrich

Dimetylsulfoxid

C_2H_6OS , $M_w = 78,13$ g/mol, CAS: 67-68-5, Sigma Aldrich

Pyridín

C_5H_5N , $M_w = 79,1$ g/mol, CAS: 110-86-1, Sigma Aldrich

Kyselina chlorovodíková

HCl, $M_w = 36,46$ g/mol, CAS: 7647-01-0, Lach-ner

Kyselina octová

CH_3COOH , $M_w = 60,05$ g/mol, CAS: 200-580-7, Lach-ner

Acetaldehyd

C_2H_4O , $M_w = 44,05$ g/mol, CAS: 75-07-7, Sigma Aldrich

Cyklohexylkyanid

$C_7H_{11}O$, $M_w = 109,17$ g/mol, CAS: 931-53-3, Sigma Aldrich

Prístroje

Fluorescenčný spektrofotometer FS5 EDINBURGH INSTRUMENTS

Fluorescenčný mikroskop MicroTime200 od firmy Picoquat

4.2 Príprava fluorescenčne značených polysacharidov

Vzorky pre štúdium interakcie sa skladajú z polysacharidu a fluorescenčnej značky. Všetky fluorescenčne značené polysacharidy boli pripravené metódou tzv. kovalentnej väzby medzi fluorofórom a polysacharidom. Pracovné postupy boli inšpirované postupmi, ktoré boli spomenuté v kapitole 3.

4.2.1 Syntéza FITC- dextránu DEAE

Na analytických váhach bol navážený na váženke 1 gram dextránu hydrochloridu. Toto navážené množstvo dextránu DEAE bolo dané do kadičky. V odmernom valci bolo odmeraných 10 ml dimetylsulfoxidu. Do dimetylsulfoxidu bolo pipetou pridaných niekoľko kvapiek pyridínu. Potom týchto 10 ml bolo pridaných do kadičky s naváženým

dextránom. Následne bolo pridaných 0,1 g fluoresceín izotiokyanátu (FITC), neskôr bolo vo váženke odvážených na analytických váhach 20 mg dibutylcindilaurátu. Dibutylcindilaurát bol kvantitívne prevedený do kadičky so zmesou. Vzniknutá zmes bola premiešaná a následne zahrievaná potrebné 2 hodiny pri vysokej teplote, ktorá bola nastavená na 95 °C. Po 2 hodinách reakcie bolo potrebné odstrániť prebytočné nenašované farbivo fluoresceín izotiokyanát. Odstránenie voľného farbiva sa uskutočnilo niekoľkými precipitáciami vo väčšom množstve etanolu. Nakoniec bol fluorescenčne označený dextrán odfiltrovaný cez filtračný lievik. Filtrát bolo nutné vysušiť. Sušenie prebiehalo 24 hodín v sušiarňi pri 80 °C. Nasledujúci deň bolo získaných 0,7 g fluorescenčne značeného dextránu DEAE, ktorý mal hnedú farbu [65].

4.2.2 Syntéza FITC- chitosanu

Na analytických váhach bolo navážené potrebné množstvo polysacharidu na pokus. Odvážených 57 mg chitosanu bolo následne prevedených do reakčnej vialky. Toto množstvo bolo dané do odpipetovaných 2,5 ml deionizovanej vode. Vialka bola uzatvorená a bola daná na vortex. Následne bola vialka daná na elektrickú miešačku, pokiaľ nebol chitosan v deionizovanej vode úplne rozpustený. Potom navážených 0,9 mg fluoresceín izotiokyanátu (FITC) bolo rozpustených vo vialke v 0,3 ml dimetylsulfoxide (DMSO), ktoré boli pridané pipetou. Rozpustený fluoresceín izotiokyanát v dimetylsulfoxide bol pridaný do reakčnej vialky spolu s magnetickým miešadlom. Následne zmes vo vialke bola miešaná na vortexe. Vialka s reakčnou zmesou bola daná do kadičky, v ktorej bol olej. Takto bola ponorená vialka v kadičke do olejového kúpeľa. Reakcia prebiehala pri teplote 80 °C. Roztok vo vialke bol po celý čas reakcie miešaný. Reakcia vzniku fluorescenčne značeného chitosanu bola prerušená po 48 hodinách. Výsledný roztok bol ochladený v ľadovom kúpeli na laboratórnu teplotu. Produkt bol následne vyzrážaný v 250 ml acetónu. Látka vzniknutá reakciou bola potom prefiltrovaná sa na nuči s fritou pomocou filtrácie za zníženého tlaku. Počas filtrácie bol filtrát premytý trikrát 7 ml dimetylsulfoxidu. Po každom premytí dimetylsulfoxidom nasledovalo okamžité zrážanie v 15 ml acetónu. Takto sa zabránilo strate novovzniknutého produktu. Pevná látka bola rozpustená v kadičke, v ktorej bolo odmerným valcom odmeraných 50 ml deionizovanej vody. Táto deionizovaná voda bola okyslená pár kvapkami kyseliny chlorovodíkovej. Následne bola uskutočnená rozsiahla dialýza proti destilovanej vode. Dialýza prebiehala počas troch dní. Nakoniec bolo odstránené rozpúšťadlo prostredníctvom lyofilizácie počas dvoch dní. Po lyofilizácii bol získaný výsledný oranžový produkt [58].

4.2.3 Syntéza FITC- trimetylchitosanu

Proces tvorby fluorescenčne značeného trimetylchitosanu začal tým, že do reakčnej vialky bolo pridaných, na analytických váhach odvážených 59,15 mg trimetylchitosanu (TMC), ktorý bol vyrobený kolegynami na Fakulte chemickej. Toto množstvo TMC bolo rozpustené vo vialke v 2 ml deionizovanej vode. Navážených 5,89 mg fluoresceínizotiokyanátu (FITC) bolo rozpustených vo vialke v 1,4 ml dimetylsulfoxide (DMSO). Celá reakčná zmes bola pridaná do vialky spolu s magnetickým miešadlom. Vo vialke bola zmes premiešaná

na vortexe. Reakcia prebiehala počas potrebných 46 hodín pri teplote 80 °C za neustáleho miešania. Po ochladení na laboratórnu teplotu, bola nepotrebná voda odstránená v sušiarňi [58].

4.2.4 Syntéza fluoresceín-amín-hyaluronanu

Na váženke odvážených 1,25 mg hyaluronanu (Hya) bolo nasýpaných do reakčnej vialky. Následne bolo toto množstvo hyaluronanu rozpustené v 1 ml deionizovanej vode. Potom do roztoku hyaluronanu bol pridaný dimetylsulfoxid (DMSO), a to v pomere 1:2. Roztok priebežne rozpusteného fluoresceín-amínu v DMSO bol pridaný k rozpustenému hyaluronanu a tak bola vytvorená potrebná konečná koncentrácia tejto zmesi. Následne bol pridaný do reakčnej zmesi acetaldehyd a cyklohexyl izokyanid. Obidve tieto látky boli pridané v 0,04 % (obj./obj.). Reakcia bola uskutočnená potrebných 16 hodín pri laboratórnej teplote, ktorá bola 25 °C. Potom bol roztok zriedený v pomere 1:14 v zmesi, ktorá bola vytvorená zmiešaním etanolu s guanidín HCl. Táto zmes bola vytvorená pomocou pomeru 50 µl 3 M guanidín HCl na 900 µl 100 % etanolu. Látku v roztoku bolo potrebné zraziť. Roztok zmesi bol ponechaný precipitácii v mrazničke cez noc pri teplote -20 °C [62].

4.3 Metódy merania

Pre meranie boli pripravené roztoky vzoriek FITC-dextránu a FITC-chitosanu rozpustených v destilovanej vode. Koncentrácia roztoku vzoriek bola 50 mg/ 100 ml a tieto roztoky boli ešte 100krát zriedené.

Pre stanovenie vzniku kovalentných väzieb medzi polysacharidmi a fluorofórmami boli použité metódy merania fluorescenčných spektier a anizotropie. Pre meranie excitačných a emisných spektier vybraných fluorescenčných značiek bol použitý fluorescenčný mikroskop MicroTime200. Všetky merania boli prevedené za konštantnej laboratórnej teploty. Po ustálení teploty bol zapnutý počítač, a potom nasledovalo spustenie samotného prístroje. Po iniciácii inštrumentácie a vložení kvety so vzorkou boli nastavené parametre merania (excitačná vlnová dĺžka 470 nm, laserová hlavica LDH-470 s frekvenciou 40 MHz, dichroik 405/467, objektív UPLanSapo 60x vodná imerzia, emisný filter 520/35, konfokálna štrbina 50 mikrometrov, detektory SPCM-AQRH) a nasledovalo spustenie samotného merania.

Pri roztoku dextránu bola zmeraná tiež anizotropia na fluorescenčnom spektrofotometri FS5 EDINBURGH INSTRUMENTS. Na prístroji bola nastavená excitačná vlnová dĺžka na 490 nm a vlnová dĺžka emisie na 520 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Keďže príprava fluorescenčne značených polysacharidov na našej škole zatiaľ nie je veľmi preskúmaná, veľká časť mojej práce sa zaoberala nájdením vhodnej kombinácie fluorescenčnej značky a polysacharidu. Na základe literárnej rešerše, ako vhodné polysacharidy boli zvolené hyaluronan, dextrán, chitosan a ich deriváty kvôli ich výhodným vlastnostiam a dobrej dostupnosti. Fluorofóry použité v tejto práci boli deriváty fluoresceínu, konkrétne fluoresceínamin a fluoresceínizotiokyanát, pretože sú najčastejšie používané a ľahko dostupné.

Hlavnou úlohou tejto práce bolo pripraviť kovalentne viazané polysacharidy s fluorescenčnými sondami a pokúsiť sa zmerať pomocou fluorescenčnej spektroskopie ich fluorescenčné charakteristiky.

5.1 FITC-Dextrán

Najlepšie výsledky mal dextrán, u ktorého bolo fluorescenčnou spektrometriou dokázané, že fluoresceín izotiokyanát bol naviazaný na tento polysacharid. Fluorescenčne značený dextrán-DEAE bol pripravený bez problémov podľa pracovného postupu uvedeného vyššie v kapitole 4.2.1. Vyrobené množstvo takto značeného dextránu predstavovalo 585 mg. Výsledný FITC- dextrán je pevná látka hnedej farby (viď Obrázok 11).



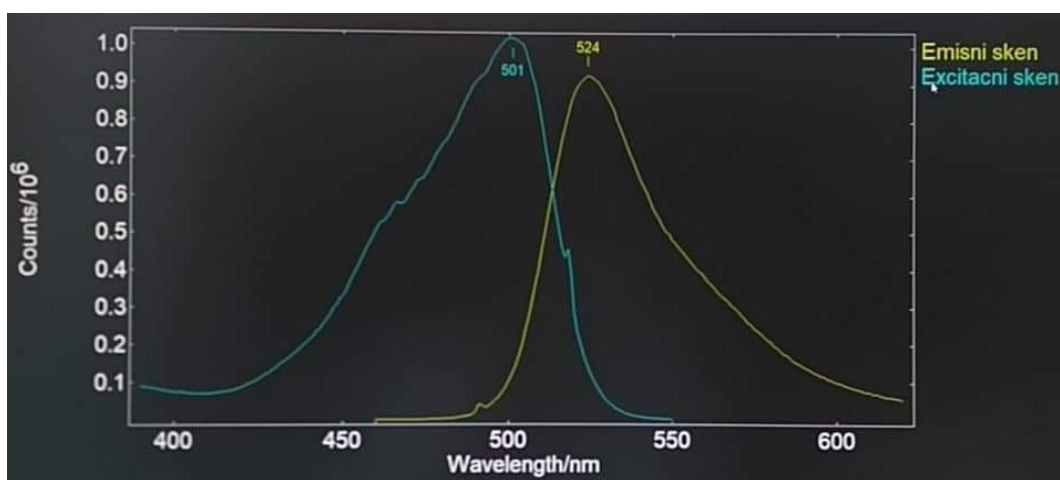
Obrázok 11: FITC dextrán-DEAE

Na meranie bol pripravený roztok 50 mg/ 100 ml, ktorý bol ešte stokrát zriedený (viď Obrázok 12).



Obrázok 12: Roztok FITC dextrán-DEAE

Meranie roztoku takto pripraveného fluorescenčného polysacharidu zahŕňalo zmeranie fluorescenčných vlastností pripraveného systému. Vzorka bola excitovaná laserovým lúčom s vlnovou dĺžkou 500 nm a snímané bolo naviazanie fluorescenčnej značky kovalentnou väzbou na polysacharid. Emisia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke 520 nm (vid' Obrázok 13). Fluorescenčná značka je teda pravdepodobne začlenená do systému, ktorý je tvorený molekulami dextránu. Toto zistenie teda korešponduje s výsledkami, ktoré dosiahli pomocou fluorescenčných meraní vedci, ktorých postup bol použitý. Pri meraní fluorescencie sa na grafe objavili nečistoty v roztoku. Následne bol tento roztok dextránu podrobený dialýze proti deionizovanej vode. Výsledný roztok bol meraný rovnakým spôsobom ako pred dialýzou.



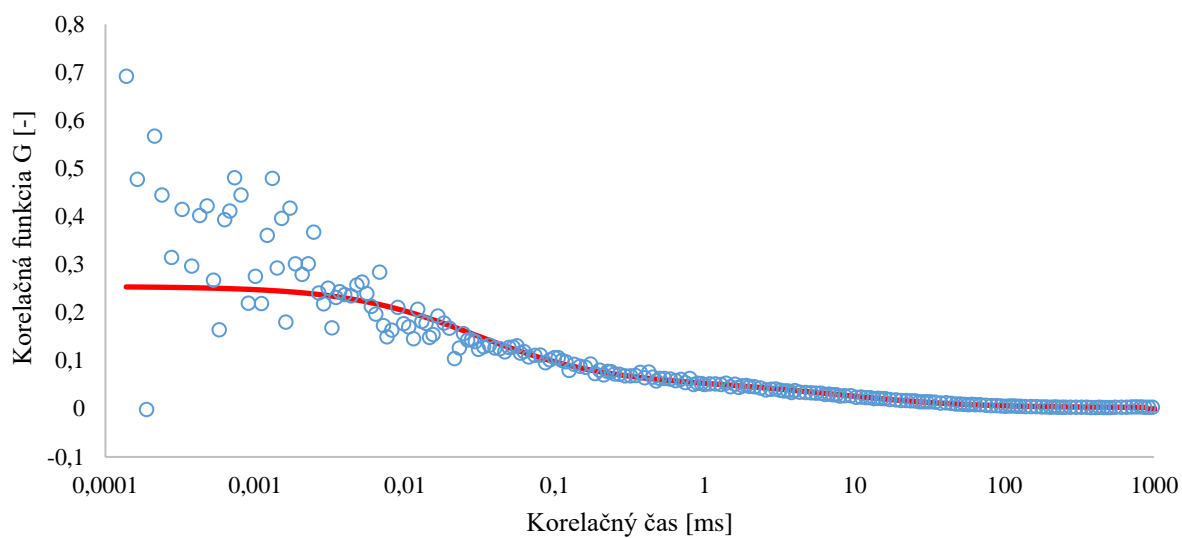
Obrázok 13: Excitačné a emisné spektrum FITC dextrán-DEAE

Na Obrázok 14 je znázornený graf FITC dextrán-DEAE. V tomto grafe je žltou farbou ohraničená časť, ktorá ukazuje naviazanie fluorescenčnej značky na polysacharid.

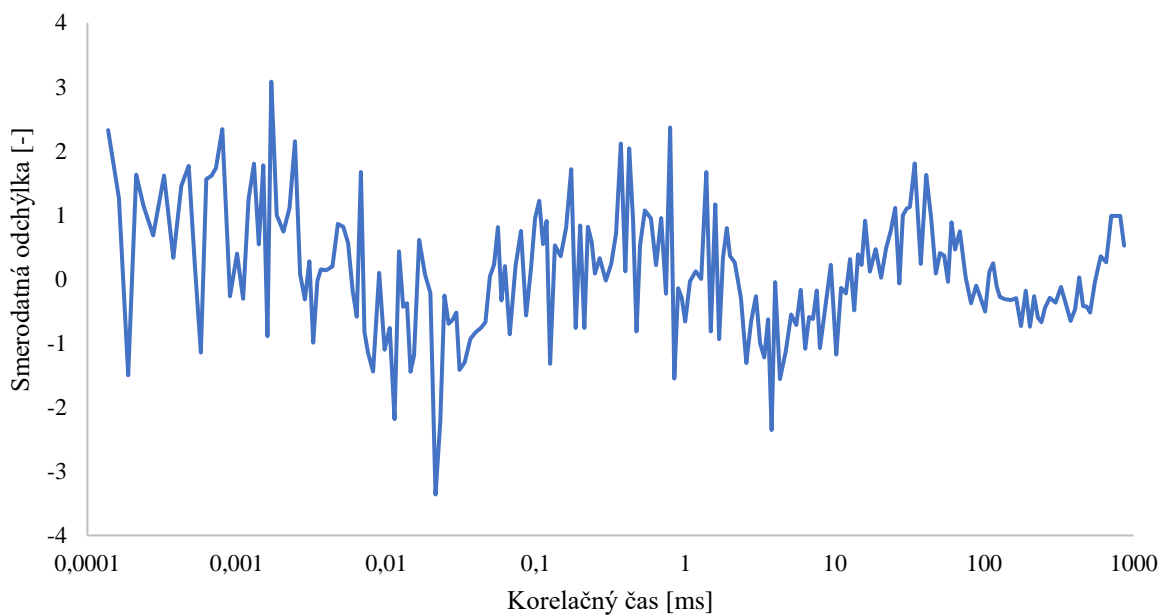


Obrázok 14: Graf FITC dextrán-DEAE

Na Obrázok 15 a Obrázok 16 je meranie difúzných koeficientov FITC dextránu-DEAE pomocou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Hodnota difúzneho koeficientu prvej komponenty bola stanovená $517 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Difúzny koeficient druhej komponenty $1,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Táto hodnota naznačuje naviazanie fluorescenčnej značky na polyméry.

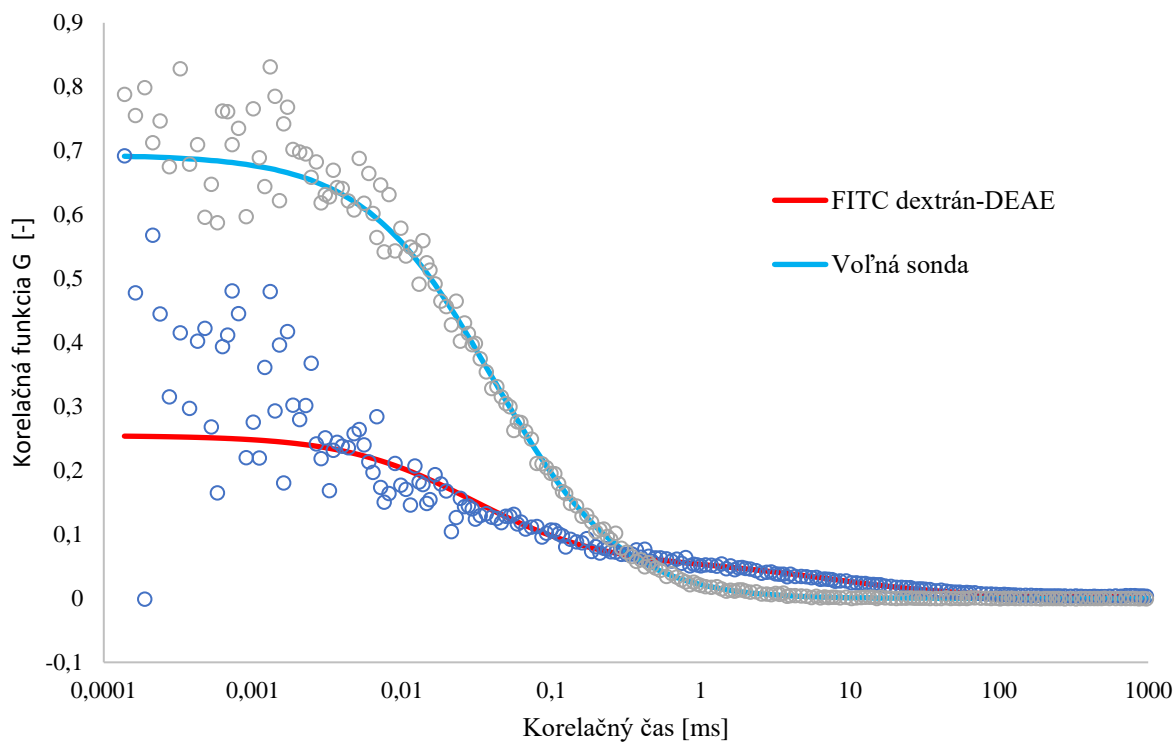


Obrázok 15: Závislosť korelácie na korelačnom čase



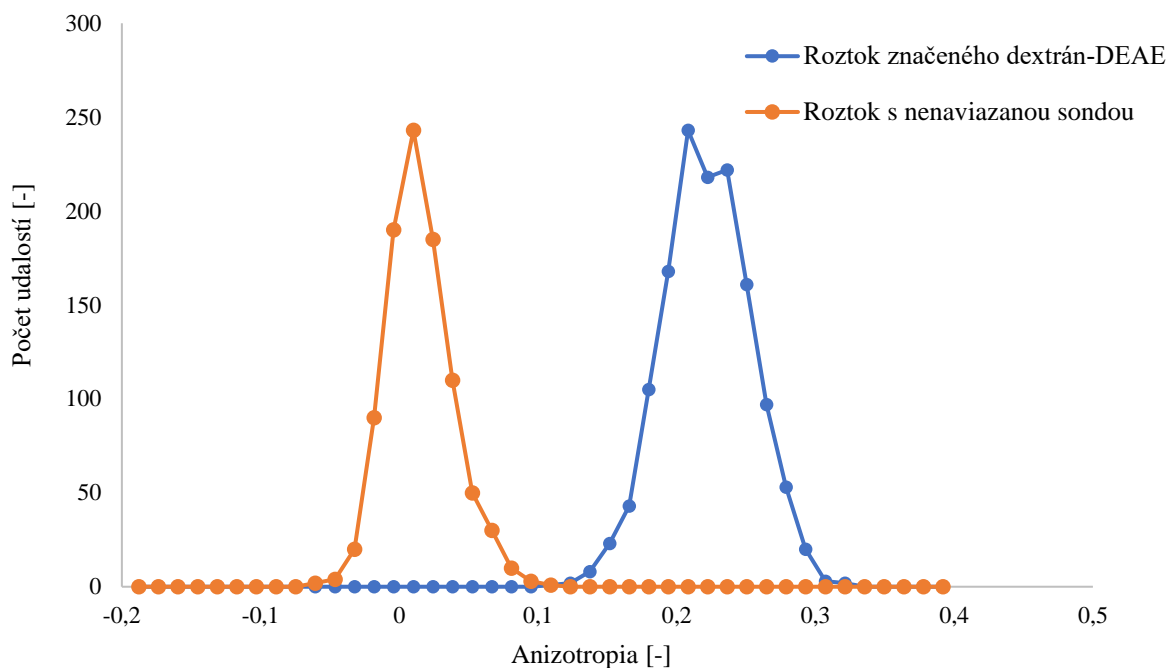
Obrázok 16: Reziduálna analýza

Obrázok 17 porovnáva krivku pre fluoresceín naviazaný na polysacharid dextrans-DEAE a pre voľnú nnaviazanú sondu získanú pomocou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie.



Obrázok 17: Voľná sonda v roztoku v porovnaní s naviazanou sondou na dextráne

Na Obrázok 18 je zmeraná distribúcia anizotropie a vyhodnotená hodnota anizotropie ako distribučná krivka s danou priemernou hodnotou. Dextrán-DEAE vykazuje relatívne úzku distribúciu a vysokú priemernú hodnotu anizotropie, ktorá je mierou voľného pohybu sondy. Oranžová krivka ukazuje distribúciu hodnôt anizotropií pre roztok s nenaviazanou sondou, priemerná hodnota anizotropie je 0. Modrá krivka ukazuje roztok značeného DEAE, priemerná anizotropie je 0.202, čo je v 50 % teoretického rozsahu anizotropie (-0.2 - 0.4).



Obrázok 18: Distribúcia anizotropie

5.2 FITC-Chitosan

Chitosan značený fluorofórom bol pripravený na základe pracovného postupu, ktorý je uvedený v kapitole 4.2.2. Syntéza FITC- chitosanu. Na začiatku boli pokusy vykonávané s chitosanom, ktorý sa celkom dobre nerozpustil vo vode. Takto získaná látka bola bledo-oranžovej farby (viď Obrázok 19: *Nenaviazaný FITC na chitosane*). Hmotnosť tejto získanej fluorescenčnej látky bola 36 mg. Fluorescenčným meraním pri vlnovej dĺžke 490 nm bolo zistené, že kvôli zhoršenej rozpustnosti chitosanu vo vode sa fluoresceín izotiokyanát správne nenaviazal, a preto nevznikla medzi polysacharidom a fluorescenčnou značkou kovalentná väzba. Tieto informácie nám napovedajú, že sonda sa nachádza v systéme pravdepodobne nezačleneného do polysacharidu a zostáva vo forme voľného farbiva v roztoku.



Obrázok 19: Nenaviazaný FITC na chitosane

Pri ďalšom pokuse sa chitosan rozpúšťal vo vode s pár kvapkami zriedenej kyseliny octovej, v ktorej sa chitosan rozpustil po dvoch dňoch na miešačke. Po 2 dňoch sa chitosan s fluorofórom rozpustil a vznikla žltá tekutá látka (viď Obrázok 20). Podľa pracovného postupu mala nasledovať filtrácia, ktorú však nebolo možné uskutočniť, pretože vznikla kvapalná látka, z ktorej ani po vyzrážaní nevznikla pevná látka.



Obrázok 20: Fluoresceín isotiokyanát + chitosan

5.3 FITC-trimetylchitosan

FITC-trimetylchitosan bol pripravený na základe pracovného postupu, ktorý je uvedený v kapitole 4.2.3. Takto pripravený roztok fluorescenčne značeného trimetylchitosanu bol na Petriho miske sušený v sušiarňi. Po vysušení zostalo na Petriho miske iba stopové množstvo látky, ktorá mala oranžovú farbu. Množstvo tak malé, ktoré sa nedalo zväžiť váhami. Následne sa malo pridať 29 ml zriedenej kyseliny octovej a tento roztok mal byť extrahovaný etylacetátom.

Ak by sa nevyskytli problémy (minimálne množstvo látky), bol by roztok FITC-trimetylchitosanu následne meraný na fluorescenčnom spektrofotometri pri vlnovej dĺžke excitácie 490 nm a emisie 520 nm.

5.4 Fluoresceínamin-hyaluronan

Vo vybranom pracovnom postupe prípravy fluorescenčne značenej látky bolo navážených 1,25 mg hyaluronanu. Toto malé množstvo bolo ťažko zväžiteľné na analytických váhach. Reakciou, ktorá je popísaná v kapitole 4.2.4, vzniknutý roztok bol daný do mrazničky, kde mala vzniknúť zrazenina fluorescenčne značeného hyaluronanu. Zrazeninu však nebolo vidieť, pretože do veľkého množstva kvapaliny bolo pridané extrémne malé množstvo hyaluronanu (viď Obrázok 21).



Obrázok 21: Roztok hyaluronanu s fluoresceínamínom

V prípade úspešne vzniknutej kovalentnej väzby medzi hyaluronanom a fluoresceínamínom, by bola zameraná fluorescencia. Excitačná vlnová dĺžka je 496 nm a vlnová dĺžka emisie je 519 nm. Ďalším navrhovaným krokom je teda pripravenie hyaluronanu vo väčšom množstve a premeranie fluorescencie.

5.5 Ekonomická náročnosť

V nasledujúcej Tabuľka 1 sú uvedené množstvá a odhadované ceny fluorescenčne značených polysacharidov, ktoré boli pripravené postupmi uvedenými v kapitole 4.2.

Tabuľka 1: Odhadované ceny fluorescenčne značených polysacharidov pripravených v laboratóriu

Názov:	Hmotnosť:	Cena:
Fluoreceín - kyselina hyalurónová	1 mg	1 117,70 Kč
FITC-dextrán	1 g	1 212,50 Kč
Chitosan fluoresceín	10 mg	100 Kč

Približné ceny komerčne dostupných ekvivalentov fluorescenčne značených polysacharidov od firmy Sigma-Aldrich sú uvedené v Tabuľka 2.

Tabuľka 2: Ceny komerčne dostupných ekvivalentov

Názov:	Hmotnosť:	Cena:
Fluoreceín - kyselina hyalurónová	1 mg	2 322,80 Kč
FITC-dextrán	1 g	7 831,60 Kč
Chitosan fluoresceín	10 mg	5 940,30 Kč

6 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo pripraviť a charakterizovať fluorescenčne značené polysacharidy, ktoré sú zložené z polysacharidu a fluorescenčnej značky. Príprava týchto značených polysacharidov bola založená na overených postupoch, ktorými sa zaoberali vedci z laboratórií po celom svete. Prvou nevyhnutnou úlohou bolo nájsť vhodné kombinácie polysacharidu a fluorofóru, ktoré by medzi sebou vytvorili kovalentnú väzbu. Nakoniec boli vybrané ako polysacharidy dextrans, chitosan a hyaluronan spolu so svojimi derivátmi v kombinácii s fluoresceín izotiokyanátom a fluoresceínamínom. K charakterizácii fluorescenčne značených polysacharidov bol použitý spektrofluorometer.

K príprave takto kovalentnou väzbou značených polysacharidov boli použité hyaluronan s fluoresceínamínom. Ďalej boli dextrans, chitosan a ich deriváty označené fluoresceín izotiokyanátom.

Merania na spektrofluorometre potvrdili aj vyvrátili, či polysacharidy boli naozaj označené fluorescenčnými značkami. Medzi týmito dvoma zložkami mala byť vytvorená kovalentná väzba. Výsledky nášho merania sa v niektorých prípadoch zhodujú s výsledkami meraní výskumov, podľa ktorých sme postupovali pri značení polysacharidov. Zo štyroch pripravených fluorescenčne značených polysacharidov sa podaril iba jeden, a to FITC dextrans-DEAE.

Nami navrhnutý spôsob prípravy fluorescenčne značených polysacharidov spočívajúci v kovalentnom naviazaní fluorescenčnej značky na polysacharid sa ukázal v niektorých prípadoch ako vhodný a použiteľný na meranie fluorescence. Môžeme teda konštatovať, že použitie fluorescenčnej značky fluoresceínu sa zdá byť vhodným a jednoduchým prostriedkom pre meranie fluorescence v okolí oblasti hodnôt pre excitáciu 495 nm a pre emisiu 519 nm.

Fluorescenčne značené polysacharidy sú zložité systémy. Ich príprava je časovo náročná hlavne kvôli naviazaniu fluorofóru na daný polysacharid. Na ich presnejšiu charakterizáciu a vyvodenie komplexnejších záverov je potrebné vykonať ešte mnoho experimentov a meraní.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] ENGELKING, Larry R. Chemical Composition of Living Cells. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 2-6 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50001-3. ISBN 9780123919090. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123919090500013>
- [2] ASPINALL, GERALD O. Nature, Occurrence and Classification of Polysaccharides. *Polysaccharides* [online]. Elsevier, 1970, 1970, s. 1-12 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/B978-0-08-013409-3.50007-6. ISBN 9780080134093. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080134093500076>
- [3] JINDAL, Namita a Jasvirinder SINGH KHATTAR. Microbial Polysaccharides in Food Industry. *Biopolymers for Food Design* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 95-123 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811449-0.00004-9. ISBN 9780128114490. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128114490000049>
- [4] BHAGAVAN, N.V. Simple Carbohydrates. *Medical Biochemistry* [online]. Elsevier, 2002, 2002, s. 133-151 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1016/B978-012095440-7/50011-1. ISBN 9780120954407. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120954407500111>
- [5] HARDING, Stephen E., Gary G. ADAMS, Fahad ALMUTAIRI, Qushmua ALZAHIRANI, Tayyibe ERTEN, M. SAMIL KÖK a Richard B. GILLIS. Ultracentrifuge Methods for the Analysis of Polysaccharides, Glycoconjugates, and Lignins. *Analytical Ultracentrifugation* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 391-439 [cit. 2019-02-16]. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.06.043. ISBN 9780128029084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687915004036>
- [6] TESTER, R.F. a J. KARKALAS. CARBOHYDRATES | Interactions with Other Food Components. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 875-881 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00167-X. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X00167X>
- [7] CAPEK, P., E. HLAVOŇOVÁ, M. MATULOVÁ, D. MISLOVICOVÁ, J. RŮŽIČKA, M. KOUTNÝ a L. KEPRDOVÁ. Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **83**(1), 88-93 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.07.024. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710005588>
- [8] FREITAS, Filomena, Vitor D. ALVES a Maria A.M. REIS. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2011, **29**(8), 388-398 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779911000552>
- [9] NAESSENS, Myriam, An CERDOBBEL, Wim SOETAERT a Erick J VANDAMME. *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2005, **80**(8), 845-860 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1002/jctb.1322. ISSN 0268-2575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1322>
- [10] De BELDER, A. N. Dextran. Handbooks from Amersham Biosciences. Dostupné z: http://tdbcons.com/images/pdf/18116612_AA_p13.pdf

- [11] BASSIEUX, Danielle, Didier GAGNAIRE a Michel VIGNON. Étude par R.M.N.-13C et -1h du (1→6)-β-d-glucane et des oligosaccharides linéaires et cycliques correspondants. *Carbohydrate Research* [online]. 1977, **56**(1), 19-33 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)84233-0. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500842330>
- [12] SEYMOUR, Fred R., Roger D. KNAPP a Stephen H. BISHOP. Determination of the structure of dextran by 13C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate Research* [online]. 1976, **51**(2), 179-194 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)83325-X. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862150083325X>
- [13] Dextranase and Dextrans. SIGMA-ALDRICH [online]. b.r. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemicalproducts.html?TablePage=11167732>
- [14] KARANDIKAR, Sayali, Amit MIRANI, Vishal WAYBHASE, Vandana B. PATRAVALE a Sandeep PATANKAR. Nanovaccines for oral delivery-formulation strategies and challenges. *Nanostructures for Oral Medicine* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 263-293 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/B978-0-323-47720-8.00011-0. ISBN 9780323477208. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323477208000110>
- [15] AMAN, Afsheen, Nadir Naveed SIDDIQUI a Shah Ali UI QADER. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **87**(1), 910-915 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.094. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711007788>
- [16] DUBOC, Philippe a Beat MOLLET. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* [online]. 2001, **11**(9), 759-768 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00119-4. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601001194>
- [17] HAN, Jin, Feng HANG, Benheng GUO, Zhenmin LIU, Chunpin YOU a Zhengjun WU. Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **112**, 556-562 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.06.035. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714006110>
- [18] MAINA, Ndegwa Henry, Leena PITKÄNEN, Sami HEIKKINEN, Päivi TUOMAINEN, Liisa VIRKKI a Maija TENKANEN. Challenges in analysis of high-molar mass dextrans: Comparison of HPSEC, AsFIFFF and DOSY NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **99**, 199-207 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.021. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713008023>
- [19] ROBERTS, J.J. a P.J. MARTENS. Engineering biosynthetic cell encapsulation systems. *Biosynthetic Polymers for Medical Applications* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 205-239 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/B978-1-78242-105-4.00009-2. ISBN 9781782421054. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782421054000092>
- [20] SURI, Shalu, Gang RUAN, Jessica WINTER a Christine E. SCHMIDT. Microparticles and Nanoparticles. *Biomaterials Science* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 360-388 [cit.

- 2019-02-23]. DOI: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00034-6. ISBN 9780123746269. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080877808000346>
- [21] Adams, Justin, "Novel Cationic Pentablock Copolymers as a Nanovaccine Delivery Platform" (2014). Graduate Theses and Dissertations. [online]. Dostupné z: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=6870&context=etd>
- [22] ABIOYE, Amos Olusegun, Adeola KOLA-MUSTAPHA a Ketan RUPARELIA. Impact of in situ granulation and temperature quenching on crystal habit and micromeritic properties of ibuprofen-cationic dextran conjugate cristanules. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, **462**(1-2), 83-102 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.043. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313011198>
- [23] SIEWERT, C., H. HAAS, T. NAWROTH, et al. Investigation of charge ratio variation in mRNA – DEAE-dextran polyplex delivery systems. *Biomaterials* [online]. 2019, **192**, 612-620 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.020. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961218307348>
- [24] HEINZE, Thomas, Tim LIEBERT, Brigitte HEUBLEIN a Stephanie HORNIG. Functional Polymers Based on Dextran. KLEMM, Dieter, ed. *Polysaccharides II*[online]. Springer Berlin Heidelberg, 2006, s. 199-291 [cit. 2019-02-09]. Advances in Polymer Science. DOI: 10.1007/12_100. ISBN 978-3-540-37102-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/12_100
- [25] DEMARGER-ANDRE, S. a A. DOMARD. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1994, **23**(3), 211-219 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/0144-8617(94)9104-X. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014486179490104X>
- [26] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. In: *Chemicke listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770 http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf
- [27] SUNTORNSUK, W, P POCHANAVANICH a L SUNTORNSUK. Fungal chitosan production on food processing by-products. *Process Biochemistry* [online]. 2002, **37**(7), 727-729 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00265-5. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959201002655>
- [28] DUTTA, P. K., J. DUTTA a V. S. TRIPATHI. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* [online]. 2004, vol. 63, s. 20-31. Dostupné z: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5397/1/JSIR%2063\(1\)%2020-31.pdf?pagewanted=all](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5397/1/JSIR%2063(1)%2020-31.pdf?pagewanted=all)
- [29] KULKARNI, Abhijeet D., Harun M. PATEL, Sanjay J. SURANA, Yogesh H. VANJARI, Veena S. BELGAMWAR a Chandrakantsing V. PARDESHI. N,N,N - Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 875-902 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.041. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716312036>
- [30] M. WAYS, Twana, Wing LAU a Vitaliy KHUTORYANSKIY. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers* [online]. 2018, 10(3) [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.3390/polym10030267. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/3/267>

- [31] Mona Zarifpour, Farzin Hadizadeh, Maryam Iman, Mohsen Tafaghodi. Preparation and Characterization of Trimethyl Chitosan Nanospheres Encapsulated with Tetanus Toxoid for Nasal Immunization Studies. *Pharmaceutical sciences* [online]. 2013, 18(4), 193-198 [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/0f1d/9eb53055dd8384c53e974b44639269e73c05.pdf>
- [32] MALIK, Anshu, Manish GUPTA, Vatika GUPTA, Himanshu GOGOI a Rakesh BHATNAGAR. Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, 13, 7959-7970 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.2147/IJN.S165876. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/novel-application-of-trimethyl-chitosan-as-an-adjuvant-in-vaccine-delivery-peer-reviewed-article-IJN>
- [33] MOURYA, V. K. a Nazma N. INAMDAR. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, 20(5), 1057-1079 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3659-z>
- [34] FACCHI, Débora P a Suelen P FACCHI. N,N,N-Trimethyl Chitosan and Its Potential Bactericidal Activity: Current Aspects and Technological Applications. *Journal of Infectious Diseases & Therapy* [online]. 2016, 4(4) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.4172/2332-0877.1000291. ISSN 23320877. Dostupné z: <http://www.esciencecentral.org/journals/nntrimethyl-chitosan-and-its-potential-bactericidal-activity-currentaspects-and-technological-applications-2332-0877-1000291.php?aid=77619>
- [35] TROMMER, Hagen, Reinhard NEUBERT. Hyaluronsäure. Ein vielseitig pharmazeutisch einsetzbares Biomolekül. Martin-Luther-Universität HalleWittenberg, Institut für Pharmazie
- [36] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan Structure and Physical Properties. *GlycoForum* [online]. 1997 [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [37] SCOTT, John E.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences [online]. Poslední revize 15.3.1998 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [38] NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Prague)*, 2008, vol. 53, no. 8, p. 397–411. Dostupné z: <https://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [39] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA, Mario DE a J. KOLAR. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*. Sciyo, 2010, 2010-09-28, (53), 397–411. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-productioncharacterization-and-application-of-hyaluronan>
- [40] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, vol. 19, issue 5, pp. 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11224-008-9370-3>
- [41] KOVÁŘ, David. Studium biointerakcí s využitím kombinace piezoelektrického a optického systému. Brno, 2009, 66 l. diplomová práce. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/150685/prif_m/DP09_Final.pdf

- [42] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH [online]. 2003 [cit. 2019-02-08]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [43] FÄHNRIICH. FLUORIMETRIE. In: Ústav analytické chemie VŠCHT Praha [online]. 2014 [cit. 2019-02-14]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>
- [44] Fluorescenční mikroskopie. Katedra experimentální biologie rostlin, PŘF UK v Praze [online]. [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
- [45] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence [online]. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002 [cit. 2019-04-13]. ISBN 35-276-0024-8. Dostupné z: <http://physweb.bgu.ac.il/~bogomole/Books/Valeur%20B%20-%20Molecular%20Fluorescence%20Principles%20And%20Applications%20-%20%28Wiley-Vch%202001%20399%20P%29.pdf>
- [46] KLÁN, Petr. *Organická fotochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2001, s. 6-7. ISBN 8021025263.
- [47] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 6 s. ISBN 03-873-12781.
- [48] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles*. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. ISBN 3527316698.
- [49] SOMMER, L.. Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 122-124 s. ISBN 80- 214-1742-0.
- [50] VENEROVÁ, Tereza. Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2013.
- [51] Fluorofory v biomedicíně [online]. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [52] OLIVEIRA, Elisabete, Emilia BÉRTOLO, Cristina NÚÑEZ, et al. Green and Red Fluorescent Dyes for Translational Applications in Imaging and Sensing Analytes: A Dual-Color Flag. *ChemistryOpen* [online]. 2018, 7(1), 9-52 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1002/open.201700135. ISSN 21911363. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/open.201700135>
- [53] FITC. Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/search/results?query=fitc&focusarea=Search%20All>
- [54] Fluorescein (FITC). Thermo Fisher Scientific [online]. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cellanalysis/fluorophores/fluorescein.html?icid=fr-fitc-main>
- [55] CLARK BRELJE, T., Martin W. WESSENDORF a Robert L. SORENSON. Multicolor Laser Scanning Confocal Immunofluorescence Microscopy: Practical Application and Limitations. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy* [online]. Elsevier, 2002, 2002, 165-249e [cit. 2019-02-16]. Methods in Cell Biology. DOI: 10.1016/S0091-679X(02)70006-X. ISBN 9780124802773. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X0270006>
- [56] Fluorescein isothiokyanat. In: Sigma Aldrich [online]. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/F2502?lang=en®ion=US&cm_sp=Insite-_-recent%20fixed-_-recent5-1

- [57] Fluoresceinamine. In: Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/201626?lang=en®ion=US>
- [58] OSVALDOVÁ, Petra. *Fluorescence labelling of chitosan and its cationic derivatives for biological studies*. [online] Island: University of Iceland. Faculty of Pharmaceutical Sciences School of Health Sciences, 2017. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://skemman.is/bitstream/1946/27045/1/MS%20thesis%20-%20Petra.pdf>. Diplomová práca.
- [59] YANG, Qiang, Li SHUAI a Xuejun PAN, 2008. Synthesis of Fluorescent Chitosan and Its Application in Noncovalent Functionalization of Carbon Nanotubes. *Biomacromolecules* [online]. **9**(12), 3422-3426 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1021/bm800964m. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm800964m>
- [60] PŘICHYSTALOVÁ, Hana, Numan ALMONASY, A.M. ABDEL-MOHSEN, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of new fluorescent chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **65**, 234-240 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.050. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014000518>
- [61] QAQISH, RoulaB. a MansoorM. AMIJI. Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan–mucin interactions. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1999, **38**(2), 99-107 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/S0144-8617(98)00109-X. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486179800109X>
- [62] 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* [online]. 2012, **116**, 7-12 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.07.007. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134412001637>
- [63] DE BELDER, Anthony N. a K.Ove WIK. Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research* [online]. 1975, **44**(2), 251-257 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)84168-3. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500841683>
- [64] FUDALA, Rafal, Mark E. MUMMERT, Zygmunt GRZYCZYNSKI a Ignacy GRZYCZYNSKI. Fluorescence detection of hyaluronidase. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2011, **104**(3), 473-477 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.06.003. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134411001400>
- [65] DE BELDER, A.N. a Kirsti GRANATH. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. *Carbohydrate Research* [online]. 1973, **30**(2), 375-378 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)81824-8. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621500818248?via%3Dihub>
- [66] MEUNIER, Françoise a Kevin J. WILKINSON. Nonperturbing Fluorescent Labeling of Polysaccharides. *Biomacromolecules* [online]. 2002, **3**(4), 857-864 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1021/bm0255241. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm0255241>

[67] LUBY-PHELPS, Katherine. Chapter 4 Preparation of Fluorescently Labeled Dextran and Ficoll. *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture Part A . Fluorescent Analogs, Labeling Cells, and Basic Microscopy* [online]. Elsevier, 1988, 1988, s. 59-73 [cit. 2019-04-09]. *Methods in Cell Biology*. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)60187-9. ISBN 9780125641296. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X08601879>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Použité skratky

Skratka	Význam
TGA	termogravimetrická analýza
THF	tetrahydrofurán
FTIR-ATR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou- zoslabený celkový odraz
DSC	diferenciálna skenovacia kalorimetria
HAáza	hyaluronidáza
DMSO	dimetylsulfoxid
HCl	kyselina chlorovodíková
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
TMC	trimetylchitosan
dH ₂ O	deionizovaná voda
FRET	fluorescenčná (Foersterová) rezonančná energia
TRITC	tetrametylrhodamin-5 (a 6) -izothiokyanát
DMF	dimetylformamid
FITC	fluoresceín izothiokyanát
HA	kyselina hyaluronová
Hya	hyaluronan
Da	Dalton
DEAE	dextrán hydrochlorid
H ₂ O	voda
Ar	argón
NaCl	chlorid sodný
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NaBH ₄	tetrahydridoboritan sodný
UV-VIS	ultrafialové- viditeľné svetlo

Tm-AFM	mikroskopia atómovej sily- režim ťuknutia
SEC	vylučovacia chromatografia
MALLS	viacnásobný rozptyl laserového svetla
atď.	a tak ďalej
HA-FI	kyselina hyalurónová silne zaťažená fluoresceínom

8.2 Použité symboly

Symbol	Názov veličiny
S_0	základná energetická hladina
S_1	singletový stav
T_1	tripletový stav
μ	mikro
m	meter
nm	nanometer
$F_\lambda (\lambda_F)$	vlnová dĺžka emitovaných fotónov
Φ_F	kvantový výťažok fluorescencie
I_F	intenzita fluorescencie
λ_E	excitačná vlnová dĺžka
I_A	intenzita absorbovaného svetla
I_0	intenzita dopadajúceho svetla
I_T	intenzita prechádzajúceho svetla
A	absorbancia
a	konštanta proporcionality
c	koncentrácia
l	dĺžka
v	frekvencia
λ	vlnová dĺžka
ε	molárny extinkčný koeficient

h

Planckova konštanta