



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

**DIFÚZE ORGANICKÝCH MOLEKUL V HYDROGELOVÉM
PROSTŘEDÍ**

DIFFUSION OF ORGANIC MOLECULES IN THE HYDROGEL ENVIRONMENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Holubová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1108/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Anna Holubová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Difúze organických molekul v hydrogelovém prostředí

Zadání diplomové práce zadání:

1. Rešerše na využití dual-focus FCS v koloidech.
2. Navrhnout vhodné modelové sondy pro studium jednotlivých prostředí ve fázově separovaných hydrogelech na bázi polymer-tenzid.
3. Stanovit difúzní chování vybraných sond a porovnat metody klasické FCS s pokročilou 2fFCS.
4. Interpretovat výsledky z hlediska difúze jednotlivých solutů a z hlediska jednotlivých metod.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Anna Holubová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miroslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem hydrogelů vzniklých fázovou separací hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a Septonex. Navazuje na bakalářskou práci a rozšiřuje znalosti o podrobnou charakterizaci vnitřního prostředí hydrogelu stanovením difúzního chování fluorescenční sondy Atto 488 a nilské červeně pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a její upravené verze dvouohniskové fluorescenční korelační spektroskopie (2f-FCS). Porovnané výsledky ukázaly, že obě použité metody vykazují podobné hodnoty a že sondy specificky interagují s CTAB, ale sonda Atto 488 vykazuje pouze slabou interakci se Septonexem ve srovnání s nilskou červení. Tyto interakce navíc nebyly ovlivněny použitou molekulovou hmotností hyaluronanu. Závěrem bylo doporučeno měření uvedeného typu hydrogelu, prostřednictvím klasické metody, v malé hloubce gelu.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with study of hydrogels formed by phase separation of hyaluronan with oppositely charged surfactants cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and Septonex. It follows the bachelor thesis and extends the knowledge about the detailed characterisation of the inner environment of the hydrogel by determining the diffusion behaviour of the fluorescent probes Atto 488 and Nile Red using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) technique and its modified version dual-focus fluorescence correlation spectroscopy (2f-FCS). Compared results showed that both methods show similar values and probes specifically interact with CTAB but Atto 488 shows only weak interaction with Septonex compared to Nile Red. Additionally, these interactions were not affected by the molecular weight of hyaluronan. In conclusion, it was recommended to measure this type of hydrogel in a small depth of gel using a conventional method.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan sodný, hydrogel, cetyltrimethylamonium bromid, Septonex, Atto 488, nilská červeň, fluorescence, fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

sodium hyaluronate, hydrogel, cetyltrimethylammonium bromide, Septonex, Atto 488, Nile Red, fluorescence, fluorescence spectroscopy

HOLUBOVÁ, A. *Difúze organických molekul v hydrogelovém prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Adamcové za cenné rady. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině, příteli a přátelům za podporu nejen ve studiu.

OBSAH

| | | |
|---|---|----|
| 1 | ÚVOD | 6 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 7 |
| | 2.1 Hyaluronan..... | 7 |
| | 2.2 Tenzidy | 13 |
| | 2.3 Gely..... | 19 |
| | 2.4 Fluorescence | 21 |
| | 2.5 Fluorescenční sondy..... | 23 |
| | 2.6 Fluorescenční korelační spektroskopie | 25 |
| | 2.7 Dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie..... | 28 |
| | 2.8 Současný stav řešené problematiky | 30 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 33 |
| | 3.1 Použité chemikálie | 33 |
| | 3.2 Příprava zásobních roztoků a hydrogelů..... | 33 |
| | 3.3 Použité přístroje a programy | 34 |
| | 3.4 Nastavení přístroje a měření | 34 |
| | 3.5 Vyhodnocení naměřených dat..... | 38 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 40 |
| | 4.1 Interakce fluorescenčních sond s tenzidy ve vodném prostředí..... | 41 |
| | 4.2 Studium hydrogelů fluorescenční sondou Atto 488..... | 43 |
| | 4.3 Studium hydrogelů fluorescenční sondou nilská červeň | 49 |
| | 4.4 Spektra nilské červeně v jednotlivých prostředích | 53 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 55 |
| 6 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 57 |
| 7 | SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ | 67 |

1 ÚVOD

Současnou snahou mnoha vědeckých skupin je zaměření svého výzkumu ke studiu interakce polymeru s tenzidem za tvorby fázově separovaných hydrogelů, které díky svým unikátním viskoelastickým vlastnostem a hydrofilní povaze nalézají využití v medicínských a farmaceutických aplikacích. Pozornost je věnována především použití hydrogelů v oblasti cílené distribuce léčiv formou nosiče, čímž by ideálně došlo k navázání léčiva a jeho dopravení do postižené tkáně bez nepříznivých cytostatických účinků při nádorových onemocněních.

Kyselina hyaluronová se jeví jako vhodný polymer, a to především díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě v živém organismu. Studium hyaluronanu přináší lepší porozumění nativním tkáním, protože je součástí extracelulární matrix a veškeré mezibuněčné přenosy s ním nevyhnutelně přicházejí do kontaktu. Obecně, modifikace hyaluronanu ovlivňuje rozpustnost, a proto nemodifikovaný hyaluronan využívá elektrostatické interakce s kationaktivními látkami, nejčastěji tenzidy, k vytvoření fázově separovaných hydrogelů.

Hydrogely na bázi hyaluronanu jsou schopné absorbovat vysoké množství vody a jejich specifická struktura skýtá schopnost pozvolného uvolnění aktivní účinné látky, čímž by se zabezpečilo udržení terapeutické hladiny léčiva v organismu po určitou dobu. Hydrogel představuje komplexní systém, avšak stále přesně není známo chování molekul hyaluronanu v jeho vnitřním prostředí.

Studium difúzní charakteristiky je jedním z přístupů, jak pozorovat chování molekul pomocí stanovení difúzního koeficientu fluorescenčních sond v hydrogelu. Za účelem prozkoumání neznámé struktury hydrogelu byla použita metoda fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) vyznačující se vysokou citlivostí a detekcí signálu na úrovni jednotlivých molekul. V posledním desetiletí vědci vymysleli modifikovanou verzi FCS nezávislou od optických a fotofyzikálních aberací nazvanou dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie (2f-FCS), která poskytuje absolutní hodnoty difúzních koeficientů.

Cílem této diplomové práce je studium difúze organických molekul v hydrogelovém prostředí vzniklém na bázi hyaluronanu a kationaktivního tenzidu cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a dosud neprozkoumaného Septonexu. V teoretické části je podán současný přehled zaměřený na využití 2f-FCS ve výzkumu koloidů. Následně, pomocí obou fluorescenčních technik, bylo stanoveno difúzní chování fluorescenční sondy Atto 488 a nilské červeně v hydrogelech, jejichž výsledky jsou vzájemně porovnány. Závěrem byla naměřena spektra nilské červeně ve vybraných prostředích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

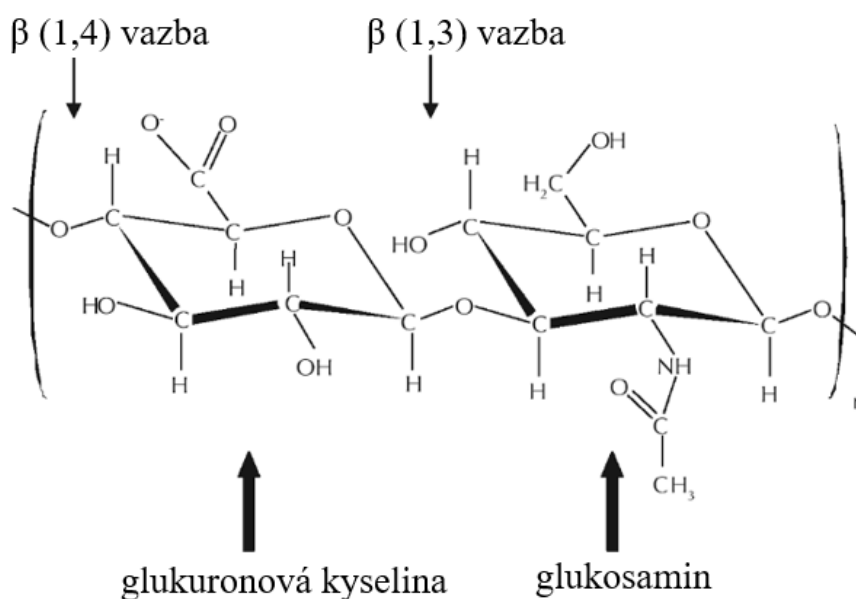
2.1 Hyaluronan

Hyaluronan je polysacharid patřící do skupiny mukopolysacharidů, známých jako glykosaminoglykanů, které se přirozeně vyskytují ve všech živých organismech. Glykosaminoglykany obsahují sulfátovou skupinu a jsou syntetizovány v Golgiho aparátu, kde jsou kovalentně vázány na proteiny za vzniku proteoglykanů. Na rozdíl od zástupců této třídy, hyaluronan neobsahuje sulfátovou skupinu, jeho syntéza probíhá prostřednictvím hyaluronansyntázy a nachází se také jako volná molekula [1].

Hyaluronan byl objeven v roce 1943 na Kolumbijské univerzitě v New Yorku biochemikem Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem. Neznámou látku izolovali z hovězího sklivce a rozpoznali strukturu uronové kyseliny a na základě této skutečnosti dostala objevená látka název. Kyselina hyaluronová je odvozeno z řeckého slova *hyaloid*, což v překladu znamená skelný a z *uronové kyseliny*, která je součástí struktury [2]. V průběhu následujících let byla kyselina hyaluronová izolována také z pupeční šňůry a kohoutích hřebínků. S postupně narůstající znalostí této sloučeniny bylo zjištěno, že tento mukopolysacharid je produkován savčími buňkami a určitými druhy bakterie ve formě disociované sodné nebo draselné soli a ve vodném roztoku je polyaniontem. V živém organismu se tedy nevyskytuje jako protonovaná kyselina a z tohoto důvodu byl v roce 1986 přijat obecně platný název hyaluronan, který se používá dodnes [3].

2.1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová je lineární nerozvětvený polymer složený z opakujících se disacharidových jednotek. Jednotkou jsou D-glukuronová kyselina a N-acetyl-D-glukosamin, které jsou spojeny β -1,3 glykosidickou vazbou a samotné disacharidové jednotky se navzájem spojují β -1,4 glykosidickou vazbou. Tyto vazby jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky.



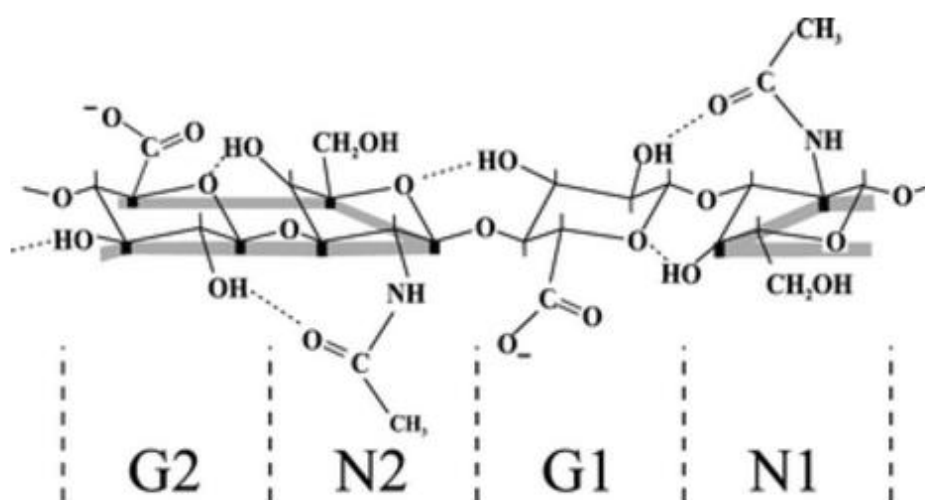
Obr. 1: Struktura hyaluronanu obsahující β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbu [4]

Stabilitu disacharidové jednotky určuje výhodné sterické uspořádání. Glukóza v β konfiguraci, s níž jsou spojeny oba cukry, umožňuje všem prostorově objemným postranním skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují stericky méně výhodné axiální polohy [5]. Postranní skupiny molekuly tvoří hydrofilní oblasti v řetězci a axiální vodíky vytvářejí hydrofobní oblasti nazvané *hydrophobic patches*, díky nimž je hyaluronan schopen se vázat na fosfolipidy, které jsou hlavní složkou membrán. Přítomnost hydrofilních a hydrofobních oblastí řadí hyaluronan mezi amfifilní látky [6].

Uspořádaná helikální struktura hyaluronanu v pevném stavu byla objevena v 70. letech pomocí metody rentgenové krystalografie. Toto objevení povzneslo otázku, zdali existuje uspořádaná forma řetězce hyaluronanu také v hydratovaném stavu.

Struktura hyaluronanu v roztoku byla již v minulosti popsána, za využití klasických reologických technik, jako náhodně svinutá stuha tzv. *random coil* [7]. S ohledem na strukturu, řetězec hyaluronanu obsahuje dva druhy vazeb. Jedním druhem jsou vazby v cukerných kruzích, které jsou relativně tvarově zpevněné. Mezi těmito rigidními kruhy se nachází glykosidické vazby, které obsahují kyslíkový atom spojující jeden cukr s druhým. Z každého kyslíkového atomu vychází dvě vazby připomínající svým sevřením tvar písmene „V“. Připojené sacharidové jednotky nacházející se na konci této vazby mohou rotovat o 360° , jejich rotace, s velkým množstvím možných konfigurací kolem kyslíkového atomu, není ze sterických důvodů náhodná. V následujících letech nukleární magnetická rezonance potvrdila přítomnost uspořádané struktury řetězce hyaluronanu v roztoku, v níž je každá disacharidová jednotka pootočená o 180° vůči předcházející a následující. Dvě pootočení nám vrací původní orientaci. Tato struktura je popisována jako dvakrát stočená šroubovice tzv. *two-fold helix*. Stabilita této vazby je zajištěna pomocí intramolekulárních vodíkových můstků, které znázorňuje Obr. 2 tečkovanou čarou. Uvedená preferovaná konfigurace je důsledkem již zmíněných hydrofobních oblastí, které jsou způsobeny umístěním vodíkových atomů v axiální poloze řetězce hyaluronanu. Hydrofobní oblasti mají vliv na molekuly ve vodném prostředí, které se jejich působením shlukují a snižují povrchové napětí. Tento hydrofobní mechanismus řídí tvorbu membrán a přispívá ke stabilizaci [6]. Nepolární oblasti jsou v molekule hyaluronanu tvořeny axiálními vodíkovými atomy a polární oblasti jsou tvořeny ekvatoriální stranou řetězce. Následkem těchto pravidelně se střídajících oblastí, zaujímá molekula ve fyziologickém roztoku tvar roztáhlé svinuté stuhly zabírající rozlehlou doménu. V závislosti na koncentraci polymeru se domény mohou překrývat. Malé molekuly jako voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem uvnitř domény, ale velké molekuly jako jsou proteiny budou z domény vytlačovány z důvodu hydrodynamické velikosti, což vede k pomalejší difúzi prostředím hyaluronanu. Zajímavé je, že efektivní velikost pórů v síti se kontinuálně mění. Statisticky mohou existovat póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností. To v principu znamená, že molekuly všech velikostí mohou projít skrz síť hyaluronanu, ale s různým stupněm retardace závislejícím na jejich hydrodynamickém poloměru [5]. Vodné roztoky hyaluronanu jsou viskózní v závislosti na koncentraci a molekulové hmotnosti. Molekulová doména s vysokou molekulovou hmotností řetězce tvoří vysoce viskózní roztoky již při nízkých koncentracích [8].

Počet opakujících se disacharidů, v dokončeném hyaluronanu, je přibližně 10 000, ale jsou známy také řetězce s 25 000 disacharidovými jednotkami [9]. Průměrná délka disacharidové jednotky dosahuje téměř 1 nm [5]. Velikost polymerů *in vivo* se liší typem tkáně. Například hyaluronan v lidské pupeční šňůře má molekulovou hmotnost 3–4 miliony daltonů, zatímco molekulová hmotnost hyaluronanu v synoviální tekutině je 6 milionů daltonů. Nicméně, uvedené hodnoty molekulových hmotností izolovaných polymerů nemusí být přesné, neboť jsou závislé na postupu izolace a zvolené analytické metodě. Molekulová hmotnost hyaluronanu není monodisperzní a experimentální techniky ke stanovení polydisperzity závisí na způsobu extrakce. Například stanovení polydisperzity vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií podléhá výběru typu kolony a rychlosti toku. To má za následek velké kolísání vykazovaných hodnot polydisperzity hyaluronanu a poukazuje to na důležitost standardizace použité analytické metody pro charakterizaci [9].



Obr. 2: Tetrasacharid obsažený v řetězci hyaluronanu skládající se ze dvou opakujících se disacharidových jednotek G = zbytku kyseliny glukuronové a N = N-acetylglukosaminu. G1 a N1 jsou disacharidy pootočené o 180° kolem osy řetězce ve srovnání se sousedními jednotkami G2 a N2. Tečkovaná čára znázorňuje vodíkové vazby [10].

2.1.2 Sít'ování

Řetězce hyaluronanu mohou také agregovat vzájemně mezi sebou, díky přitažlivým silám jejich hydrofobních oblastí. Sekundární struktura má tvar ploché rovinné stuhu, jejíž konce jsou identické, avšak jedna strana stuhu běží v opačném směru vůči druhé, jsou antiparalelní. To má za následek možnost stejných procesů na obou stranách, a tudíž agregáty tak mohou růst v obou směrech.

Hyaluronové sítě se tvoří již při nízkých koncentracích a s rostoucí molekulovou hmotností se stávají pevnější až v podstatě nekonečné. Každá molekula hyaluronanu je v nich spojena se všemi ostatními molekulami. Elektrostatická repulze mezi zápornými náboji, která by mohla podporovat disociaci agregátů, je překonána hydrofobními interakcemi a vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karbonylovou skupinou. Jenomže interakce, které drží síť pohromadě jsou poměrně slabé, takže agregáty se mohou tvořit a disociují v závislosti na fyzikálně-chemických podmínkách [6].

2.1.3 Produkce

Hlavním požadavkem pro produkci kyseliny hyaluronové je její vysoká čistota a velký rozsah molekulové hmotnosti. Obecně lze říci, že existují tři metody produkce hyaluronanu, a to izolace ze zvířecí tkáně, bakteriální fermentace a chemoenzymatická syntéza [11].

V průběhu let od svého objevení byla kyselina hyaluronová izolována z různých zdrojů, jako je pupeční šňůra, kohoutí hřebínky, hovězí a prasečí synoviální tekutina, oční bulvy mečouna a matrice chrupavky [12]. V roce 1949 Norman Boas jako první izoloval kyselinu hyaluronovou z kohoutích hřebenů a odůvodnil, že tloušťka hřebenů je větší oproti slepičím z důvodu přítomnosti silné vrstvy pojivové tkáně, v níž se cílený hyaluronan nachází. Proces izolace a purifikace zahrnoval dezintegraci a homogenizaci tkáně, přidání organických rozpouštědel k odstranění tuků a bílkovin. Vyčištěná a vysušená kyselina hyaluronová byla izolována s výtěžkem 0,1 % hmotnosti zpracovaných hřebenů [13]. Z důvodu nízkého výtěžku, vznikajícím etickým problémům a obavám z rizika virové infekce se průmyslová výroba obrátila na bakteriální fermentaci [14].

Řada bakteriálních kmenů je schopna produkovat hyaluronan ve velkém výtěžku za aerobních i anaerobních podmínek. Tato schopnost je společným znakem rodu streptokoků. Využívají se bakterie *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* a *zooepidemicus*. Jedná se o lidské, resp. zvířecí patogeny. Je však zřejmé, že produkce hyaluronanu pro lidské využití bude vycházet z bakteriálního kmene nezpůsobujícího lidská onemocnění. Poslední dva zmínění zástupci se tak v současné době staly nejvíce používanými producenty hyaluronanu. Princip syntézy spočívá v tom, že bakterie si tvoří z hyaluronanu extracelulární kapsuly, pomocí níž se obalí, a takto vytvořený hyaluronan je pro savčí tkáň nerozeznatelný od vlastního, což umožňuje bakteriím napadnout hostitelský organismus, aniž by byly ohroženy jeho imunitním systémem [11]. Produkční kmen *S. equi* produkuje hyaluronan s nižší molekulovou hmotností, zatímco bakteriální kmen *S. zooepidemicus* produkuje hyaluronan s vyšší molekulovou hmotností. V současné době je hyaluronan produkován z různých zdrojů a s různým stupněm čistoty. Vzniklé nečistoty závisí na způsobu purifikace a jsou to nejčastěji bakteriální endotoxiny, nukleové kyseliny, chondroitinsulfát, proteiny a těžké kovy [15]. Problémy, s nimiž se potýká bakteriální produkce jsou, že některé kmeny produkují hyaluronan jen v určité fázi svého životního cyklu a u určitých kmenů může probíhat souběžná produkce hyaluronidázy, což je enzym degradující hyaluronan [14]. Expresí proteinu hyaluronidázy odkazuje ke genetické manipulaci a využití bakteriální fermentace s rekombinantním *Bacillus subtilis*, jenž neobsahuje exotoxiny ani endotoxiny, neprodukuje hyaluronidázy a jeho genom je plně sekvenován [16].

Chemoenzymatická metoda využívá rekombinantní enzymy k produkci oligosacharidů hyaluronanu dané délky. Délka hyaluronanu polysacharidového řetězce určuje biologické účinky v buněčných a tkáňových systémech. Principem je řízená enzymatická reakce využívající enzym hyaluronansyntázu, z bakteriálního kmene *Pasteurella*, která katalyzuje syntézu hyaluronanu za využití monosacharidů z cukerných prekurzorů. Výsledkem jsou polymery hyaluronanu o požadované velikosti. Produkce hyaluronanu se vyznačuje úzkou distribuční velikostí v rozmezí od 16 kDa do 2 MDa [17].

2.1.4 Metabolismus

Metabolismus hyaluronanu je, v živých organismech, velmi dynamický. Koncentrace hyaluronanu se liší v jednotlivých tkáních a metabolická syntéza a degradace se tak neustále vyvažují pro udržení jeho koncentrace [18].

Syntéza hyaluronanu probíhá na vnitřní straně plazmatické membrány. Účastní se jí tři integrální membránové proteiny zvané hyaluronansyntázy označované jako HAS1, HAS2 a HAS3. Každý enzym je schopen syntetizovat *de novo* řetězec hyaluronanu. Enzymy mají odlišné katalytické vlastnosti. HAS1 a HAS2 jsou nejméně aktivní a řídí syntézu vysokomolekulárního hyaluronanu. HAS3 je nejvíce aktivní a podporuje syntézu velkého množství nízkomolekulárního hyaluronanu. Příslušné enzymy střídavě vážou, k redukujícímu konci řetězce, jednotlivé monosacharidové jednotky a narůstající polymer je pak vytlačen do extracelulárního matrix, kde je schopen tvořit komplexy s proteiny a stává se tak součástí pericelulárního obalu buňky [19]. Syntéza řetězce hyaluronanu obsahujícího tak velký počet disacharidových jednotek je pro buňky vysoce energeticky náročná, a proto je přísně regulována. Regulace probíhá pomocí uridindifosfát cukerným zdrojem, který přímo ovlivňuje rychlost hyaluronové syntézy [20].

Enzymatická degradace hyaluronanu se uskutečňuje v játrech, jako intracelulární proces, ve dvou fázích. První fáze zahrnuje rozklad polysacharidu na monosacharidové jednotky a ve druhé fázi dochází k jejich využití. Rozklad monosacharidů je výsledkem aktivity tří typů enzymů nazývaných hyaluronidáza, β -D-glukuronidáza a β -N-acetyl-hexosaminidáza. Hyaluronidázy štěpí vysokomolekulární hyaluronan na menší oligosacharidy a zbylé dva enzymy štěpí vzniklé fragmenty. Konečné produkty degradace jsou využity k další biosyntéze polysacharidů [21].

2.1.5 Výskyt a význam v organismu

Hyaluronan se přirozeně nachází téměř ve všech tkáních a tekutinách obratlovců, kde je součástí extracelulární matrix. Je hlavní složkou očního sklivce, kterému zajišťuje viskoelastické vlastnosti [22]. Slouží jako konstrukční prvek v hyalinní chrupavce a synoviální tekutině, kde snižuje tření a tlumí nárazy. Nachází se v krevních cévách a tepnách, v okolí hladké svalové buňky v aortě. Nejvyšší množství hyaluronanu se nachází v kožní tkáni, kde se vyskytuje více než 50 % z celkového obsahu hyaluronanu v lidském těle. Je přítomen jak v epidermis, tak v dermis a tvoří mezerovou výplň mezi vrstvenými keratinocyty, čímž poskytuje prostor pro výměnu nutričních a regulačních metabolitů. Svou unikátní schopností absorbovat vysoké množství vody, zajišťuje hydrataci kůže. Hyaluronan účinně absorbuje volné radikály způsobené UV zářením tím, že odstraňuje reaktivní formy kyslíku a plní tak ochrannou roli pokožky před škodlivými látkami [23].

Hyaluronan v extracelulární matrix slouží jako signální molekula. Buněčný povrchový receptor RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility) je zodpovědný za pohyblivost buněk a receptor CD44 (Cluster of Differentiation) je markerem pro epidermální růstovou diferenciaci. Ztráta diferenciaci keratinocytů v karcinomu je spojena se sníženou regulací receptoru CD44. Hyaluronan je tak soustředěn i v oblasti rakovinných buněk a jeho produkce je způsobena samotnými nádorovými buňkami nebo mezibuněčnou interakcí ve stromatu. Díky této afinitě je hyaluronan vhodným nástrojem pro studium cílené distribuce léčiv [24].

2.1.6 Využití

Hyaluronan se díky svým jedinečným vlastnostem nabízí jako unikátní biologický materiál, který nalézá uplatnění v medicínské a farmaceutické aplikaci. Jedná se o biokompatibilní, bioaktivní a tělu vlastní látku. Není cytotoxický, teratogenní ani imunogenní. Předními vlastnostmi jsou viskoelasticita a hydratační schopnost, které se využívají zejména k omlazení v estetické medicíně. Postupně s věkem dochází k úbytku objemových měkkých tkání a tím ke snížení obsahu hyaluronanu v pleti, čímž se vytrácí její pružnost. Řešení přichází s objevením nové technologie v podobě injekčně aplikované kožní výplně hyaluronanu zajišťující augmentaci tkání a postupné vyhlazení vrásek. Snadná implantace hyaluronanu tak poskytuje neinvazivní a nechirurgickou alternativu pro korekci vad obličeje. Výplně jsou bezpečné a účinné, jejich nevýhoda spočívá v relativně rychlém rozložení, a proto je nutné proces aplikace opakovat. Dnes je kyselina hyaluronová běžnou součástí produktů v péči o pleť [25].

Ve své nativní podobě je hyaluronan schopen absorbovat velké množství vody a udržovat hydratované prostředí. Je však dobře rozpustný a odbouratelný z organismu a nalézá tak určitá omezení v regenerativní a reparativní medicíně. Nedostatek v podobě krátkého poločasu rozpadu a mechanické integrity ve vodném prostředí odkazuje na potřebu zavedení chemické modifikace. Chemická derivatizace hyaluronanu ovlivňuje jeho rozpustnost. Příkladem jsou hylany vzniklé zesílením hydroxylových skupin hyaluronanu. Lze připravit dva typy. Hylan A spojuje hydroxylové skupiny hyaluronanu s residuálními proteiny za použití formaldehydu v bazickém prostředí. Jeho reakční produkt má stejné vlastnosti jako původní lineární polymer, ale má vyšší molekulovou hmotnost. Hylan B je produkován reakcí divinylsulfonátu s hydroxylovými skupinami za alkalických podmínek. Tvoří nabobtnalý gel se zvýšenou elasticitou a má prodloužený poločas rozpadu. Hylany jsou tak běžnou součástí při viskoelastické suplementaci [11].

První lékařská aplikace hyaluronanu se uskutečnila na konci 50. let minulého století v oftalmologii, kdy jeho viskozita pomohla v držení sítnice při oční operaci. V současnosti se používá k léčbě kataraktu, v očních kapkách pro zvlhčování oční sliznice nebo v roztocích v péči o oční čočky [22].

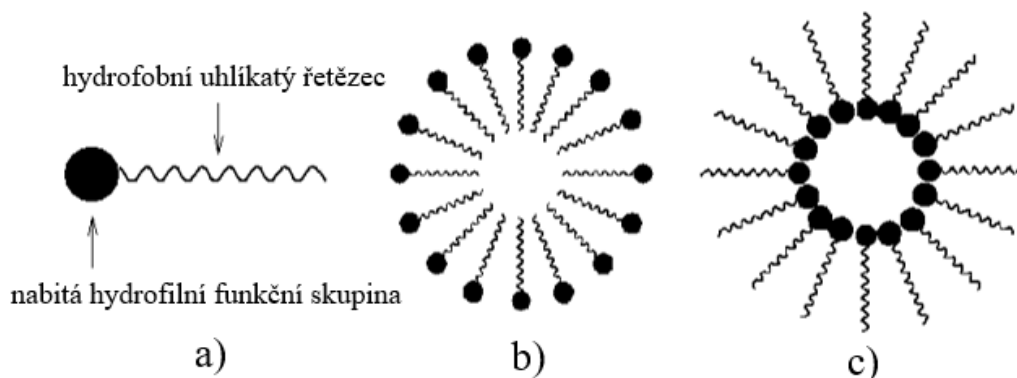
Sodná sůl kyseliny hyaluronové se využívá pro léčbu osteoartritidy. Uvolněním proteoglykanů z extracelulární matrix do tkáně chrupavky dojde k potlačení její další degradace. Chrání také povrch kloubní chrupavky a normalizuje vlastnosti synoviální tekutiny [26].

Současná snaha mnoha výzkumníků je vynaložena na využití hyaluronanu pro cílenou distribuci léčiv. Jde o úsilí vyvinutí sofistikovaného nosiče, který by léčivo uzavřel do sebe, bezpečně dopravil až do místa působení a na určitý podnět uvolnil v organismu [11].

Hyaluronan má velký potenciál v oblasti tkáňového inženýrství. Zesíťovací techniky umožňují zadržení materiálu a kontrolu jeho mechanických vlastností. Hyaluronové hydrogely jsou bioresorbovatelné a používají se jako skafoldy pro opravu a regeneraci tkání. Zejména jsou aplikovány při léčbě komplikovaných diabetických ran a jizev [27].

2.2 Tenzidy

Fázové rozhraní tvoří přechod mezi jednotlivými fázemi a probíhá na něm většina fyzikálních či chemických procesů. Rozlišujeme fázová rozhraní mezi pevnou látkou, kapalinou a plynem [28]. Při zvolení vhodného rozpouštědla, poskytují některé nízkomolekulární látky ve velkém zředění pravé roztoky, ale s počínající určitou koncentrací asociují do vzniku agregátů koloidních rozměrů. Tyto agregáty se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, označujeme jako micelární neboli asociativní koloidy. Mezi tyto systémy patří tenzidy neboli povrchově aktivní látky, které se již při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní a snižují mezifázovou energii. Asociace je podmíněna jejich zvláštní strukturou. Molekuly tenzidů se skládají z části lyofilní (ve vodě hydrofilní), která vykazuje velkou afinitu k rozpouštědлу a z části lyofobní (ve vodě hydrofobní), která je v daném rozpouštědle prakticky nerozpustná. Hydrofilní skupinou je např. $-OH$ nebo $-COOH$, naopak hydrofobní skupiny tvoří nepolární dlouhé uhlovodíkové řetězce. Strukturu tohoto typu označujeme jako amfipatickou nebo amfifilní [29]. Ve vodném roztoku jsou hydrofilní skupiny orientovány do polárního prostředí. Naproti tomu v nepolárním prostředí jsou hydrofilní části molekuly sdruženy v jádru micely a hydrofobní skupiny tvoří vnější obal. Vzniká tak inverzní micela [30].



Obr. 3: Znárodnění a) struktury molekuly tenzidu b) micely c) inverzní micely [30]

Tenzidy rozdělujeme podle jejich schopnosti disociovat v roztoku na ionogenní a neionogenní. Termínem ionogenní označujeme látky, jejichž lyofilní skupiny elektrolyticky disociují a uvolňují protionty. Micela se z tohoto hlediska chová jako globulární elektrolyt. Ionogenní tenzidy dále dělíme na aniontové, kationtové a amfoterní (zwitteriontové) [29]. Aniontové tenzidy disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Nejvýznamnějšími představiteli této skupiny jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin. U kationtových tenzidů dochází při disociaci ve vodě k tvorbě povrchově aktivních kationtů. Častými zástupci této skupiny jsou kvartérní amoniové soli [31]. Amfoterní micelární koloidy obsahují bazickou i kyselou funkční skupinu a vykazují obojetné formy disociace, jak aniontovou, tak kationtovou. Náboj micely závisí na pH prostředí. Mezi amfoterní tenzidy se řadí betainy, sulfobetainy a fosfolipidy. Amfoterní látky se obecně používají ve formulacích s aniontovými nebo neiontovými povrchově aktivními látkami například pro modifikaci rozpustnosti, velikosti micel. Neionogenní tenzidy nejsou schopné elektrolytické disociace v roztoku. Obvykle se skládají z dlouhého uhlovodíkového řetězce s několika polárními, ale neionogenními skupinami na konci, které zajišťují rozpustnost těchto sloučenin [32]. Rozpustnost povrchově aktivních látek ve vodě klesá s délkou uhlovodíkového řetězce [31].

2.2.1 Vznik micel

Při nízké koncentraci se molekuly tenzidu nacházejí ve vodném roztoku ve stavu samostatných molekul. Hydrofobní části amfifilních molekul se však snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím [33]. Se vzrůstající koncentrací se proto co nejdříve samovolně hromadí na mezifázovém rozhraní, kde snižují povrchové napětí. Úplným nasycením povrchu kapaliny dochází k dosažení *kritické micelární koncentrace* (critical micellar concentration, CMC), což je nejvyšší možná koncentrace, při níž jsou povrchově aktivní látky v roztoku v molekulové (iontové) formě. Dosažením této koncentrace se mění směrnice koncentračních závislostí mnohých fyzikálně-chemických vlastností roztoků tenzidů. Například povrchové napětí se s rostoucí koncentrací prudce snižuje a po překročení kritické micelární koncentrace se pak již téměř nemění. Zlomy koncentračních závislostí vykazují také hodnoty molární vodivosti, osmotického tlaku, viskozity a mění se i optické vlastnosti, při nichž nad kritickou micelární koncentrací můžeme pozorovat značný rozptyl světla na útvech koloidních rozměrů [28].

Následný proces *micelizace* neboli tvorba micel se uskutečňuje seskupením nepolárních částí molekul a jejich orientací k sobě. Na povrchu se nachází hydrofilní části molekul, které jsou obklopeny protionty tvořící vnější difúzní dvojvrstvu. Pro vznik micel je také důležitá určitá teplota tzv. *Krafftova teplota*, která je specifická pro každý tenzid. Při jejím dosažení se rozpustnost povrchově aktivních látek rovná hodnotě kritické micelární koncentrace. V jejich nižších hodnotách se netvoří micely, kdežto ve vyšších hodnotách stoupá rozpustnost vlivem tvorby micel [34].

Mezi charakteristiky micel patří *agregační číslo*, které udává počet polymerních řetězců podílejících se na vzniku micely. Hodnota agregačního čísla je pro micely různá a ovlivňuje jejich velikost [30]. Dalšími charakteristikami micelárních systémů jsou *gyrační poloměr* či *hydrodynamický poloměr*, který je definován jako ekvivalentní poloměr koule, která má za stejných fyzikálních podmínek stejné hodnoty měřené veličiny jako částice zkoumaného systému [29].

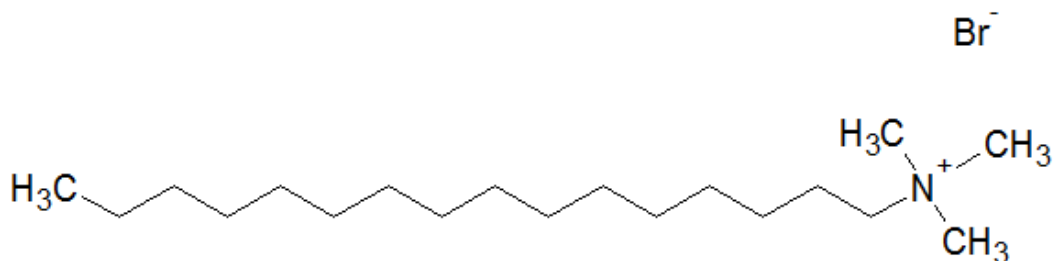
2.2.2 Solubilizace

Micelární koloidy se vlivem své amfifilní povahy vyznačují schopností solubilizace. Solubilizace je definována jako spontánní proces vedoucí ke vzniku termodynamicky stabilního roztoku látky, obvykle nerozpustné nebo jen málo rozpustné v daném rozpouštědle, a to přidávkem amfifilních sloučenin obsahující polymer nad kritickou micelární koncentrací. Takto nerozpustná látka je začleněna do jádra micely a převedena do roztoku [35]. Umístění uvnitř micely je do značné míry závislé na její celkové struktuře. Nepolární látky se primárně rozpouštějí v jádru micely. Amfifilní látky se orientují svými nepolárními skupinami do jádra a polární skupiny zůstávají na povrchu micely. Solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micely nebo v její těsné blízkosti. Procesem solubilizace narůstá objem hydrofobního jádra, dochází ke zvětšení velikosti micel a tím se zvyšuje agregační číslo. Naopak látky vyskytující se v okolí povrchu micely mají minimální nebo žádný vliv na hodnotu agregačního čísla. Solubilizační kapacita je tak kontrolována spíše jádrem micely než polárními skupinami tenzidu. Mezi faktory ovlivňující solubilizaci patří teplota, pH, iontová síla, koncentrace rozpouštěné látky a tenzidu [36]. Solubilizace nachází praktický význam mezi pracími prostředky [28]. Využívá se ve vědě k inkorporaci fluorescenční sondy umožňující zkoumat dané micelární systémy. A v medicíně nalézá potenciál pro rozpouštění lipofilních léčiv [36].

2.2.3 Cetyltrimethylamonium bromid

Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) je kationaktivní tenzid nacházející se ve formě kvartérní amoniové soli s kladným nábojem na dusíku a sumárním vzorcem $C_{19}H_{42}BrN$. Skrývá se také pod názvy hexadecyltrimethylamonium bromid či cetrimonium bromid [37]. Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek s bodem tání asi $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ a molekulovou hmotností $364,45\text{ g/mol}$. CTAB je hygroskopický, částečně rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v ethanolu (96 %) [38]. Ve vodných roztocích tvoří, nad kritickou micelární koncentrací, kladně nabitě sférické micely se středním průměrem asi 4 nm. Při vyšších koncentracích přechází sférické molekuly do válcovitého tvaru a v přítomnosti organického rozpouštědla se micely postupně prodlužují [39]. Dlouhodobá expozice CTAB způsobuje toxicitu a může vyvolat poškození v oblasti jater, kardiovaskulárního systému nebo centrální nervové soustavy [40].

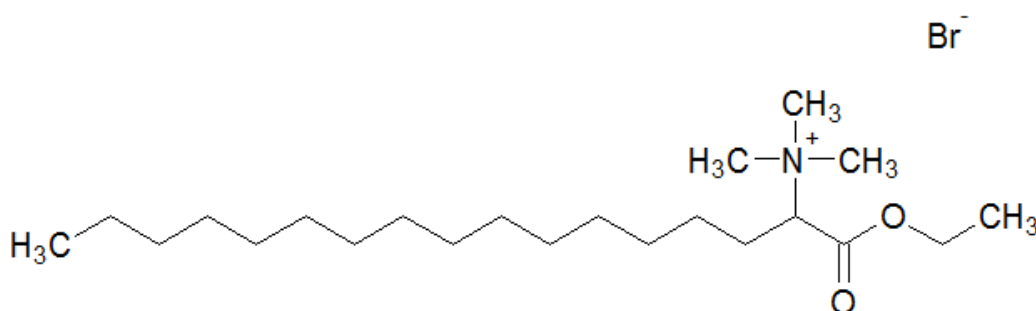
Široké uplatnění nalézá CTAB v syntéze zlatých nanotyčí používaných pro hypertermální léčbu rakoviny. Potažení nanotyčí pomocí CTAB dodá na povrch kladný náboj a jejich vzájemná odpuzivá interakce tak zabraňuje agregaci, což je činí stabilní v roztoku. Nevýhodou je vysoká cytotoxicita a k její eliminaci podléhají nanotyče různým modifikacím [41]. Dále se CTAB používá při srážení nukleových kyselin, mukopolysacharidů a poskytuje kladný náboj při SDS-PAGE v interakci s glykoproteiny [42]. Tvoří komponentu topického antiseptického cetrimidu proti bakteriím a houbám [43]. Pro vědecké účely se využívá k fluorescenčnímu studiu interakcí s opačně nabitými polyelektrolyty, především s hyaluronanem, s nímž tvoří hydrogel. Vytvořené hydrogely mohou zaujmout profil potenciálních nosičů v cílené distribuci léčiv [44].



Obr. 4: Struktura cetyltrimethylamonium bromidu [45]

2.2.4 Karbethodecinium bromid

Karbethodecinium bromid patří také mezi kationtové tenzidy vyskytující se ve formě kvartérní amoniové soli s kladným nábojem na dusíku a se sumárním vzorcem $C_{21}H_{44}BrNO_2$. Jedná se o strukturální analog CTAB, přičemž mají společný shodný bromidový anion, ale liší se v přítomnosti esterové skupiny [46]. Vzhledově jde o bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek s molekulovou hmotností 422,48 g/mol a bodem tání 153–156 °C. Vyznačuje se dobrou rozpustností ve vodě, ethanolu (96 %) a chloroformu [47]. Podobně jako CTAB tvoří ve vodném roztoku micely. Používá se ve farmaceutickém průmyslu jako účinná látka antiseptických a dezinfekčních přípravků pod komerčními názvy Septonex a Otipur v očních mastích, ušních kapkách a kožních sprejích [46]. Dále se v práci budeme setkávat jen s termínem Septonex.

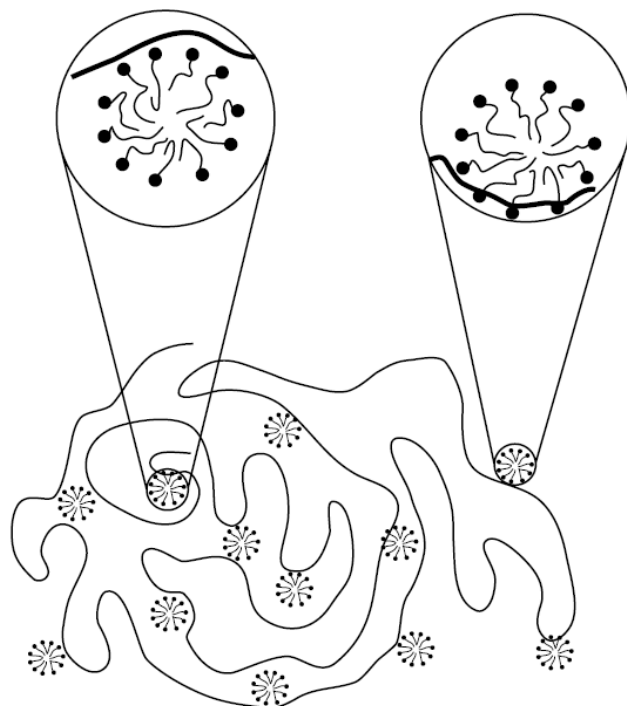


Obr. 5: Struktura karbethodecinium bromidu [48]

2.2.5 Interakce polymerů s tenzidy

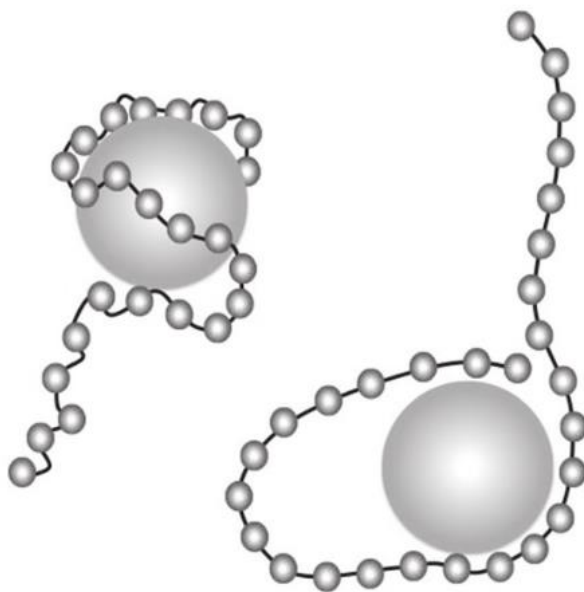
Interakce polymerů s tenzidy se používá za různými účely, přičemž nejběžnějším je proces zahuštění a tvorba gelu.

Obecně, povrchově aktivní látky snižují mezifázové rozhraní. V případě iontových tenzidů je tato schopnost částečně modifikována přidáním polymeru do roztoku v závislosti na jeho koncentraci. Při nízké koncentraci může nebo nemusí dojít ke snížení povrchového napětí, zatímco se vzrůstající koncentrací dojde v určitém bodě ke zlomu a začnou se tvořit menší shluky tenzidu na řetězci polymeru [49]. Tato koncentrace se nazývá *kritická agregační koncentrace* (critical aggregation concentration, CAC) a je o několik řádů nižší než kritická micelární koncentrace samotného tenzidu. Skutečnost, že tenzid má nyní menší tendenci přejít na rozhraní voda-vzduch naznačuje, že došlo k vytvoření vazby s polymerem. Navázané molekuly tenzidu tvoří podél řetězce polymeru kulaté shluky nazývané *minimicely* a na základě vytvořeného charakteristického útvaru dostala označení *struktura perlového náhrdelníku*, tzv. *pearl necklace model*. Amfifilní polymery obsahující hydrofobní část molekul se samoasociují vlivem svých hydrofobních interakcí s molekulami tenzidu. Polymer schopný elektrolytické disociace, tzv. polyelektrolyt, v roztoku disociuje a jeho disociované funkční skupiny jsou obklopeny ekvivalentním množstvím protiontů. S opačně nabitými náboji polymeru a tenzidu dojde, vlivem elektrostatické interakce, k silné asociaci. U iontových tenzidů s neiontovým polymerem reagují ochotněji aniontové tenzidy než kationtové [49; 50].



Obr. 6: Struktura modelu perlového náhrdelníku – interakce polymer-tenzid

V případě neiontových tenzidů existuje velmi slabá, až téměř žádná, vazba s nenabitým polymerem [51]. S popisovanou interakcí polymer-tenzid souvisí parametr charakterizující tuhost polymerového řetězce. Obvykle flexibilní polymer poskytuje snazší vazbu a silnější asociaci k povrchu micely a zároveň udává nižší hodnotu kritické agregační koncentrace.



Obr. 7: Porovnání struktur znázorňující vazbu flexibilního a rigidního řetězce polymeru k micelle

Neustálým zvyšováním koncentrace povrchově aktivní látky dojde v určitém bodě k nasycení polymeru tenzidem, zvýší se viskozita roztoku a nastane fázová separace. Rozsah fázové separace v systému roste s délkou alkylového řetězce tenzidu a molekulární hmotností polymeru [49].

2.2.6 Interakce hyaluronanu s kationaktivními tenzidy

Hyaluronan podobně jako jiné negativně nabitě polymery interaguje s kationaktivními tenzidy za vzniku silné asociace a následuje obecný vzorec chování popsany v předchozí kapitole. Vzájemná agregace mezi těmito dvěma komponentami, ve vodném prostředí, vzniká vlivem jejich příspěvku elektrostatických a hydrofobních interakcí [52]. Hyaluronan ve formě sodné soli nese v neutrálním pH jeden negativní náboj na každém druhém zbytku a tato vzdálenost byla odhadnuta na 1,2 nm [53]. Mechanismem elektrostatického působení se při CAC začnou molekuly tenzidu vázat na řetězec hyaluronanu a vznikají již zmíněné micely [54]. Z elektrostatického hlediska se volný tenzidový ion (CTA^+) chová stejně jako hyaluronový proton (Na^+) a záporně nabitý polyelektrolyt nevykazuje žádnou preferenci. Neustálá snaha o minimalizaci s vodným prostředím, díky hydrofobním oblastem tvořených uhlovodíkovými řetězci tenzidu, vede k naklonění interakce hyaluronanu k tenzidovým iontům (CTA^+). Díky této preferenci vzrůstá jejich koncentrace v okolí polyelektrolytu oproti celému roztoku, tím pádem může být překročena CMC a mohou tak vznikat micely i při celkové koncentraci tenzidu nižší než CMC. Nízká lineární hustota náboje na řetězci polyelektrolytu je příčinou poměrně slabých sil mezi hyaluronanem a tenzidy. Při dosažení určité koncentrace a v jistém poměru přítomných složek dochází v systému k fázové separaci [55].

Fázové chování systému hyaluronan-tenzid-voda se běžně popisuje ternárním diagramem. Převažující izotropní jednofázová oblast diagramu je rozdělena dvoufázovou oblastí vystupující z rohu vodné fáze. Dvoufázová oblast má kapkovitý tvar a je zřetelně nakloněna k rohu tenzidu, což naznačuje, že systém hyaluronan-tenzid inklinuje k tvorbě koncentrované fáze a odděluje se od vody. Obsah vody bude stanoven vznikem této fáze, velikostí částic a neposledně hydrofilicitou výsledných komplexů. Vzorky umístěné v této oblasti podléhají fázové separaci, jejíž příčinou je redukce náboje v daném systému a precipitát je následně transformován do gelové fáze [52].

Vzniklé gely jsou transparentní a obsahují velké množství vázané vody, což reflektuje vysokou hydrofilicitu a pravděpodobně napomáhá k ustanovení rovnováhy v systému. Tvorba gelů je podmíněna hyaluronanem o dostatečně vysoké molekulové hmotnosti, neboť při použití nižší molekulové hmotnosti jsou gely tekutější. Gely obsahují hydrofobní domény tvořené tenzidy v důsledku překročení kritické micelární koncentrace. Samovolná difúze tenzidů v gelech je velmi nízká a podobně difúze hyaluronových řetězců je pomalejší kvůli vzniku komplexu hyaluronan-tenzid [53].

Gely je možné znovu rozpustit přidáním jednoduchého elektrolytu či nadbytkem tenzidu. Snížení interakce mezi hyaluronanem a tenzidem je způsobeno odstíněním elektrických interakcí zvýšením iontové síly v roztoku [55]. Koncentrace, při níž dojde k potlačení fázové separace se nazývá *kritická elektrolytická koncentrace* (critical electrolyte concentration, CEC) [52]. Přidáním soli dojde k ovlivnění fázové separace, a to nám podává důkaz o tom, že interakce hyaluronan-tenzid jsou elektrostatického charakteru [55].

2.3 Gely

Termínem gely se označují koloidní disperzní soustavy, kde pevné částice disperzního podílu tvoří trojrozměrnou síť prostupující spojitou fází disperzního prostředí. Uspořádání částic v síti poskytuje gelům mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav, ačkoliv disperzní prostředí je kapalné. Gely s kapalným disperzním prostředím se nazývají *lyogely* a podle charakteru disperzního prostředí rozlišujeme *hydrogely* (rozpuštědlem je voda) a *organogely* (rozpuštědlem je organická látka). Vysušením lyogelu vzniká kompaktní *xerogel*, který lze procesem botnání uvést zpět do vzniku gelu (omezené botnání) nebo až do vzniku koloidního roztoku (neomezené botnání). Podle této schopnosti opětovného návratu do původního stavu přidáním rozpuštědla rozlišujeme gely *reverzibilní* a *ireverzibilní*. Proces, při kterém dochází ke vzniku gelu se nazývá gelace [28].

2.3.1 Gelace

Procesem gelace dochází ke spojování molekulárních lineárních řetězců polymeru v koloidním roztoku, a to je doprovázeno vznikem uzlových oblastí. Při dosažení určitého stupně reakční přeměny, tzv. *body gelace*, se objeví trojrozměrná síť [29]. Podle typu sil, které drží síť v těchto uzlech pohromadě, rozdělujeme gely síťované *chemicky* nebo *fyzikálně*. Chemické gely vznikají vhodně uspořádanou polymerací monomerů nebo již z hotových lineárních polymerů pomocí síťovacího činidla [31]. Tato struktura je zesítena prostřednictvím kovalentních vazeb a vyznačuje se velkou pevností [56]. Naproti tomu, zesítení fyzikálních gelů je dáno mezimolekulovým působením fyzikálních sil jako jsou van der Waalovy síly, polární síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce a může dojít také k vzájemnému zauzlení řetězců [57]. Obecně platí, že zesítení fyzikálních gelů je přechodné povahy, a proto je jejich spojení slabší než u chemických gelů [58]. Na samotný proces gelace má vliv zejména teplota, pH, koncentrace a také mechanické podmínky [28].

2.3.2 Vlastnosti

Charakteristickou vlastností gelů je elasticita. S ohledem na uspořádání částic se i přes majoritní podíl kapalného disperzního prostředí chovají jako látky v tuhém stavu a odolávají vystavené deformaci až do určité kritické hodnoty [28]. Reverzibilní gely s malým počtem vazeb jsou značně elastické, naopak se vzrůstajícím počtem uzlů se struktura stává rigidnější a tím se snižuje možnost změny konformace molekuly. Jestliže jsou síly poutající původní disperzní částice do sítě gelu velmi slabé, je možné tyto síly porušit mechanickým účinkem, obzvláště protřepáním, a přejít do stavu koloidního roztoku. Tento proces se nazývá *tixotropie* [31]. Děj opačný, tedy vznik gelu protřepáním koloidního roztoku, se nazývá *reopexie* [28]. Difuzivita je pro nízkomolekulární látky a ionty v gelu téměř neměnná a potažmo i elektrická vodivost se nemění důsledkem nezměněného pohybu částic v gelu [31]. Zvýšení teploty a přidavek elektrolytů má vliv na zvýšený pohyb částic v gelu. Vlivem teplotních výkyvů prodělávají *termoreverzibilní* gely přechody v obou směrech [59]. Stoupající teplota způsobí růst počtu uzlových bodů, prostorová síť podléhá kontrakci a zmenšuje svůj objem. Tento jev je označován jako *stárnutí* gelu. Postupně se gel stává tuhý, poněvadž se snižuje model pružnosti. Vlivem smrštění dochází k objemové expanzi a kapalina je vyloučena z gelu. Objem gelu je tedy snížen o vyloučené množství kapaliny. Tento jev je označován jako *synereze* [60].

2.3.3 Hydrogely

Hydrogely představují trojrozměrné sítě polymerních řetězců, které se vyznačují schopností absorbovat vysoké množství vody. Po kontaktu s vodou se nerozpouštějí, ale postupně zvětšují objem a bobtnají. Schopnost hydrogelů vázat a udržet velké množství vody vychází z hydrofilní povahy funkčních skupin vázaných na řetězci polymeru a jejich rezistence vůči rozpouštění je způsobena vlivem zesílení [61]. Polární skupiny jsou hydratovány jako první, což vede ke vzniku *primárně* vázané vody. Výsledkem je nabobtnání prostorové sítě a vystavení hydrofobních skupin, které rovněž interagují s molekulami vody za vzniku *sekundárně* vázané vody. Primárně a sekundárně vázaná voda se souhrnně označují jako *celkově* vázaná voda. V důsledku působení osmotické síly vniká do prostorové sítě dodatečná voda nazývaná jako *volná* voda, která vyplňuje volný mezisíťový prostor [62]. Voda uvnitř hydrogelu umožňuje volnou difúzi některých solutů, načež polymer slouží jako matrix k udržení vody [63].

Hydrogely mohou být připraveny z přírodních i syntetických polymerů prostřednictvím chemického nebo fyzikálního zesílení. Přírodní hydrogely se vyznačují žádoucími vlastnostmi, neboť jsou biokompatibilní, biodegradabilní, bohaté na zdroje a zároveň šetrné k přírodě. Příkladem přírodních zdrojů hydrogelů je alginát, chitosan, kolagen a hyaluronan. Nicméně, nízká stabilita, nedostatečné mechanické vlastnosti či rapidní degradační rychlost se řadí mezi nevýhodné vlastnosti, které zapříčinily částečné nahrazení přírodních polymerů syntetickými. Syntetické polymery jsou pevné, elastické, mají dlouhou dobu života a jsou schopny absorbovat mnoho vody. Do této třídy patří například poly(ethylenglykol) nebo poly(akrylamid) [64].

Vznik hydrogelů probíhá stejně jako u gelů procesem gelace za účasti hydrofilních látek [61]. Jejich příprava bývá často spojena s přítomností toxických látek, ale konečné degradační produkty nesmí být toxické a ideálně by měly být metabolizovány do nezávadných produktů nebo vyloučeny organismem [62]. Kromě toho, hydrogely jsou relativně deformovatelné a mohou zaujmout tvar povrchu na kterém jsou aplikovány. Hydrogely jsou schopné vykonávat reverzibilní změny objemu v závislosti na různých fyzikálních nebo chemických podnětech. Fyzikálními podněty může být teplota, světlo, elektrické či magnetické pole a chemickými podněty může být pH, složení rozpouštědla a iontová síla. Přirozeně se dá očekávat, že tyto konformační změny elastických sítí řetězců polymeru budou viditelné na makroskopické úrovni [61; 63].

Hyaluronové hydrogely jsou díky své přirozené biokompatibilitě a biodegradabilitě stále více používány v oblasti medicínského využití. Předpoklad pro úspěšné využití těchto systémů v cílené distribuci léčiv je znesnadňováno výskytem hyaluronidázy, která způsobuje vysokou degradační rychlost hyaluronanu. Jeden z přístupů k překonání této překážky je konjugace se syntetickými materiály pro zvýšení pevnosti a odolnosti [64]. Hyaluronan je, jako modelový polymer, použit pro přípravu hydrogelových systémů a vytvořené hyaluronové hydrogely jsou předmětem této diplomové práce.

2.3.4 Využití gelů

Obecně, gely nacházejí využití v mnoha odvětvích průmyslu. Především se používají v potravinářském průmyslu jako zahušťovadla, v zemědělském a kosmetickém průmyslu [62]. Hydrogely nalézají uplatnění při výrobě hygienických produktů, kontaktních čoček. Největší potenciál však v současné době mají na poli tkáňového inženýrství, regenerativní medicíny a cílené distribuce léčiv [61].

2.4 Fluorescence

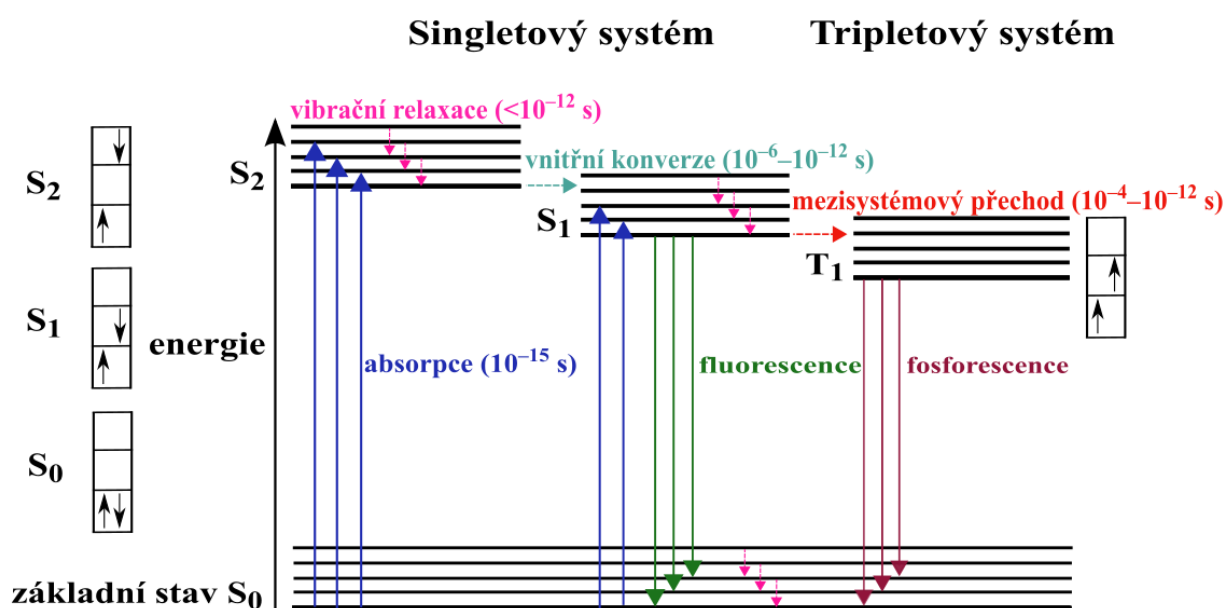
Luminiscence je emise světla, která nastává z excitovaných elektronových stavů. Luminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence, a to v závislosti na původu excitovaného stavu [65]. Lze také uvádět zpožděnou fluorescenci [66]. Pro uskutečnění fluorescence je zapotřebí, aby se excitovaný elektron nacházel v singletovém stavu a měl tedy opačný spin v orbitalu než jeho párový elektron nacházející se ve stavu základním. Následkem toho je navrácení excitovaného elektronu zpět na základní hladinu spinově povoleno a dochází k emisi fotonu. Emisní rychlost fluorescence je typicky 10^8 s^{-1} , takže běžná doba života se pohybuje okolo 10 ns. Doba života fluoroforu je průměrná doba mezi excitací a návratem do základního stavu. Fluorescence se obvykle vyskytuje u aromatických molekul. Typickými fluorescenčními látkami neboli fluorofory jsou fluorescein, akridinová oranž, Rhodamin B. Spektrální údaje o fluorescenci jsou prezentovány formou emisních spekter. Fluorescenční emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence proti vlnové délce (nm) nebo vlnovému číslu (cm^{-1}). Tato spektra se liší pro různé látky a jsou závislá na chemické struktuře fluoroforu a rozpouštědla.

Fosforescence je emise světla z tripletového excitovaného stavu, kde oba párové elektrony mají shodně orientované spiny. V důsledku toho je přechod do základního stavu spinově zakázaný a emisní rychlost je pomalejší ($10^3\text{--}10^0 \text{ s}^{-1}$). Doby života fosforescence jsou tak v řádech milisekund až sekund.

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod excitovaného elektronu ze singletového stavu do tripletového stavu a následně zpět do téhož singletového stavu, odkud dochází k emisi záření. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je proto totožné s emisním spektrem fluorescence, avšak k emisi dojde po delší době, která je dána setrvačností excitovaného elektronu v metastabilním tripletovém stavu [65].

2.4.1 Jabloňského diagram

Jabloňského diagram se často používá ke znázornění procesů vyskytujících se mezi absorpcí a emisí světla. Diagram je znázorněn na následujícím obrázku.



Obr. 8: Jabloňského diagram

Na diagramu je znázorněn základní, první a druhý singletový stav (S_0 , S_1 , S_2) a první a druhý tripletový stav (T_1 , T_2). Každý elektronový stav zahrnuje více vibračně-rotálních stavů. Energeticky nejnižší hladina je S_0^0 a nazývá se základní stav. Procesem absorpce je elektron excitován z tohoto základního stavu na energeticky vyšší hladinu. V excitovaném stavu ztrácí molekula svou přebytečnou energii různými deaktivními procesy. K deexcitaci a navrácení se zpět na základní hladinu může dojít zářivými procesy, kdy dochází k emisi fotonu (fluorescence, fosforescence) nebo nezářivými procesy (vibrační relaxace, vnitřní konverze, mezisystémový přechod). Bezprostředně po excitaci nastává *vibrační relaxace*, při níž excitovaný elektron přechází na nejnižší vibračně-rotální hladinu příslušného elektronového stavu [65]. Při *vnitřní konverzi* dochází k přechodu elektronu mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. Nejčastěji nastává, jestliže nejnižší vibračně-rotální hladina elektronového stavu se nachází energeticky na stejné úrovni jako některá z vibračně-rotálních hladin nižšího elektronového stavu [67]. Dalším nezářivým procesem je mezisystémový přechod, při kterém dojde k spinové konverzi a systém tak přejde do tripletového stavu. Následuje zpravidla fosforescence, která se ve srovnání s fluorescencí objevuje v delších vlnových délkách. Po návratu do základního elektronového stavu se elektron obvykle nachází na některé z vyšších vibračně-rotálních hladin, ze kterých se prostřednictvím vibrační relaxace dostává zpět do výchozího stavu [65].

2.4.2 Franck-Condonův princip

Franck-Condonův princip je založen na tom, že při přechodu mezi elektronovými stavy je pohyb elektronů (10^{-15} s) rychlejší než pohyb jader (10^{-10} – 10^{-12} s) molekuly. Přechod elektronu se díky jeho rychlosti děje bez přizpůsobení pozice jádra molekuly a molekul prostředí. Tento přechod je však termodynamicky nestabilní, a proto dochází k excitaci elektronu na takovou vibračně-rotální hladinu vyššího elektronového stavu, aby došlo k minimálním změnám pozic jádra molekul a molekul prostředí. Tím se vysvětluje, proč při přechodu elektronu mezi elektronovými stavy dochází k obsazení většinou vyšší vibračně-rotální hladiny [67]. Při zářivých deexcitačních procesech je energie emitovaného záření nižší oproti absorbovanému záření. Vlnová délka excitace je typicky kratší než vlnová délka emise. Tento jev se nazývá *Stokesův posun* a je definován jako rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního záření a vlnovou délkou maxima emisního záření.

2.4.3 Doba života a kvantový výtěžek

Nejdůležitějšími charakteristikami fluoroforu je doba života a kvantový výtěžek. Kvantový výtěžek je definován jako poměr počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Platí pro něj následující rovnice:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (1)$$

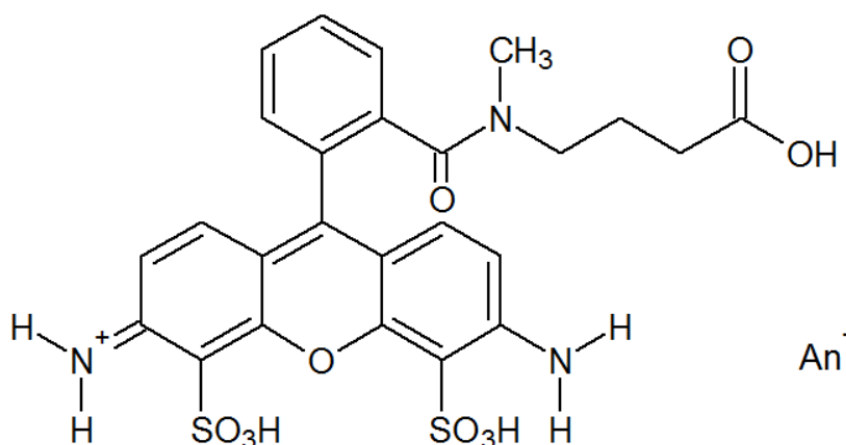
kde Q je kvantový výtěžek a Γ , k_{nr} jsou rychlostní konstanty zastupující rychlost depopulace excitovaného stavu. Konstanta Γ označuje zářivý přechod, konstanta k_{nr} zahrnuje všechny možné nezářivé procesy. Vysoké kvantové výtěžky se blíží jednotkové hodnotě, ale z důvodu Stokesova posunu jsou menší než jedna. Doba života je průměrný čas, po který molekula setrvává v excitovaném stavu, než se vrátí do stavu základního. Doba života a kvantový výtěžek patří mezi základní charakteristiky pro výběr vhodné fluorescenční sondy [65].

2.5 Fluorescenční sondy

Fluorescenční látky se vlivem silného okolního prostředí na fluorescenci používají pro studium fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů [67]. Fluorofory se obecně rozdělují do dvou hlavních tříd – vnitřní a vnější. *Vnitřní* fluorofory se vyskytují přirozeně a jsou to v podstatě fluoreskující součásti struktury zkoumaných molekul. Zahrnují flaviny, deriváty chlorofylu a patří sem také proteiny, za jejichž fluorescenci jsou zodpovědné aromatické aminokyseliny, např. tryptofan. *Vnější* fluorofory jsou přidány do systému za účelem poskytnutí fluorescence v případě, že zkoumaná látka nefluoreskuje nebo její vnitřní fluorescence není adekvátní pro požadovaný experiment. Do této třídy se řadí například fluorescein a rhodaminy [65]. K uskutečnění nevlastní fluorescence se používají vnější kovalentně vázané fluorofory (fluorescenční značky) nebo vnější asociační fluorofory (fluorescenční sondy). Výhodou fluorescenčních značek je jejich předem známá pozice v systému, naopak nevýhodou je jejich obtížná syntéza. Proto se častěji používají fluorescenční sondy, které se rozmisťují v prostředí a na základě citlivosti na určitou vlastnost daného okolí dochází ke změně fluorescenčního signálu [67]. Všechny parametry fluorescence jako je intenzita, kvantový výtěžek, doba života a polarizace mohou poskytnout informace o zkoumaném systému [68]. Důležitou vlastností sondy je její fotostabilita, neboť téměř všechny fluorofory podléhají vybělování. Fluorescenční sondy představují nejdůležitější oblast fluorescenční spektroskopie, protože právě jejich vlastnosti umožňují získat potřebné informace. V současné době je známo až několik tisíc různých fluorescenčních sond [65].

2.5.1 Atto 488

Atto 488 je hydrofilní fluorescenční látka s výbornou rozpustností ve vodě [69]. Vodný roztok má žlutozelenou barvu [70]. Absorpční maximum se nachází při 501 nm, emisní maximum při 523 nm a hodnota molárního extinkčního koeficientu je $9,0 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [69]. Strukturou se jedná o xanthenový derivát [71]. Molekuly mají rigidní uspořádání, kterým nevykazují *cis/trans* izomerii a tím disponují výjimečnou intenzitou s minimálním spektrálním posunem [72]. Charakteristickými rysy sondy jsou silná absorpce, vysoký kvantový výtěžek, výjimečná fotostabilita a potlačení tripletního stavu. Díky těmto vlastnostem je fluorescenční sonda Atto 488 vysoce vhodná pro detekci jednotlivých molekul a mikroskopii s vysokým rozlišením. Navíc se také jeví vhodnou pro využití v průtokové cytometrii a fluorescenční hybridizaci *in situ* [69].



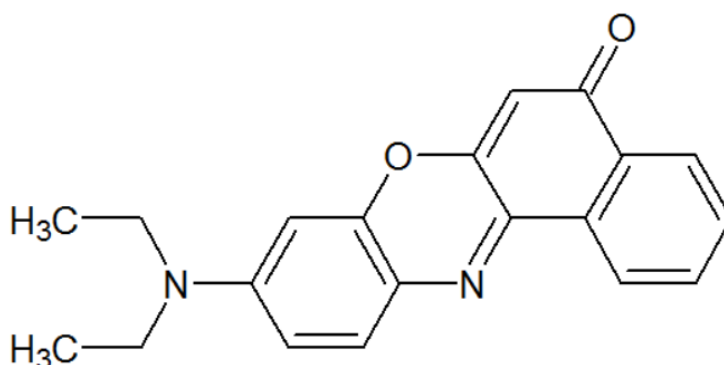
Obr. 9: Strukturální vzorec Atto 488

2.5.2 Rhodamin 6G

Rhodaminová barviva jsou velice oblíbenými fluorofory. Strukturou se opět jedná o deriváty xantheny. Tyto systémy se vyznačují distribucí π -elektronů prostřednictvím dvou identických mezomerních struktur, ve kterých se kladný náboj nachází na jednom ze dvou atomů dusíku. Vzhledem k tomu, že se jejich dipólový moment nemění po excitaci, absorpční maximum vykazuje pouze malou závislost na polaritě rozpouštědla. Jejich fluorescence je však závislá na charakteru substituce aminových skupin. Pokud jsou aminoskupiny plně alkylované, jako je tomu u Rhodaminu B, fluorescence je silně závislá na viskozitě rozpouštědla a teplotě. Jestliže jsou aminoskupiny pouze částečně alkylované, příkladem je Rhodamin 6G, fluorescence je blízká jednotkové hodnotě a je prakticky nezávislá na polaritě rozpouštědla a teplotě. Poslední zmíněný, Rhodamin 6G, je jednou z nejpoužívanějších a nejstudovanějších laserových barviv. Mezi jeho charakteristické znaky patří dobrá fotostabilita a nezávislé absorpční a emisní spektrum na pH. Vlnové délky absorpce a emise se pohybují kolem 500 nm a 600 nm. Význačnou fluorescenci vykazuje při 590 nm. Rhodamin 6G je rozpustný ve vodě, ethanolu a methanolu. Používá se jako referenční barvivo k měření účinnosti jiných barviv a také jako laserové barvivo v kapalných laserech [71; 73].

2.5.3 Nilská červeň

Nilská červeň je neutrální fenoxazinové barvivo, jehož fluorescenční vlastnosti jsou určeny polaritou prostředí, ve kterém se nachází, v důsledku změny dipólového momentu nastávající při excitaci molekuly. Tato změna dipólového momentu je přisuzována separaci náboje mezi diethylaminovou skupinou (donor elektronu) a chinoidní částí (akceptor elektronu). Nilská červeň je ve vodném prostředí velmi omezeně rozpustná a vykazuje poměrně nízkou fluorescenci, která je zhasena vodou. Na druhou stranu, díky lipofilním vlastnostem je rozpustná v organických rozpouštědlech, ve kterých poskytuje silnou fluorescenci. S klesající polaritou rozpouštědla je její excitační a emisní spektrum posunuto ke kratším vlnovým délkám. Svou mimořádnou citlivostí na faktory prostředí se používá jako fluorescenční sonda pro sledování hydrofobních povrchů proteinů a slouží také jako barvivo lipidových membrán [74].



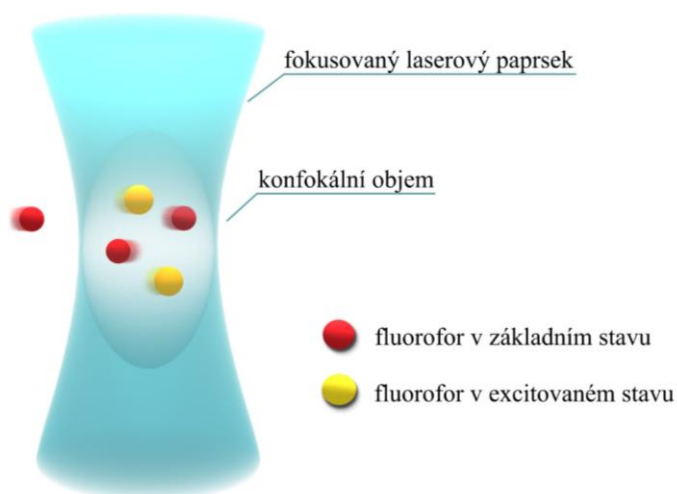
Obr. 10: Strukturální vzorec nilské červeně

2.6 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) patří mezi metody fluorescenční spektroskopie. Na rozdíl od klasických fluorescenčních technik, jejím hlavním předmětem zájmu není intenzita emise samotná, ale nýbrž proměnná intenzita emise v čase způsobená jednotkovým množstvím fluoroforů v malém pozorovaném objemu. Poprvé byla publikována na počátku 70. let, kdy ji vědci Magde, Elson a Webb použili k měření difúze systému vzniklého DNA s interkalovaným léčivem. Tato průkopnická studie byla následována množstvím dalších publikací, nicméně provedená měření byla zatížena vysokým poměrem signálu k šumu, nízkou účinností detektorů a obrovským souborem dat [75]. Postupem času metoda získala řadu technických vylepšení a v současnosti se stala široce používaným nástrojem ke studiu velkého rozmezí asociativních reakcí.

2.6.1 Princip FCS

Fluorescenční korelační spektroskopie je založena na pozorování jedné nebo několika molekul, které průběžně difundují do malého pozorovaného, tzv. konfokálního, objemu. FCS tím umožňuje kontinuální pozorování po delší časový úsek a nevyžaduje selekci specifických molekul. Výsledkem je analýza časově závislé intenzity fluktuace fluorescence, která nastala důsledkem nějakého dynamického procesu [65]. Tímto procesem může být translační difúze, změna rychlosti toku, chemická reakce, rotace molekuly, změna molekulové hmotnosti nebo agregační proces [67]. Ve chvíli, kdy se molekula fluoroforu difúzí dostane do zaostřeného laserového paprsku, dojde k vícenásobné cyklické excitaci a následné emisi fotonů. Jestliže fluorofor difunduje rychle mimo konfokální objem, emise fotonů je krátkodobá. Pokud se fluorofor šíří objemem pomaleji, pak emise fotonů trvá delší dobu. Z korelační analýzy časově závislé emise lze určit difúzní koeficient fluoroforu. V tomto případě pojem časově závislá odkazuje na aktuální čas a nikoli na časový pokles po pulzní excitaci. Excitace je obvykle vyvolána pomocí laseru zaostřeného na difrakčně omezené místo. Konfokální štěrbinu, tzv. *pinhole*, se používá k odstínění nezaostřeného signálu z vnějšího prostoru mimo pozorovaný objem. Použitím těchto optických podmínek, pozorujeme objem elipsoidního tvaru podlouhlého podél optické osy. Schéma efektivního konfokálního objemu znázorňuje následující obrázek.



Obr. 11: Grafické znázornění tvaru konfokálního objemu s naznačeným translačním difúzním pohybem fluoroforů

Konfokální objem zaujímá přibližně $1 \text{ fl} = 10^{-15} \text{ l}$. Pokud je koncentrace fluoroforů 1 nmol , poté pozorovaný objem obsahuje průměrně $0,6$ molekul. Průměrný počet molekul v konfokálním objemu je určen koncentrací vzorku a zůstává během experimentu konstantní. Nicméně, náhodná difúze fluoroforů má za následek časově závislé výkyvy v aktuálním počtu molekul v pozorovaném objemu a tyto výkyvy způsobují kolísání intenzity fluorescence. Zaznamenané fluktuaace jsou zpravidla interpretovány pomocí autokorelační funkce [65].

2.6.2 Autokorelační funkce

Autokorelační funkce je výsledkem statistické analýzy fluktuaací intenzity fluorescence molekul pohybujících se Brownovým pohybem v konfokálním objemu. Je-li znám tvar a velikost konfokálního objemu, lze ze získaných informací o průměrném počtu částic a čase, po který setrvávají v detekčním objemu, určit koncentraci a difúzní koeficient dané molekuly. Pro měření volně difundujících fluoroforů v trojrozměrném prostoru je dána intenzita fluorescenčního signálu F v určitém čase t vztahem:

$$F(t) = \varepsilon \int d\mathbf{r} W(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t), \quad (2)$$

kde ε je molekulární jas, $\overline{W(\mathbf{r})} = W(\mathbf{r})/W(0)$ je normalizovaná rozptylová funkce (point spread function, PSF), v níž $W(0)$ značí středovou laserovou intenzitu a $C(\mathbf{r}, t)$ je koncentrace molekul v určité pozici \mathbf{r} a čase. Autokorelační funkce $G_{AF}(\tau)$ je dána rovnicí:

$$G_{AF}(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} - 1, \quad (3)$$

kde $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu, δ okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ a $F(t + \tau)$ je intenzita fluorescence po určité časové prodlevě. Často se aproximuje třídimenzionální Gaussovou funkcí:

$$W(\mathbf{r}) = W(0) \cdot e^{-\left(\frac{x^2+y^2}{2 \cdot w_r^2}\right) - \left(\frac{z^2}{2 \cdot w_z^2}\right)}, \quad (4)$$

kde w_r a w_z jsou charakteristické rozměry detekčního objemu v laterální a axiální pozici. Substitucí rovnic získáme autokorelační funkci volně difundující částice:

$$G_D(N, D, \tau) = \frac{\gamma_{FCS}}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{w_r}{w_z}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}, \quad (5)$$

kde γ_{FCS} je geometrický faktor, $\langle N \rangle$ je průměrný počet částic a $\tau_D = w_r^2 / 4 \cdot D$ je difúzní čas, který souvisí s difúzním koeficientem D fluoroforu. Pomocí autokorelační funkce je možné znázornit nejen difúzní procesy, ale také stanovit množství dalších fyzikálních procesů. Příkladem může být proces antibunching¹, rotační difúze a intramolekulární reakce, resp. přechod ze singletového stavu do tripletového. Jednotlivé procesy se vyskytují v různých časových měřících, díky čemuž je lze rozlišit. Autokorelační funkce nám tak poskytuje důležité informace o sledovaném systému [65; 76].

¹ Antibunching je proces, který odráží skutečnost, že po emisi fotonu molekula potřebuje několik nanosekund k opětovné excitaci a následně emisi dalšího fotonu, což snižuje pravděpodobnost simultánní detekce dvou fotonů v krátkých časech [76].

2.6.3 Tripletní stav fluoroforu

Jak již bylo zmíněno, autokorelační funkce může znázornit stav, kdy molekula přejde z excitovaného singletového stavu do tripletového. K tomuto ději dochází v časovém rozmezí mikrosekund. Přechod je kvantově zakázán a fluorofor vyžaduje srovnatelně delší čas pro návrat do původního stavu. Po tuto dobu fluorofor nemůže emitovat žádné fluorescenční fotony a projeví se tmavými intervaly při procházení detekčním objemem. Dynamiku tripletního stavu je možné vyjádřit vztahem:

$$X_{\text{triplet}}(\tau) = 1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplet}}}}, \quad (6)$$

kde T je podíl částic nacházející se v tripletním stavu a τ_{triplet} je relaxační čas tripletu [75].

Matematický model Triplet Extended 3D znázorňuje rovnici proložení autokorelační křivky naměřených FCS dat z programu Symphotime 64:

$$G_{\text{AF}}(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{\text{triplet}}-1} T[j] \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{triplet}}[j]}\right) - 1 \right] \right] \sum_{i=0}^{n_{\text{D}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{D}}[i]} \right]^{\alpha[i]} \right] \left[1 + \frac{\left[\frac{t}{\tau_{\text{D}}[i]} \right]^{\alpha[i]}}{\kappa^2} \right]^{0,5}} + G_{\text{inf}}, \quad (7)$$

kde ρ je příspěvek difúzní částice, κ je excentricita detekčního objemu a G_{inf} je autokorelační křivka když $\tau \rightarrow \infty$. Model je prakticky využit v případech, kdy se fluoreskující látka nachází v podmínkách kde není úplně stabilní anebo difunduje trojrozměrným viskózním prostředím, které se typicky vyskytuje u gelů.

2.6.4 Kroskorelační funkce

Kroskorelace je klíčová analýza při vyhodnocení dat, která sleduje společné rysy dvou samostatně měřených signálů a poskytuje vyšší specifitu detekce. Nejčastější rušivé vlivy při měření FCS jsou šumy pocházející z SPAD detektorů. Prvním je *mrtvý čas*, který značí časový interval po detekci fotonu, po který není detektor schopen zaregistrovat další foton. Druhou neidealitu tvoří tzv. *afterpulsing* způsobený ionizací atomů plynů. Pravděpodobnost výskytu afterpulsingu závisí na mnoho parametrech jako jsou vady materiálu, teplota a operační podmínky detektoru. Nežádoucí vlivy je možné eliminovat použitím dvou detektorů nebo metody dvoubarevné fluorescenční korelační spektroskopie [75; 77].

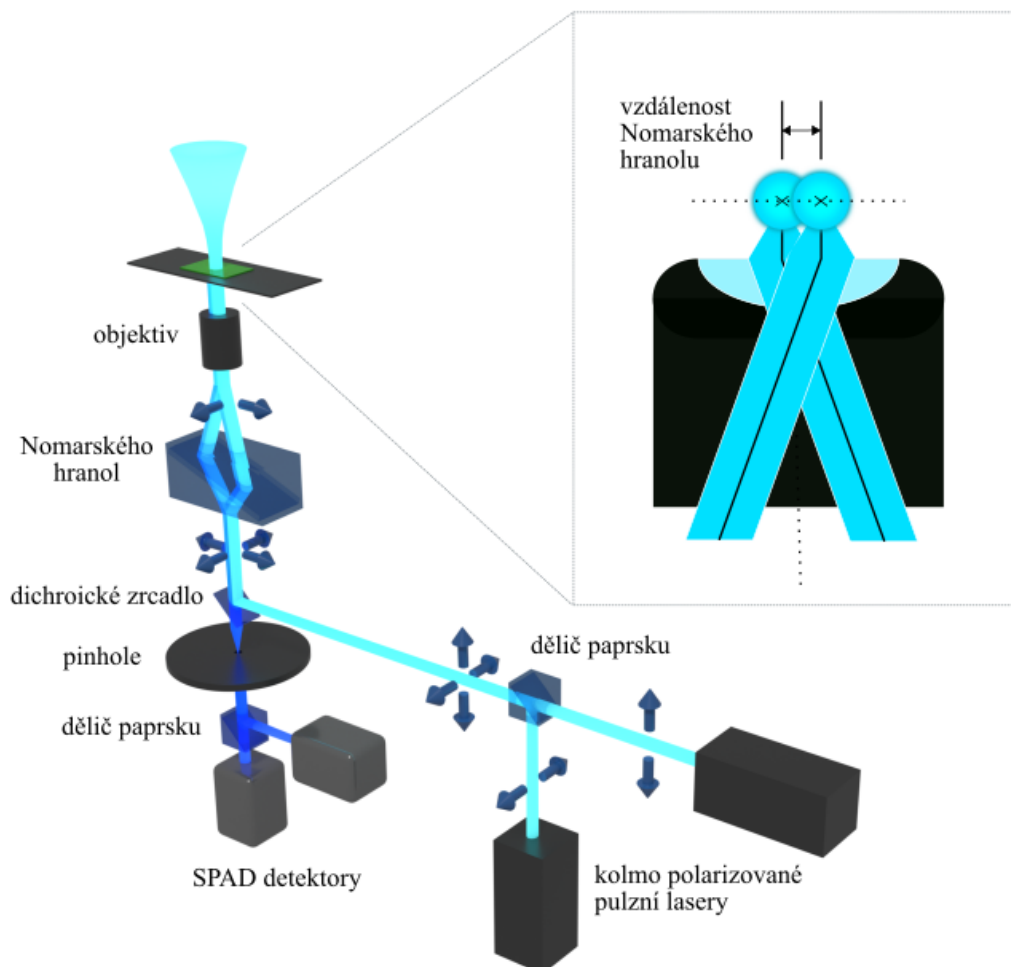
2.6.5 Nedostatky fluorescenční korelační spektroskopie

Naměřené výsledky metodou FCS závisí na nastavení přístroje a jsou ovlivněny řadou optických a fotofyzikálních faktorů. Jedním z nich je tloušťka podložního sklíčka udávající kvalitu optického zobrazení. Dalším je index lomu, kdy optický mikroskop používá vodní imerzní objektiv, avšak spousta biologických aplikací pracuje s pufrý nebo gely s odlišným indexem lomu. Na měření má také vliv optická saturace, neboť se zvyšující se excitační intenzitou se výrazně mění hodnota difúzního koeficientu. A na závěr hraje důležitou roli astigmatismus laserového paprsku. Všechny tyto faktory vyžadují mnohdy časově náročné kalibrace velikosti konfokálního objemu a označují vyhodnocení dat klasickou FCS jako nespolehlivé vyžadující určité modifikace [77; 78].

2.7 Dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie

S ohledem na zmíněné problémy zatěžující klasickou FCS vyvinuli v roce 2007 Dertinger a Enderlein novou modifikovanou verzi FCS, která překonává současná omezení konvenční metody. Dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie (dual-focus fluorescence correlation spectroscopy, 2f-FCS) je nezávislá technika vůči všem uvažovaným aberacím a poskytuje absolutní hodnoty difúzních koeficientů s vysokou přesností, bez nutnosti kalibrace. Díky tomu 2f-FCS představuje mnohem používanější a spolehlivější kvantitativní metodu [78; 79].

2.7.1 Přístrojové uspořádání



Obr. 12: Přístrojové uspořádání pro 2f-FCS měření

Přístrojové uspořádání je stejně jako u FCS založeno na využití fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Pro měření 2f-FCS se však používají dvě identické, lineárně polarizované a střídavě pulzující laserové diody, které jsou synchronizovány pomocí tzv. pulsed interleaved excitation mode, PIE. Oba laserové paprsky se stýkají v děliči paprsku za vzniku jednoho sekvenčního paprsku s ortogonální polarizací, který je odražen dichroickým zrcadlem a prochází Nomarského hranolem, též zvaným DIC hranolem, jehož název odkazuje na využití v diferenciální interferenční kontrastní mikroskopii. Nomarského hranol vychyluje paprsek do dvou různých směrů podle jejich korespondující polarizace a po zaostření světla do objektivu jsou generována dvě překrývající se excitační ohniska se vzájemným laterálním posunem.

Poté je emitovaná fluorescence ze vzorku snímána objektivem a odražena dichroickým zrcadlem, ve kterém je signál oddělen od excitačního záření. Paprsek je fokusován do pinhole o velikosti 150 μm a pomocí děliče paprsku rozdělen do dvou SPAD detektorů. Jednotka s časově rozlišeným čítáním fotonů (time-correlated single photon counting, TCSPC) zaznamenává detekované fotony s pikosekundovým rozlišením a díky tomu je možné přiřadit každý detekovaný foton k jeho excitačnímu zdroji, čímž mohou být pro jednotlivá ohniska vypočteny časově rozlišené korelační křivky [77; 78]. Znázornění přístrojového uspořádání ilustruje Obr. 12.

2.7.2 Princip 2f-FCS

Princip 2f-FCS vychází také z analýzy fluorescenční intenzity podobně jako u FCS. Jakmile je foton přiřazen ke svému detekčnímu objemu, lze vypočítat autokorelační funkci pro každé ohnisko zvlášť a poté vypočítat kroskorelační funkci mezi ohnisky navzájem. Důležité je znát vzdálenost mezi oběma ohnisky a stanovit obecný tvar každého detekčního objemu, který je kvantitativně definován tzv. molekulovou detekční funkcí (molecule detection function, MDF), jejíž dostatečnou aproximací je upravená Lorentz-Gaussova křivka ve tvaru:

$$U(\mathbf{r}) = \frac{\kappa(z)}{w^2(z)} \exp\left[-2 \frac{x^2 + y^2}{w^2(z)}\right], \quad (8)$$

kde $U(\mathbf{r})$ je MDF udávající pravděpodobnost detekce fluorescenčního fotonu z molekuly v dané pozici \mathbf{r} , $\kappa(z)$ a $w(z)$ jsou funkce optické osy z , které vyjadřují rovnice:

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda_{\text{ex}} z}{\pi w_0^2 n} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

$$\kappa(z) = 1 - \exp\left[-\frac{2h^2}{R^2(z)}\right] \quad (10)$$

$$R(z) = R_0 \left[1 + \left(\frac{\lambda_{\text{em}} z}{\pi R_0^2 n} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (11)$$

kde λ_{ex} je vlnová délka excitace, n je index lomu prostředí, h je poloměr pinhole dělený zvětšením objektivu, λ_{em} je vlnová délka emise a w_0 , R_0 jsou neznámé modelové parametry.

Na základě znalosti výpočtu MDF je kroskorelační funkce $G_{\text{KF}}(t, \vartheta)$ dána vztahem:

$$G_{\text{KF}}(t, \vartheta) = \varepsilon_1 \varepsilon_2 c \int d\mathbf{r}_1 \int d\mathbf{r}_2 U(\mathbf{r}_2) \frac{1}{(4\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1 - \hat{\mathbf{x}}\vartheta)^2}{4Dt}\right) U(\mathbf{r}_1), \quad (12)$$

kde ϑ je vzdálenost Nomarského hranolu neboli hodnota laterálního posunu mezi ohnisky, ε_1 a ε_2 jsou faktory spojené s excitační silou a detekční účinností každého objemu, c je koncentrace molekul a $\hat{\mathbf{x}}$ představuje jednotkový vektor podél osy x . Vzdálenost mezi detekčními ohnisky je stanovena vlastnostmi Nomarského hranolu a musí být určena její přesná hodnota. Poté je výpočet korelačních křivek a následné proložení vhodným modelem provedeno pomocí vysoce sofistikovaného algoritmu v rámci matematického softwaru Matlab, čímž se získá absolutní hodnota difúzního koeficientu.

2.7.3 Stanovení vzdálenosti Nomarského hranolu

Pro určení přesné hodnoty difúzního koeficientu je nezbytné precizně stanovit vzdálenost mezi oběma ohnisky. Tato vzdálenost je pro použitou excitační vlnovou délku dána vlastnostmi Nomarského hranolu a nezávisí na optických faktorech jako jsou tloušťka podložního sklíčka, index lomu a astigmatismus laserového paprsku. Nejpresnějším způsobem, jak stanovit vzdálenost mezi ohnisky je provedení srovnávacího měření difúze fluorescenčně značených kulovitých částic o rozměru 100 nm a zjištěný difúzní koeficient navzájem porovnat metodami 2f-FCS a dynamickým rozptylem světla (dynamic light scattering, DLS). Alternativní způsob představuje použití fluorescenční sondy se známým difúzním koeficientem. Poslední způsob, jak stanovit vzdálenost mezi ohnisky je technika zvaná z-sken, která je založena na správném umístění planárního vzorku a určení difúzního času v konfokálním objemu podél optické osy z [77; 78; 79].

2.8 Současný stav řešené problematiky

Dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie je poměrně nová metoda, která umožňuje stanovení absolutní hodnoty difúzního koeficientu v nanomolárních koncentracích a díky své vysoké přesnosti se používá například pro měření skládání proteinů, difúze molekul v membránách a pro studium koloidních systémů. V současné době postupně narůstají potenciální aplikace jejího využití.

V roce 2007 *Enderlein a spol.* představili novou techniku 2f-FCS, kterou matematicky popsali vhodným modelem proložení a po uskutečnění měření a následném vyhodnocení MDF získané výsledky porovnali s teoretickým popisem a zaznamenali jejich shodu. Určili také difúzní koeficient fluorescenční sondy Atto 655 ve vodném roztoku guanidin hydrochloridu a ve srovnání s metodou pulzní gradientové nukleární magnetické rezonance zjistili, že stanovené hodnoty difúzních koeficientů si navzájem odpovídají. Demonstrována měření také ukazují, že technika 2f-FCS je odolná vůči optickým a fotofyzikálním faktorům a je tak ideálním nástrojem pro studium systémů v nízkých koncentracích [79]. Na uvedené výhody metody navázali *Enderlein a Arbour* v pozdějším článku z roku 2010, kde použili novou techniku 2f-FCS pro měření rychlosti toku kapalin pomocí fluorescenční sondy Oregon Green 488 v nanomolární koncentraci a současně poukázali na přesnost stanovení hydrodynamických vlastností bez nutnosti kalibrace [78].

Müller a spol. se zabývali stanovením vzdálenosti Nomarského hranolu pomocí kombinace metod 2f-FCS a DLS. Ve své studii použili multifluorescenční sférické částice TetraSpeck 100 s průměrem 100 nm, u nichž v prvním kroku pomocí DLS zjistili hydrodynamický poloměr a následně provedli 2f-FCS měření. Dosažená přesnost měření byla stanovena na méně než $\pm 1,5$ nm pro vzdálenosti pohybující se kolem hodnoty 400 nm. Uvedená kombinace metod se tak stala nejpresnějším způsobem stanovení vzdálenosti Nomarského hranolu s nanometrovou přesností [80].

Müller a spol. v dalším článku popsali rozšiřující model proložení dat, který bere v úvahu velikost a vliv fluorescenčního značení koloidních a makromolekulárních částic. Pomocí metod 2f-FCS a DLS provedli měření uniformně značených částic různých velikostí a experimentálně stanovené výsledky byly shodné s teoretickým modelem [81].

Goossens a spol. poukázali na rozvíjející se možnosti využití 2f-FCS od přírodních věd k materiální chemii, v níž se měření častěji provádějí v nevodném médiu, které představují organická rozpouštědla. Nedostupné hodnoty difúzních koeficientů vybraných fluorescenčních sond rozpustných v organických rozpouštědlech se autorům staly podnětem pro studium difúzního pohybu několika komerčně dostupných fluorescenčních barviv. Zvolená barviva a organická rozpouštědla mají široké rozpětí ve viditelném spektru a indexech lomu, které jsou klíčovým parametrem, neboť silně ovlivňují velikost a tvar konfokálního objemu při FCS měření. Nalezené difúzní koeficienty tak mohou sloužit jako absolutní referenční hodnoty pro kalibraci experimentálního nastavení FCS [82].

Loman a spol. studovali proces rotační difúze makromolekul v roztoku. Uvedli, že ačkoliv je rotační difúze často zkoumána měřením fluorescenční anizotropie, tak pro měření globulárních proteinů jako jsou sérové albuminy, aldolázy a ovalbuminy, které mají rotační difúzní čas v řádech desítek až stovek nanosekund, se používají fluorescenční sondy s delší dobou života měřené prostřednictvím 2f-FCS [83].

Maffre a spol. pomocí 2f-FCS kvantitativně analyzovali adsorpci tří lidských proteinů krevního séra na fluorescenčně značených FePt nanočásticích o průměru přibližně 12 nm, obalených polymerem a nesoucích na povrchu negativně nabitě karboxylové skupiny. U všech tří proteinů bylo vlivem zvyšující se koncentrace proteinu pozorováno zvětšení hydrodynamického poloměru, což naznačuje tvorbu proteinových monovrstev obklopující částici. Tloušťka monovrstvy může být ve vztahu k určité orientaci proteinu založené na znalosti jeho molekulární struktury. Měřením vazebné afinity proteinů k nanočástici se rovnovážné disociační koeficienty lišily až téměř o čtyři řády. Tyto vazebné afinity se vztahují k přítomnosti pozitivně nabitých částí proteinů a v důsledku elektrostatického působení interagují s negativně nabitými karboxylovými skupinami nanočástic [84].

Weiß a spol. zkoumali jak teoreticky, tak experimentálně aplikaci 2f-FCS pro měření difúze lipidů uvnitř lipidových membrán v závislosti na složení lipidů, typu přítomných iontů a iontové síle použitého pufru. Správné umístění ohniska vzhledem k lipidové dvojvrstvě bylo dosaženo výběrem pozice s maximální hodnotou molekulárního jasu. S rostoucí vertikální vzdáleností mezi nejužším místem tvaru konfokálního objemu a dvojvrstvou došlo ke vzrůstu difúzního času fluorescenčních molekul a nepřesné umístění by se tak stalo zdrojem závažných chyb při měření. Nalezení správné pozice usnadnila technika z-sken. Závěrem bylo zjištěno, že monovalentní ionty neovlivňují difúzi lipidů, zatímco divalentní ionty Ca^{2+} způsobily zpomalení difúze lipidů v nabitých membránách zapříčiněnou zvyšující se viskozitou membrány [85].

Müller a spol. provedli srovnání tří různých metod pro měření teploty v mikrofluidních čípech s mikrometrovým prostorovým rozlišením, které hrají důležitou roli v biologických, biochemických a chemických technikách založených na tzv. lab on a chip zařízeních. Cílem práce bylo srovnání přesnosti metody 2f-FCS s teplotně závislým měřením dob života fluorescenčně značených monomerů Rhodaminu B ve vodném prostředí a difúzi mikrogelových částic poly-n-isopropylakrylamidu. Teplotně závislá měření vyžadovala přesnou kontrolu teploty vzorku během měření. Metoda 2f-FCS poskytla hodnoty difúzních koeficientů s vysokou přesností $\pm 2,4\%$ a na základě známé Stokes-Einsteinovy rovnice je možné provést přepočítání difúzního koeficientu na teplotu nebo viskozitu prostředí [86].

Müller a Richtering uvedli, že v mnoha studiích biologických a koloidních systémů je v rámci konfokální mikroskopie nutné provedení měření za vyšších teplot vzorku. K tomuto účelu vyvinuli teplotně citlivé zařízení, do jehož vnitřní části se inkorporují vzorky. Systém je složen z nerezové oceli a ve spodní části má umístěný Pt100 teplotní senzor poskytující signalizaci výpočetnímu softwaru. Současně autoři naprogramovali kontrolní mechanismus umožňující laditelné nastavení požadované teploty. Mechanické zařízení splňuje požadavky pro měření metodou 2f-FCS, v níž je kontrola teploty nutná pro přesné stanovení difúzního koeficientu [87].

Lehmann a spol. přišli s myšlenkou použití metody 2f-FCS pro studium hydrogelových soustav, které jsou tvořené polyakrylamidovým prostředím s včleněnými mikrogelovými částicemi. Pomocí fluorescenčně značeného dextranu byla prozkoumána interakce částic s prostředím. Ukázalo se, že hydrogel nehomogenně botná, když mikrogelové částice zanikají vlivem zahřátí. Tento proces indikuje tvorbu porézní struktury, a to je slibné zejména pro přípravu hydrogelových membrán s laditelnou permeabilitou, čehož se využívá v analytických separačních technikách [88].

Nedávno, *Korlann a spol.* prezentovali novou techniku nazvanou polarizační modulační dvouohnsková fluorescenční korelační spektroskopie (pmFCS). Tato technika je založená na modifikaci současně zavedené 2f-FCS pro měření absolutní hodnoty difúzního koeficientu fluorescenčních molekul v pikomolárních a nanomolárních koncentracích. Co se týče polarizace, instrumentálně 2f-FCS obsahuje dva lineárně pulzující polarizované paprsky, zatímco u pmFCS je polarizace excitačního paprsku modulována pomocí elektro-optického modulátoru. Optické nastavení pmFCS vyžaduje jednoduchou implementaci modulátoru, DIC hranolu, a navíc několik optických zrcadel. Analogicky je metoda odolná vůči optickým aberacím. S přihlédnutím k 2f-FCS nastavení je nová technika více kompatibilnější s konvenčním seřazením konfokálního mikroskopu [89].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Seznam použitých chemikálií s odpovídajícím názvem výrobce a údaji specifikace jako je registrační číslo (CAS) a číslo šarže (č. š.) uvádí následující Tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Seznam použitých chemikálií

| Chemikálie | Výrobce | Specifikace |
|------------------|--------------------------|--|
| Hyaluronan sodný | Contipro Biotech | M = 250–450 kDa, č. š.: 230215-E1 M = 1400–1600 kDa, č. š.: 181214-4-D1 |
| CTAB | Sigma-Aldrich | CAS: 57-09-0, č. š.: SLBJ9504V |
| Septonex | GNB chem | CAS: 10567-02-9, č. š.: 910SEP002 |
| Atto 488 | Sigma Aldrich | |
| Rhodamin 6G | Sigma Aldrich | CAS: 989-38-8, č. š.: MKBF7515V |
| Nilská červeň | Sigma Aldrich | CAS: 7385-67-3, č. š.: BCBK2559V |
| Aceton | Sigma Aldrich | CAS: 67-64-1, č. š.: 1308200810 |
| Chlorid sodný | Lach-Ner | CAS: 7647-14-5, č. š.: 1903200314 |
| Voda | Miliphore, Purelab: ELGA | |

3.2 Příprava zásobních roztoků a hydrogelů

3.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl

Modelový fyziologický roztok NaCl o koncentraci 0,15 M byl připraven rozpuštěním přesné navážky v deionizované vodě. Roztok byl nadále uchovávan při laboratorní teplotě.

3.2.2 Příprava zásobního roztoku tenzidu

Pro oba kationaktivní tenzidy (CTAB, Septonex) byl použit stejný postup přípravy zásobních roztoků. Přesná navážka tenzidu byla smíchána s potřebným množstvím deionizované vody a 0,15 M NaCl. Poté byl roztok uložen na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin. Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 200 mM. Roztoky byly dále uchovávány při laboratorní teplotě.

3.2.3 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Molekulová hmotnost hyaluronanu byla zvolena 250–450 kDa a 1400–1600 kDa, jejichž přesné molekulové hmotnosti byly 340 kDa a 1540 kDa. Přesná navážka hyaluronanu byla doplněna zásobním fyziologickým roztokem na požadovaný objem. Roztok byl uložen na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin. Pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu byly připraveny zásobní roztoky o výsledné koncentraci 2 % hm. Pro další použití byly roztoky skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

3.2.4 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Zásobní roztoky vybraných fluorescenčních sond Atto 488, Rhodamin 6G a nilská červeň byly připraveny rozpuštěním navážky v odpovídajícím rozpouštědle. Atto 488 a Rhodamin 6G byly připraveny rozpuštěním v deionizované vodě. Nilská červeň byla připravena rozpuštěním v acetonu. Následně byly roztoky skladovány v lednici při teplotě 4 °C. Před každým měřením byl ze zásobních roztoků pipetován určitý objem, který byl naředěn na požadovanou koncentraci a přizpůsoben na laboratorní teplotu.

3.2.5 Příprava fázově separovaných hydrogelů

Příprava fázově separovaných hydrogelů probíhala ve skleněných vialkách, do nichž bylo napipetováno potřebné množství fluorescenční sondy, aby výsledná koncentrace vzorku byla nanomolární. Rozpouštědlo bylo odpařeno a na odparek sondy bylo naváženo přesné množství předem připraveného zásobního roztoku tenzidu v 0,15 M NaCl a roztok byl ponechán po dobu 24 hodin na magnetické míchačce. Následně bylo do roztoku přidáno přesné množství předem připraveného zásobního roztoku hyaluronanu v 0,15 M NaCl, roztok byl třepán a ponechán 24 hodin v klidu při laboratorní teplotě k oddělení gelové fáze. Zásobní roztoky hyaluronanu a tenzidu byly smíchány v poměru 1:1. Standardně připravovaný výsledný objem vzniklého roztoku činil 6 ml. Vizuálně bylo množství vytvořeného gelu na dně vialky odhadnuto na 0,25 ml.

3.3 Použité přístroje a programy

Seznam použitých přístrojů a programů s odpovídajícími údaji specifikace uvádí následující Tabulka č. 2 a Tabulka č. 3.

Tabulka č. 2: Seznam použitých přístrojů

| Přístroj | Specifikace |
|---------------------------------------|--|
| Časově rozlišený konfokální mikroskop | Microtime 200 PicoQuant s vodním imerzním objektivem Olympus, UPLSAPO 60XW |
| Spektrograf | Andor Technology |
| Magnetická míchačka | Heidolph MR Hei-Standard |
| Třepačka | MS2 Minishaker |
| Analytické váhy | Denver Instrument |

Tabulka č. 3: Seznam použitých programů

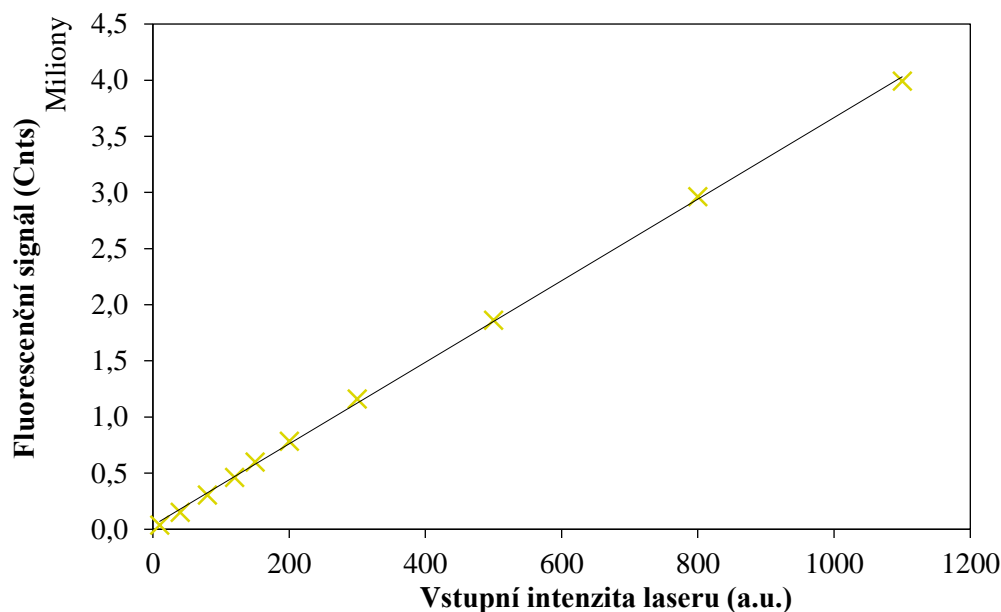
| Program | Specifikace |
|---------------|-------------------------|
| Symphotime 64 | Symphotime 64 2.2.4327 |
| Matlab | Matlab R2009b |
| Excel | Microsoft Excel 2016 |
| Word | Microsoft Word 2016 |
| Chemsketch | ACD/Chemsketch Freeware |
| Inkscape | Inkscape 0.92 |
| Blender | Blender 2.78 |

3.4 Nastavení přístroje a měření

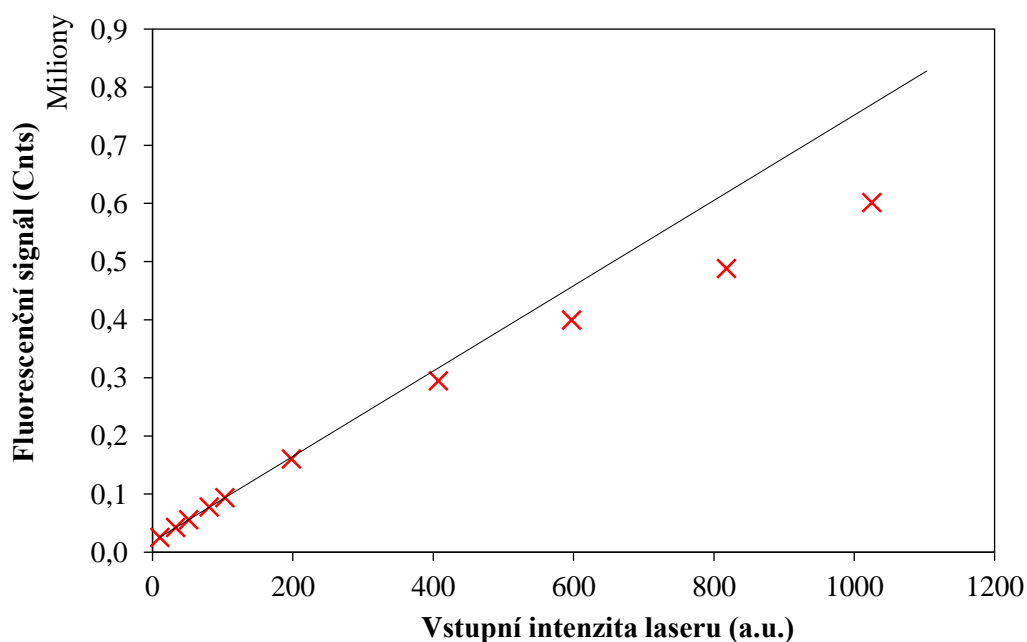
Časově rozlišený konfokální mikroskop Microtime 200 sestává z invertovaného mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačních zdrojů a vícekanálové detekční jednotky. Využívá superapochromatický objektiv UPLSAPO 60XW s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2. Skenování vzorku je umožněno díky skeneru s piezoelektrickým posuvem (Physik Instrumente). Excitační zdroje představují pulzní laserové diody s pikosekundovým rozlišením. Detekční systém obsahuje čtyři nezávislé detekční kanály. Dále je přístroj vybaven externím spektrografem s CCD kamerou Newton (Andor). Microtime 200 vyniká svou unikátní jednomolekulovou detekční citlivostí a díky tomu umožňuje měření FCS, 2f-FCS a další.

3.4.1 Optická saturace

Na základě dosažených znalostí z teoretické části jsou získané výsledky měření FCS závislé na optické excitační síle vlivem optické saturace. Samotný tvar a velikost detekčního objemu závisí na použité excitační síle a ta v něm často dosahuje hodnot, při nichž dochází ke zvětšení detekční oblasti a tím k delším difúzním časům a nepřesné hodnotě difúzního koeficientu. Pomocí TCSPC tak bylo před začátkem měření nutné zjistit závislost fluorescenčního signálu na vstupní intenzitě laseru zaznamenáním celkového počtu fotonů. Jednotlivá měření byla prováděna v lineární oblasti vstupní intenzity laseru s hodnotou 120 a.u.



Obr. 13: Optická saturace laseru 510 nm pro filtr 550/49 se sondou Atto 488 o koncentraci 10^{-9} M ve vodě bez výrazného vychýlení z lineární oblasti



Obr. 14: Optická saturace laseru 510 nm pro filtr 690/70 se sondou nilská červeň o koncentraci 10^{-9} M v CTAB

3.4.2 Měření FCS

Měření FCS byla provedena na epifluorescenčním mikroskopu Microtime 200. Zdrojem excitace byl horizontálně polarizovaný laser 510 nm s frekvencí 40 MHz. Podle naměřené optické saturace byla nastavena optimální intenzita laseru na 120 a.u. nacházející se v nižších hodnotách celkového možného nastavení intenzity laseru, kde nedochází k výrazným odchylkám od přímky lineární regrese. Velikost pinhole byla 50 μm . Vlivem proměnlivé velikosti a tvaru detekčního objemu zaostřeným laserovým paprskem bylo nutné před každým měřením provést kalibraci konfokálního objemu.

3.4.2.1 Kalibrace konfokálního objemu

Kalibrace konfokálního objemu byla stanovena změřením referenční fluorescenční sondy ve vodném roztoku o nanomolární koncentraci a známém difúzním koeficientu při dané teplotě. Difúzní koeficienty jsou závislé na teplotě podle Stokes-Einsteinova vztahu:

$$D(T) = \frac{kT}{6\pi\eta(T)r}, \quad (13)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je teplota, $\eta(T)$ je viskozita vody při dané teplotě a r je hydrodynamický poloměr. Standardně tabelované hodnoty difúzních koeficientů platí pro 25 °C, v případě jiných experimentálních podmínek je nutné hodnotu přepočítat podle rovnice:

$$D(T) = D(25^\circ\text{C}) \cdot \frac{T}{298,15\text{K}} \cdot \frac{8,9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}}{\eta(T)}. \quad (14)$$

Přepočítaná hodnota difúzního koeficientu byla po naměření autokorelační křivky dosazena do teoretického modelu a naměřená data byla proložena v módu vyhodnocení FCS Calibration. Získané parametry efektivního objemu V_{ef} a excentricity κ udávají hledanou velikost a tvar konfokálního objemu. Tyto hodnoty byly nadále dosazovány do modelu při vyhodnocování. Pro kalibrační měření byla použita sonda Atto 488 a Rhodamin 6G, jejichž maximální vlnovou délku emise (λ_{em}) a tabelovanou hodnotu difúzního koeficientu znázorňuje Tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Seznam použitých fluorescenčních sond pro kalibrační měření

| Fluorofor | λ_{em} maximum (nm) | Difúzní koeficient (ve vodě, při 25 °C, v $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) |
|-------------|------------------------------------|--|
| Atto 488 | 523 | 400,0 \pm 0,1 |
| Rhodamin 6G | 550 | 414,0 \pm 0,1 |

3.4.3 Měření 2f-FCS

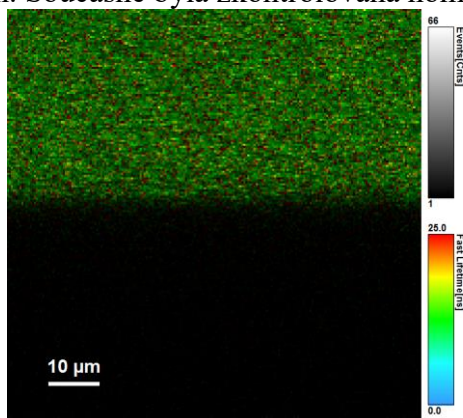
Měření 2f-FCS byla rovněž provedena na mikroskopu Microtime 200. Horizontálně a vertikálně polarizovaný laser byly použity jako zdroje excitace s vlnovou délkou 510 nm a se střídavými pulzy každých 25 ns. Optimalizace excitační intenzity laseru byla provedena snížením, popřípadě zvýšením excitační síly podle změn signálu pozorovaných na detektoru. V programu Symphotime 64 byl v testovém režimu zvolen excitační režim PIE synchronizující pulzní lasery. Před objektiv byl vložen do mikroskopu Nomarského hranol. Velikost pinhole byla vyměněna za 150 μm . Na počátku byla změřena volná difúze sondy ve vodném roztoku o nanomolární koncentraci se specifikovanou hodnotou difúzního koeficientu. Vyhodnocením naměřených dat v programu Matlab byla stanovena vzdálenost Nomarského hranolu, jejíž postup bude podrobněji popsán v kapitole 3.5.2.

3.4.4 Měření hydrogelů

Měření hydrogelů bylo uskutečněno s využitím obou výše popsaných fluorescenčních technik. Následující nastavení optických prvků a postup nanášení a měření hydrogelů je společný v rámci obou metod.

Dichroické zrcadlo 514/640 bylo použito pro odraz excitační vlnové délky a propuštění emisní vlnové délky. Pro fluorescenční sondu Atto 488 a Rhodamin 6G byl použit filtr 550/49 a pro nílskou červeň 690/70. Na objektivu byla nastavena hodnota korekčního kroužku na 0,17 k získání optimálního molekulárního jasů. Dva detektory typu SPAD 3 a SPAD 4 byly použity k simultánnímu snímání fluorescenčního signálu.

Modelové hydrogelové systémy byly připraveny interakcí hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy. Fluorescenční sondy Atto 488 a nílská červeň byly analyzovány v prostředí hydrogelů vzniklých fázovou separací kationaktivních tenzidů CTAB a Septonexu a dvou molekulových hmotností hyaluronanu 250–450 kDa a 1400–1600 kDa. Jednotlivé kombinace přípravy hydrogelů byly třikrát namíchány. Poté byly hydrogely vyjmuty ze dna vialky pomocí nerezové špachtle a byly opatrně vloženy do odstříhnutého víčka eppendorfovy zkumavky, kde byly rovnoměrně rozprostřeny tak, aby vyplnily její celý obsah s pečlivostí věnovanou zamezení vzniku bublin. Takto připravený gel byl vložen na sklíčko mikroskopu. V programu Symphotime 64 byla v měřicím režimu zvolena záložka Imaging. Pomocí CCD kamery bylo nalezeno rozhraní podložního sklíčka a měřeného gelu a po nastavení příslušných parametrů, jako je velikost obrázku, směr skenování a čas po který je skener zdržován na jednom pixelu, tzv. *dwell time* , byl pořízen snímek v rovině *x-z*. Kurzorem myši byla odečtena souřadnice *z* a hodnota aktuální pozice byla upravena tak, abychom se dostali do polohy 5 μm nad sklíčko a poté byl proveden *x-y* sken. Současně byla zkontrolována homogenita vzorku.



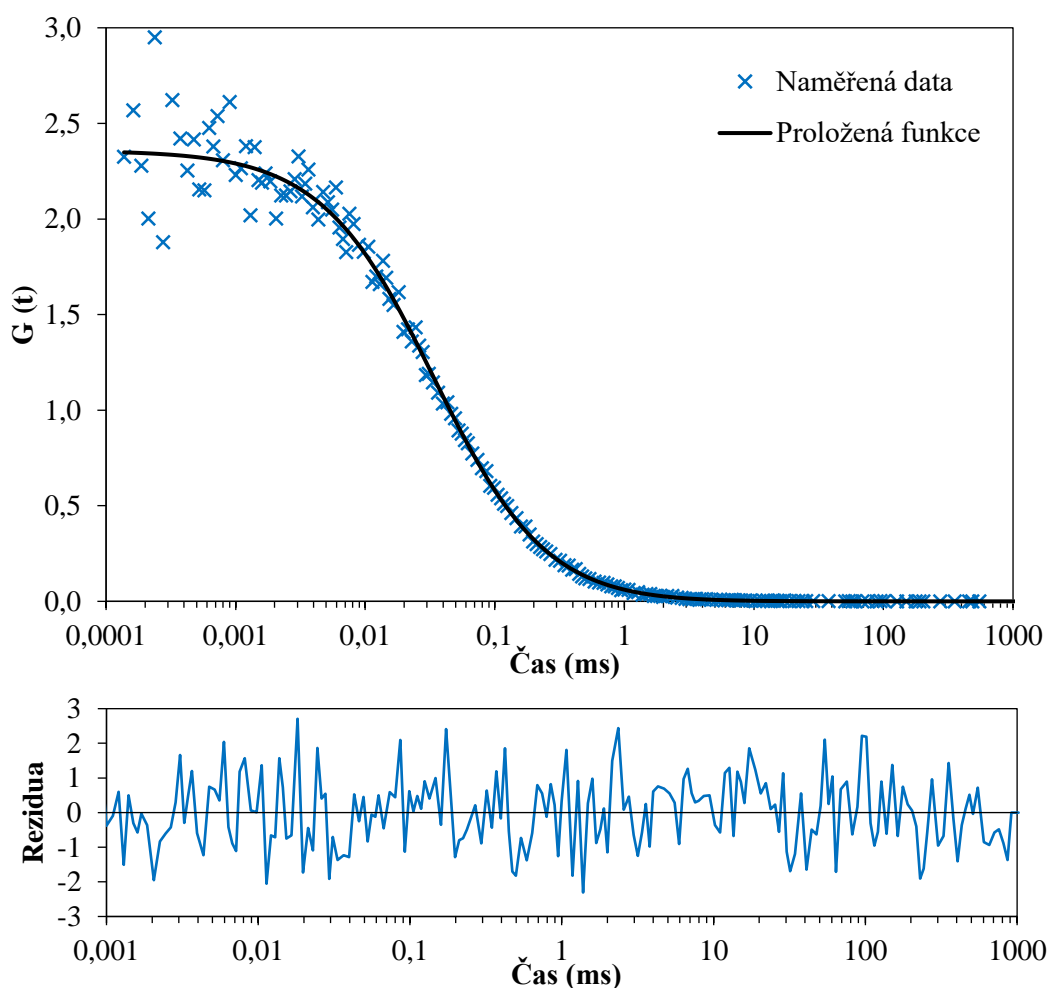
Obr. 15: Nalezené rozhraní sklíčka a hydrogelu s fluorescenční sondou Atto 488

Následně byly v záložce automatického měření zvoleny dvě polohy bodů na obrázku, s ohledem na vyhnutí se eventuálním nehomogenním oblastem, v nichž probíhalo měření a které byly nastavovány pomocí softwarového ovladače. Pro každý vzorek gelu byla data sbírána po dobu 8 minut. Měřená data byla vizuálně kontrolována v měřicím okně, které díky výpočetnímu algoritmu okamžitě vykresluje autokorelační, případně kroskorelační křivku. Veškeré údaje z měření byly zaznamenány do předem připravené šablony v programu Microsoft Excel. Naměřená data jsou pak uložena ve formátu „ttr“ (time-tagged time-resolved), který obsahuje informace o typu souboru a zároveň umožňuje využít data v rámci více typů analýz. Po uskutečnění vybrané analýzy byly získané parametry zprůměrovány.

3.5 Vyhodnocení naměřených dat

3.5.1 Vyhodnocení FCS

Program Symphotime 64 uživateli nabízí více možných způsobů vyhodnocení. Díky použití dvou detektorů byla zvolena FCS analýza, která umožňuje kroskorelaci signálů z obou detektorů, čímž dochází k automatickému potlačení afterpulsingu a zároveň odstraňuje jejich šum pomocí nabídky FLCS Background Correction, povolení této funkce za těchto podmínek není nezbytné, nýbrž zcela doporučeno.

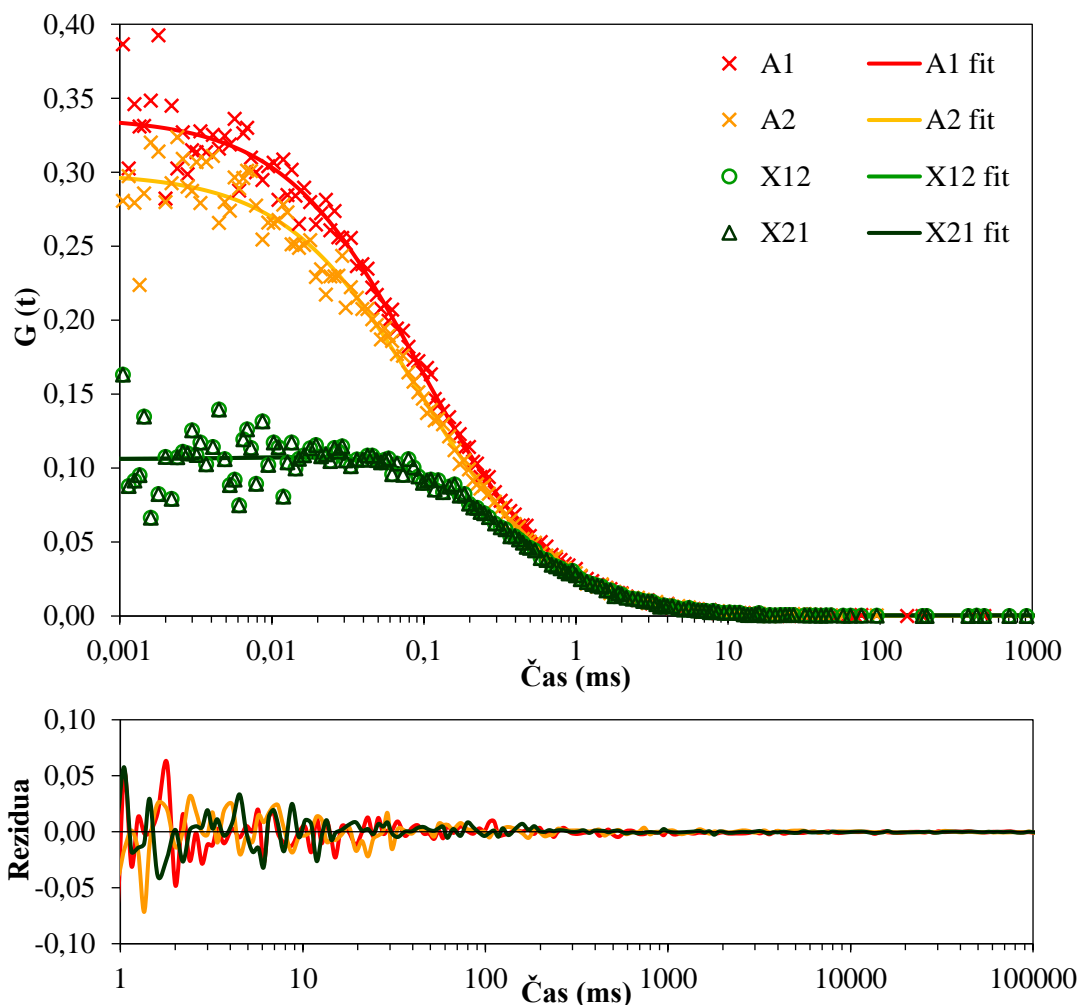


Obr. 16: Analýza FCS naměřených dat s vhodnou proloženou funkcí a reziduální analýzou sondy Atto 488 ve vodě o koncentraci 10^{-9} M

Výpočtem dochází ke grafickému vykreslení difúzní křivky a poté přecházíme k samotné FCS analýze znázorňující Obr. 16. Proložením křivky matematickým modelem získáme číselné parametry a s ohledem k reziduální analýze posuzujeme reálnost a vhodnost zvoleného modelu na základě fyzikální podstaty pozorovaného jevu. Z důvodu komplikovanosti zkoumaných hydrogelových systémů odpovídala naměřená data nejlépe složitějšímu modelu Triplet Extended 3D, který bere v úvahu i vliv existence tripletního stavu. Teoreticky je model popsán v kapitole 2.6.3. Parametrem zájmu byla především hodnota difúzního koeficientu s jeho zastoupením, tripletní čas fluoroforu a jejich odpovídající odchylky.

3.5.2 Vyhodnocení 2f-FCS

Pro vyhodnocení 2f-FCS posloužil software Symphotime 64 a Matlab 2009b. V programu Symphotime byla po nastavení stejných hodnot v tzv. *Set Time Gate* a eliminaci afterpulsingu vypočtena autokorelační funkce pro každé ohnisko zvlášť a poté kroskorelační funkce mezi ohnisky a detektory navzájem. Po výpočtu jednotlivých difúzních křivek byla data exportována do souboru s příponou „.dat“. Spuštěním programu Matlab byl nastaven aktuální adresář na složku obsahující upravená data.



Obr. 17: Analýza 2f-FCS naměřených dat s vhodnou proloženou funkcí (tzv. fit) a reziduální analýzou sondy Atto 488 ve vodě o koncentraci 10^{-9} M. Označení A1 a A2 odkazují na autokorelační křivku prvního a druhého ohniska, podobně X12 a X21 značí kroskorelaci mezi ohnisky a detektory.

Jak bylo zmíněné v sekci 2.7.2 je nutné přesně stanovit vzdálenost mezi ohnisky a tvar každého detekčního objemu. Poté, co jsou zadány známé vstupní parametry jako vlnová délka excitace, střední vlnová délka emisního filtru, index lomu prostředí, velikost pinhole a zvětšení objektivu je na základě přepočítání hodnoty difúzního koeficientu sondy určena vzdálenost laterálního posunu mezi ohnisky. Prostřednictvím této vzdálenosti je možné získat hodnoty difúzních koeficientů, tripletních časů a parametry w_0 a R_0 udávající tvar detekčního objemu. Posléze byla do Matlabu zadána uživatelská funkce příkazem „err“, která značí chybu proložení dat. Veškeré získané parametry byly zaznamenány do pracovního sešitu v programu Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá studiem difúze organických molekul v hydrogelovém prostředí pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a její upravené verze dvouhnikové fluorescenční korelační spektroskopie (2f-FCS). Navrženými modelovými fluorescenčními sondami pro studium jednotlivých prostředí v hydrogelovém systému na bázi polymer-tenzid se staly Atto 488 a nilská červeň. Hydrofilní sonda Atto 488 byla vybrána z důvodu výjimečné fotostability a vysokého kvantového výtěžku. Hydrofobní sonda nilská červeň byla zvolena z důvodu silné fluorescence z lipofilního prostředí.

Předložená diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci s názvem *Použití difúzních technik ve studiu hydrogelů* zabývající se podrobnou charakterizací koloidních systémů a hydrogelů. Stanovením difúzních parametrů, jako jsou doby života a difúzní koeficienty, byla v předešlé závěrečné práci individuálně analyzována veškerá prostředí vyskytující se v komplexním hydrogelovém systému [90]. Návaznost se zde vyskytuje v podobě pokračování ve studiu koloidních soustav se zaměřením pouze na hydrogely vzniklé interakcí hyaluronan-tenzid. Chování fluorescenčních sond bylo analyzováno v prostředí 2% hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech 250–450 kDa a 1400–1600 kDa s opačně nabitými tenzidy CTAB a Septonexu o koncentraci 200 mM za tvorby fázově separovaných gelů. Základem pro interpretaci chování těchto systémů je předchozí vyhodnocení gelů, s nímž porovnáváme současné výsledky a z tohoto důvodu bude na tuto práci v průběhu diskuze často odkazováno.

Hlavním cílem bylo charakterizovat jednotlivé interakce mezi molekulami fluorescenční sondy difundujících v hydrogelech pomocí zmíněných fluorescenčních technik. Naměřená data byla interpretována podle zvolené analýzy a poté bylo popsáno prostředí, kde se pravděpodobně sonda navázala. Pro účely interpretace je tato práce uspořádána do navazujících kapitol pojednávajících o získaných výsledcích z hlediska difúze jednotlivých solutů. Předmětem zájmu je vzájemná reakce sondy nilská červeň s dosud neprozkoumaným tenzidem Septonex. Proto je na počátku práce studována interakce fluorescenčních sond s tenzidy ve vodném prostředí. Následně bylo stanoveno difúzní chování sondy Atto 488 a nilské červeně v hydrogelech pomocí metod FCS a 2f-FCS, které jsou na základě obdržených výsledků vzájemně porovnány. Na závěr byla zjištěna spektra nilské červeně ve vybraných prostředích.

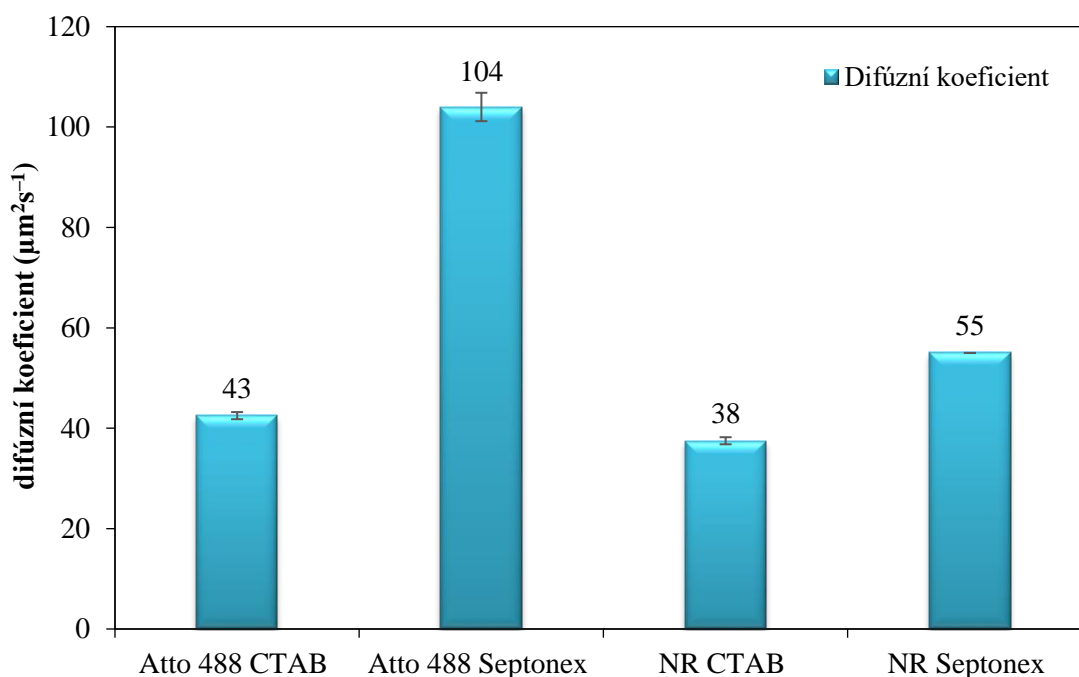
Uvedená akademická práce navazuje na poznatky publikované v odborné literatuře a předchozí výsledky výzkumu v oblasti koloidních systémů, přičemž umožňuje lépe porozumět hydrogelovým soustavám a celkově tak přispívá do širokého kontextu výzkumu v rámci Centra materiálového výzkumu na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

4.1 Interakce fluorescenčních sond s tenzidy ve vodném prostředí

Před samotným měřením hydrogelových soustav bylo nutné získat informace o tom, jak molekuly fluorescenčních sond interagují s tenzidy ve vodném prostředí pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Na základě práce [90] vyplynulo, že pro měření touto metodou je ideální koncentrace sondy nanomolární, při níž se v konfokálním objemu pohybují řádově jednotky molekul a z literatury je potvrzené, že je to optimální koncentrace, která po analýze poskytuje spolehlivé výsledky. Proto byly roztoky naředěny na koncentraci 10^{-9} M a dvakrát změřeny po dobu 5 minut. Vyhodnocení bylo provedeno v rámci nejjednoduššího modelu, který pro sondu Atto 488 odpovídal difúzi s tripletem a pro nilskou červeň (NR) prosté difúzi. Zprůměrované hodnoty difúzního koeficientu, jeho zastoupení a tripletního času jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka č. 5: Tabulka s difúzními parametry sondy Atto 488 a nilské červeně v micelárních systémech

| Vzorek | D ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | ρ | τ_{triplet} (μs) |
|-------------------|------------------------------------|-----------------|---|
| Atto 488 CTAB | $42,50 \pm 0,23$ | $2,20 \pm 0,06$ | $2,95 \pm 0,34$ |
| Atto 488 Septonex | $104,00 \pm 0,90$ | $1,71 \pm 0,05$ | $3,10 \pm 0,44$ |
| NR CTAB | $37,50 \pm 0,54$ | $2,71 \pm 0,02$ | – |
| NR Septonex | $55,00 \pm 0,96$ | $3,07 \pm 0,04$ | – |



Obr. 18: Difúzní koeficienty sondy Atto 488 a nilské červeně v micelárních systémech tvořené tenzidy CTAB a Septonex s chybovou úsečkou a zaokrouhlenou hodnotou difúzního koeficientu

Míra interakce fluorescenční sondy s kationaktivním tenzidem je posuzována na základě získaných difúzních parametrů. Zaokrouhlené hodnoty difúzních koeficientů s odpovídající chybovou úsečkou jsou vyneseny v sloupcovém grafu znázorňující Obr. 18.

Z uvedeného grafu je patrné, že u prvního systému Atto 488 CTAB došlo k výraznému snížení difúzního koeficientu ve srovnání s tabelovanou hodnotou při volné difúzi sondy ve vodě, jejíž hodnotu uvádí Tabulka č. 4. Nízká hodnota difúzního koeficientu odkazuje na jisté zpomalení pohybu sondy v micelárním systému. Jediným možným vysvětlením je vznik fyzikální interakce mezi sondou a tenzidem, při níž vlivem hydrofilní struktury sondy dochází k vzájemné interakci s kladnou strukturou tenzidu orientovanou do polárního prostředí za tvorby micel a tím dochází ke zpomalení sondy v roztoku.

Zajímavé se jeví více než dvojnásobné zvýšení difúzního koeficientu u vzorku Atto 488 Septonex oproti předešlému vzorku. V tomto případě má difúzní koeficient hodnotu $104,00 \pm 0,90 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, což je vzhledem k předpokladu podobného chování s předchozím systémem poněkud překvapivá hodnota. Na základě Stokes-Einsteinovy rovnice bylo zjištěno, že po dosažení difúzního koeficientu systém vykazuje buď dvakrát vyšší teplotu nebo dvakrát nižší viskozitu, což je vysoce nepravděpodobné a v rovnici, s pominutím neměnných konstant, by to znamenalo, že je dvakrát nižší rozměr. Z literatury bylo zjištěno, že střední průměr micely CTAB je zhruba 4 nm. Po výpočtu by průměr micely Septonexu činil zhruba 2 nm a je méně pravděpodobné, aby molekula byla dvakrát menší než molekula CTAB vzhledem k celkové struktuře a vyššímu počtu uhlíků. Byť je Septonex kationaktivní tenzid, díky rozsáhlosti hydrofilní hlavy by teoreticky její součástí měla být, kromě trimethylamoniové skupiny, také ethylesterová skupina. Nicméně agregační čísla v literatuře nebyla dohledatelná a dosud není prozkoumáno, jak přesně tvoří micely. Tato vysoká hodnota difúzního koeficientu pravděpodobně odkazuje na velmi slabou interakci sondy Atto 488 se Septonexem. Pro oba zmíněné systémy bylo potvrzení vzniku interakce projevováno současně přechodem do tripletního stavu, jehož očekávaná hodnota se pohybovala kolem 3 μs se vzájemně podobnou odchylkou.

Nilská červeň ve vodném prostředí vykazuje nízkou intenzitu fluorescence, zatímco v hydrofobním prostředí její fluorescence roste. V micelárním systému tak předpokládáme, že se inkorporuje do jádra micely s cílem vyhnout se polárnímu prostředí. Vzorek NR CTAB však vykazuje podobnou a jen o něco menší hodnotu difúzního koeficientu ve srovnání se vzorkem Atto 488 CTAB a z toho důvodu také odkazuje na vzniklou interakci mezi sondou a tenzidem. Ve srovnání s volnou difúzí sondy ve vodném prostředí by hodnota difúzního koeficientu byla značně vyšší, ale z důvodu nízkého kvantového výtěžku bychom ji nepostřehli a nižší difúzní koeficient sondy tak naznačuje interakci nilské červeně s CTAB.

Situace je podobná u vzorku NR Septonex, kdy je však hodnota difúzního koeficientu o něco vyšší než u vzorku nilské červeně v CTAB. V porovnání s neočekávaným výsledkem vzorku Atto 488 Septonex, je jeho hodnota o polovinu nižší, než tomu bylo za přítomnosti hydrofilní sondy, což odkazuje na poněkud silnější interakci sondy difundující prostředím s tenzidem.

Z předchozí tabulky je patrné, že difúzní koeficienty disponují nejmenší chybou u vzorků s CTAB, a naopak největší chybou u vzorků se Septonexem. Zastoupení difúzního koeficientu v rámci zaokrouhlení nabývá hodnotu 2 pro sondu Atto 488 a hodnotu 3 pro nilskou červeň, přičemž větší chyba se vyskytuje u první sondy než u druhé. Současně byla zohledněna směrodatná odchylka jako chybová úsečka v předchozím grafu, z něhož lze postřehnout, že vzorek Atto 488 Septonex je zatížen nejvyšší směrodatnou odchylkou, vzorky s CTAB mají relativně podobné chybové úsečky a poslední vzorek vykazuje nulovou chybovou úsečku.

4.2 Studium hydrogelů fluorescenční sondou Atto 488

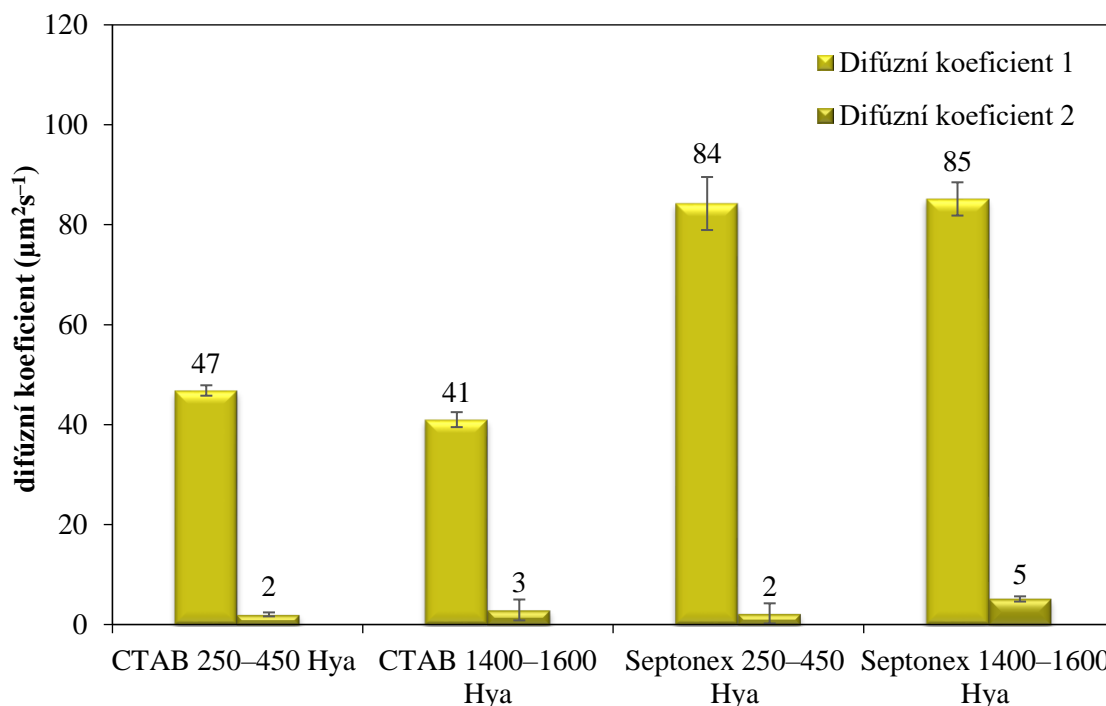
Na základě prvotního měření jednotlivých fluorescenčních sond v micelárním systému byly následně měřeny hydrogelové soustavy vzniklé fázovou separací hyaluronanu (Hya) a tenzidu. Závěrečná kvalifikační práce [90] potvrdila, že měření hydrogelů metodou FCS je realizovatelné, a z tohoto důvodu přistupujeme k pokročilé technice 2f-FCS. Prvně byly stanoveny difúzní vlastnosti metodou FCS a byly porovnány výsledky pro sondu Atto 488 jednotlivě s CTAB a Septonex s ohledem na dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu a poté mezi tenzidy navzájem. Podobně byly stanoveny difúzní vlastnosti metodou 2f-FCS. Závěrem byly obě použité metody navzájem porovnány. Shodný postup interpretace následuje kapitola 4.3 s názvem Studium hydrogelů fluorescenční sondou nilská červeň.

4.2.1 Stanovení difúzních vlastností metodou FCS

Stanovení difúzních vlastností bylo nejdříve provedeno metodou FCS a získané difúzní parametry jako jsou difúzní koeficienty, jejich zastoupení a tripletní čas jsou znázorněny v následující tabulce.

Tabulka č. 6: Tabulka s difúzními parametry sondy Atto 488 v hydrogelech měřené FCS s označením A – CTAB 250–450 Hya, B – CTAB 1400–1600 Hya, C – Septonex 250–450 Hya a D – Septonex 1400–1600 Hya

| Vzorek | D 1 ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | D 2 ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | ρ 1 | ρ 2 | τ_{triplet} (μs) |
|--------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|---|
| A | 46,83 \pm 1,12 | 2,03 \pm 0,72 | 0,91 \pm 0,02 | 0,03 \pm 0,01 | 3,52 \pm 0,46 |
| B | 41,00 \pm 0,68 | 2,92 \pm 0,68 | 0,84 \pm 0,02 | 0,03 \pm 0,01 | 3,28 \pm 0,34 |
| C | 84,25 \pm 2,65 | 2,22 \pm 0,66 | 1,14 \pm 0,02 | 0,04 \pm 0,01 | 5,58 \pm 0,92 |
| D | 85,17 \pm 3,18 | 5,12 \pm 1,13 | 1,13 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,01 | 4,12 \pm 1,64 |



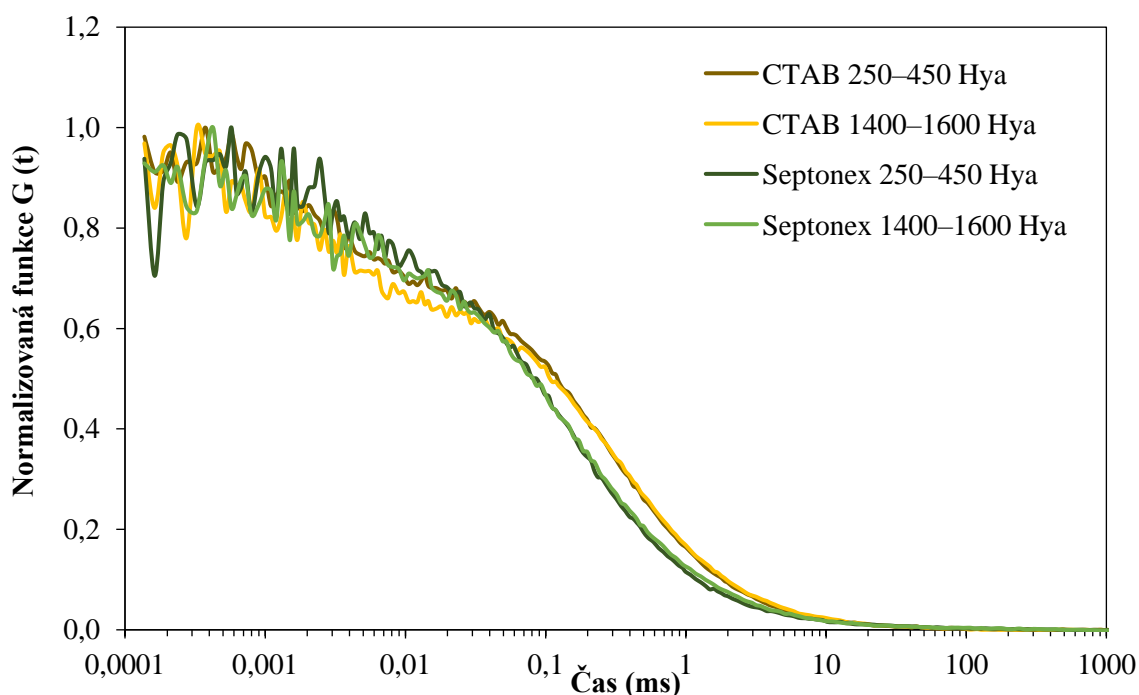
Obr. 19: Difúzní koeficienty sondy Atto 488 měřené FCS v hydrogelech tvořených tenzidy CTAB a Septonex o dvou molekulových hmotnostech hyaluronanu

Difúzní chování fluorescenční sondy Atto 488 vykazuje u hydrogelového vzorku CTAB 250–450 Hya dva difúzní koeficienty se značně odlišnou číselnou hodnotou, přičemž první hodnota difúzního koeficientu má majoritní zastoupení. Podobně je tomu u vzorku CTAB 1400–1600 Hya, který také vykazuje dva difúzní koeficienty. Ve srovnání s prvním systémem zde došlo k mírnému poklesu převažující hodnoty difúzního koeficientu, což by mohlo být přisuzováno zvýšené viskozitě prostředí vlivem vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu, neboť ačkoliv měřené gely byly pevné na dotek, měly řidší konzistenci za použití nízkomolekulárního hyaluronanu. Porovnáním se závěrečnou prací [90] byly gelové vzorky také úspěšně vyhodnoceny na triplet a dva difúzní koeficienty, které však nabývaly vyšší hodnoty, ale zde je nutné vzít v úvahu, že tato práce pracovala s odlišnou molekulovou hmotností hyaluronanu.

Na rozdíl od předchozích systémů byl u vzorku Septonex 250–450 Hya pozorován rapidní nárůst převažujícího difúzního koeficientu. Současně se během měření objevily anomální výsledky, jejichž hodnota difúzního koeficientu nabývala zhruba $300 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, což odkazuje na volnou difúzi sondy prostředím. V micelárním prostředí Atto 488 pravděpodobně hledá povrch micely, aby na něm zkondenzovala, když bude mít tu možnost. V případě, že sondu omezíme a vysrážíme v hydrogelu, díky přítomnosti hyaluronanu tam budou záporné náboje, s nimiž sonda interagovat nebude a tím pádem vysoká hodnota difúzního koeficientu vypovídá o tom, jako kdyby na některých místech v gelu chyběla micela a difúzní koeficient byl ustanoven v rámci zajištění rovnováhy ve smyslu místa normální struktury gelu a částí chybějící micely. Jiným vysvětlením by mohlo být, že měření se odehrávalo na nehomogenním místě v gelu, čímž byla zasažena kavita ve vzorku. V rámci zprůměrování byla tato hodnota vynechána, v opačném případě by poskytla velkou směrodatnou odchylku. Podobně, jako tomu bylo v čistě micelárním prostředí, byla u vzorku Septonex 1400–1600 Hya pozorována opakující se skoková hodnota difúzního koeficientu, která byla obdobná pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu. Tato skutečnost nasvědčuje tomu, že gelová síť výrazně nezpomalila pohyb micel s navázanou sondou oproti vodnému roztoku.

Grafické znázornění difúzních koeficientů s popiskem zaokrouhlené hodnoty a odpovídající chybovou úsečkou znázorňuje Obr. 19. Z obrázku je také patrné, že obecně difúzní koeficienty mají podobnou hodnotu jako změřený volný pohyb sondy v micelárním systému diskutovaný v předešlé kapitole 4.1. Pravděpodobným důsledkem pohybu sondy Atto 488 v gelu s CTAB je elektrostatická interakce sondy s kladnou strukturou tenzidu, při níž dochází ke změně difúzního koeficientu. Naopak, nelze říci s jistotou, že došlo k výrazné interakci Atto 488 se Septonexem vlivem velkého difúzního koeficientu, který značí spíše velmi slabou interakci. Takto vysoká hodnota difúzního koeficientu je pravděpodobně způsobena tím, že Atto 488 je dočasně navázaná na Septonex a posléze dojde k jejímu uvolnění a tím pádem pozorujeme jakýsi průměrný difúzní koeficient vázané a volné sondy.

Nalezený trend v podobě rychlejšího pohybu fluorescenční sondy Atto 488 ve vzorcích hydrogelů vzniklých interakcí Septonexu a hyaluronanu je upraven pomocí normalizovaných dat za účelem větší přehlednosti a vnesený do grafu, který je zobrazen na následujícím obrázku.



Obr. 20: Srovnání normalizovaných autokorelačních křivek sondy Atto 488 pro hydrogely vzniklé interakcí určitého tenzidu a hyaluronanu

Z uvedeného obrázku je patrné, že poklesy normalizovaných autokorelačních křivek podél časové osy jsou podobné pro jeden druh tenzidu, ale odlišné při porovnání tenzidů navzájem. Rozdíl mezi tenzidy se nachází v podobě kratších difúzních časů pro hydrogely se Septonexem a analogicky delších časů pro hydrogely s CTAB. Pravděpodobným vysvětlením kratšího difúzního času je výskyt slabé interakce mezi sondou a Septonexem, která poskytuje výslednou relativně vysokou hodnotu difúzního koeficientu, jenž je ovlivněna pohybem sondy prozatímne navázané na micelu a poté uvolněné do prostředí. Nutno podotknout, že se jedná pouze o naši domněnku, jak by to bylo možné vysvětlit. Pro jednotlivé tenzidy je vidět, že zvýšená molekulová hmotnost hyaluronanu neovlivňuje difúzní chování sondy v prostředí hydrogelu.

Tabulka č. 6 uvádí, že pro všechny vzorky je přítomný jeden difúzní koeficient s většinovým zastoupením oproti druhému, jež je z pohledu zastoupení zanedbatelný. Zároveň jsou chyby difúzních koeficientů menší pro vzorky s CTAB oproti Septonexu. Shodné hodnoty poskytují chyby zastoupení difúzních koeficientů. Tripletní časy jsou poněkud delší ve srovnání s tenzidy ve vodném prostředí, avšak to zde nehraje žádnou roli a můžeme říci, že vycházejí podobně, neboť odhadování interakce na základě tripletních časů je velice komplikované. Za povšimnutí stojí, že tripletní časy jsou podobné v rámci jednoho tenzidu. Obr. 19 znázorňuje, že chybové úsečky jsou obecně větší pro gely tvořené Septonexem.

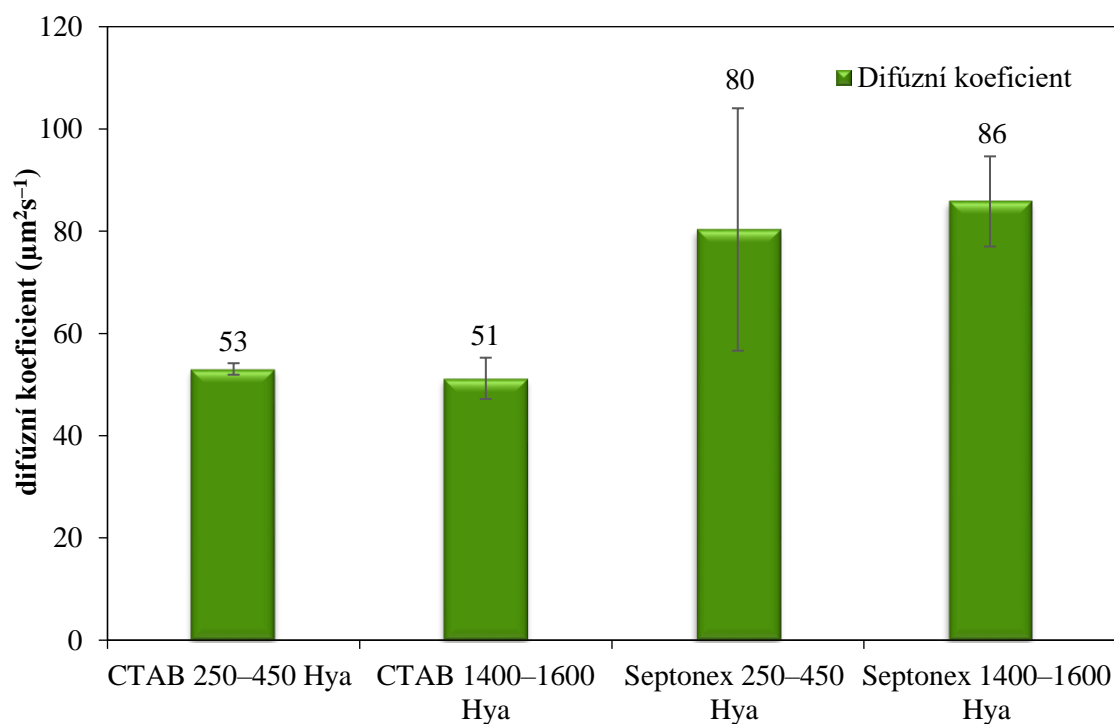
Na základě literárních zdrojů bylo zjištěno, že metoda fluorescenční korelační spektroskopie podléhá mnoha optickým a fotofyzikálním aberacím, a z tohoto důvodu si necháváme získané výsledky potvrdit přesnější metodou dvouhnikové fluorescenční korelační spektroskopie.

4.2.2 Stanovení difúzních vlastností metodou 2f-FCS

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je možné měřit hydrogely vzniklé fázovou separací hyaluronanu a tenzidu pokročilejší metodou 2f-FCS. Klasická FCS je citlivá na odlišný index lomu měřených systémů a tím do značné míry ovlivňuje výsledky. Z toho důvodu hydrogely byly vystaveny robustní metodě 2f-FCS, která je vůči změně indexu lomu nezávislá, díky přesnému stanovení vzdálenosti Nomarského hranolu. Po změření difúze sondy o nanomolární koncentraci ve vodě byla stanovena vzdálenost na hodnotu 404 nm a poté byly pro hydrogely získány difúzní parametry a parametry tvaru detekčního objemu, které znázorňuje následující tabulka.

Tabulka č. 7: Tabulka s parametry tvaru detekčního objemu a difúzními parametry sondy Atto 488 v hydrogelech měřené 2f-FCS

| Vzorek | D 1 ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | τ_{triplet} (μs) | w_0 (nm) | R_0 (nm) |
|------------------------|--------------------------------------|---|------------|------------|
| CTAB 250–450 Hya | $53,05 \pm 0,01$ | 4,17 | 303,83 | 124,17 |
| CTAB 1400–1600 Hya | $51,22 \pm 0,01$ | 2,50 | 298,67 | 140,67 |
| Septonex 250–450 Hya | $80,33 \pm 0,01$ | 4,33 | 291,67 | 142,67 |
| Septonex 1400–1600 Hya | $85,82 \pm 0,01$ | 3,33 | 311,67 | 129,83 |



Obr. 21: Difúzní koeficienty sondy Atto 488 měřené 2f-FCS v hydrogelech tvořených tenzidy CTAB a Septonex o dvou molekulových hmotnostech hyaluronanu

Vzhledem k tomu, že závěrečná práce [90] se zaměřovala na studium jednotlivých prostředků a měření hydrogelů výhradně metodou FCS, za účelem srovnání nám poslouží pouze předchozí experiment se sondou Atto 488 stanovující difúzní vlastnosti obou použitých tenzidů klasickou metodou. Současný výzkum měření těchto druhů hydrogelů tak obohacujeme o výsledky získané metodou 2f-FCS.

Naměřená data metodou 2f-FCS byla pomocí skriptu pro Matlab nejlépe vyhodnocena na jeden difúzní koeficient a tripletní čas. Již prvním pohledem na Obr. 21 je možné vidět, že ve srovnání s Obr. 19 poskytuje podobné hodnoty difúzních koeficientů lišící se absencí druhého difúzního koeficientu, který při vyhodnocení nabýval nereálné hodnoty až deset tisíců $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, a proto byl zanedbán.

Vzorek gelu CTAB 250–450 Hya nabývá o něco větší absolutní hodnoty difúzního koeficientu ve srovnání s předchozím experimentem. Stejně tak vzorek CTAB 1400–1600 Hya má větší difúzní koeficient oproti výsledku získaným klasickou metodou. Vzájemným porovnáním vzorků, s přihlédnutím k velikosti chybových úseček, lze tvrdit, že jejich rozdíl v hodnotě difúzního koeficientu je nízký až zanedbatelný. Tím pádem tato skutečnost vyvrací fakt, že by molekulová hmotnost hyaluronanu měla vliv na pohyb sondy v gelu a prostředí tak vykazuje uniformní chování.

Překvapivé zvýšení difúzního koeficientu, oproti stejným experimentům s CTAB, nastalo opět u vzorku Septonex 250–450 Hya mající největší chybovou úsečku. Ta je proto, že v rámci série třech měření se objevilo ojedinělé snížení difúzního koeficientu na hodnotu $53 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, které by teoreticky mohlo odkazovat na vzniklou interakci mezi sondou a tenzidem, což vzhledem k opakovatelnosti měření nebylo prokázáno. Dalším vysvětlením by mohla být numerická nestabilita skriptu Matlab. Vysoká hodnota difúzního koeficientu, již nepostihnuta anomálií výsledků, byla zachována u vzorku Septonex 1400–1600 Hya. Jedním vysvětlením by mohlo být, že v hydrogelu je mikroprostředí tvořící prostor, který odpovídá vodě a sonda se pohybuje tímto prostorem velmi slabě navázaná na Septonex. Hnací silou této aktivně podpořené difúze je vytlačení sondy do vnitřního prostředí hydrogelu způsobené vlivem elektrostatické interakce micel s hyaluronanem, která nezpomaluje pohyb sondy, a to signalizuje tato vysoká hodnota difúzního koeficientu.

Hydrogelové soustavy jsou složeny z prostředí, které tvoří voda, sůl, hyaluronan a tenzid a všechny svým dílem přispívají k určitému chování daného hydrogelu. Přítomností hyaluronových řetězců majících ve své struktuře záporně nabitě karboxylové skupiny a přítomností kladně nabitých tenzidů očekáváme vzájemnou interakci.

Tabulka č. 7 uvádí stejné hodnoty chyb určení difúzních koeficientů pro oba použité tenzidy. Tripletní časy v tomto případě nabývají podobných hodnot pro tenzidy s nízkomolekulárním hyaluronanem. Na základě parametrů udávajících tvar detekčního objemu je patrné, že veškerá analýza měření poskytovala téměř identický rozměr.

4.2.3 Srovnání použitých metod pro sondu Atto 488

Uvedená kapitola srovnává použité metody na základě získaných výsledků. Výsledky získané klasickou FCS jsou porovnány s přesnější metodou 2f-FCS, která je podle literatury obecně považována za korektnější, což bylo potvrzeno mnoha odbornými publikacemi. Zároveň si tato kapitola klade za cíl stručně shrnout doposud získané poznatky o studovaných systémech.

Tabulka č. 6 a Tabulka č. 7 uvádějí, že stanovené difúzní koeficienty jsou pro tenzid CTAB měřeny klasickou metodou menší ve srovnání s pokročilou technikou, ale tento rozdíl je vzhledem ke zprůměrování hodnot zanedbatelný a obdobně tenzid Septonex vykazuje podobné hodnoty difúzních koeficientů. Obecně lze říci, že chyby určení difúzních koeficientů jsou větší při porovnání tenzidů pro Septonex měřeny klasickou FCS, zatímco tyto chyby jsou stejné při použití 2f-FCS.

Pokročilá metoda 2f-FCS, až na nepatrné odlišnosti, potvrdila výsledky klasické metody a poukázala tak na neidentický charakter tenzidů prostřednictvím rychlejšího pohybu sondy v hydrogelech tvořených Septonexem, čímž vykazuje, že sonda pravděpodobně se Septonexem příliš neinteraguje. Ve skutečnosti toto tvrzení nelze potvrdit, neboť žádné agregační číslo, ani tzv. *packing parametr*, což je parametr popisující spontánní geometrické uspořádání molekul do tvaru micely v roztoku, nebyly v literatuře dohledatelné.

Neměnné chování svých vlastností vykazovaly hydrogely v rámci jednoho tenzidu, čímž poukázaly, že molekulová hmotnost hyaluronanu v gelu nemá vliv na pohyb sondy. Z toho lze usoudit, že z mikroskopického pohledu nezáleží na typu použitého hyaluronanu, ale z makroskopického pohledu již ano, neboť gely připravené s nízkomolekulárním hyaluronanem nabývaly řidší konzistence. Molekulová hmotnost hyaluronanu v hydrogelu hraje pouze roli makrovýztuže. Jinými slovy, není potvrzeno, že by se deformovaly řetězce, ale spíše tu dochází k pohybu v kontinuu.

Hlavním záměrem použití těchto dvou fluorescenčních technik bylo jejich vzájemné porovnání získaných výsledků. Jak bylo již zmíněné, výsledky klasické FCS mohou být ovlivněny změnou indexu lomu měřených hydrogelových systémů a mohou tak být nespolehlivé. Diskutované rozdíly v hodnotách difúzních koeficientů jsou však velmi nízké, což lze přisuzovat měření v relativně malé hloubce gelu, kde se změna indexu lomu tolik neprojevuje.

4.3 Studium hydrogelů fluorescenční sondou nilská červeň

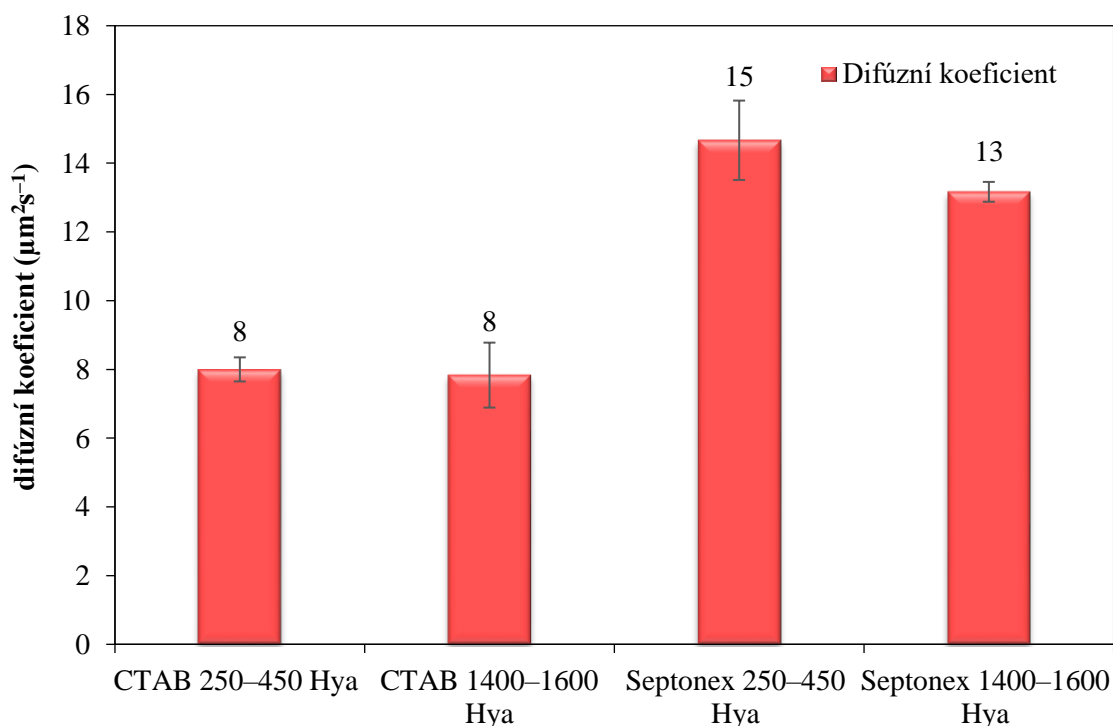
Poté, co byly hydrogely prozkoumány fluorescenční sondou Atto 488, prostřednictvím obou fluorescenčních technik, přecházíme ke studiu hydrogelů sondou nilská červeň. Závěrečná práce [90] potvrdila, že nilská červeň poskytuje signál při měření gelů metodou FCS, a proto tyto systémy necháváme také podrobit zkoumání progresivní metodou 2f-FCS.

4.3.1 Stanovení difúzních vlastností metodou FCS

Stanovení difúzních vlastností bylo opět nejdříve provedeno metodou FCS. Na začátku měření byla provedena kalibrace změřením sondy Rhodamin 6G o nanomolární koncentraci ve vodě a poté byly měřeny hydrogely, jejichž získaný difúzní koeficient se zastoupením je uveden v následující tabulce.

Tabulka č. 8: Tabulka s difúzním parametrem sondy nilská červeň v hydrogelech měřené FCS

| Vzorek | D 1 ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | ρ 1 |
|------------------------|--------------------------------------|------------------|
| CTAB 250–450 Hya | $8,00 \pm 0,22$ | $0,19 \pm 0,003$ |
| CTAB 1400–1600 Hya | $7,83 \pm 0,20$ | $0,18 \pm 0,003$ |
| Septonex 250–450 Hya | $14,67 \pm 0,89$ | $0,14 \pm 0,003$ |
| Septonex 1400–1600 Hya | $13,17 \pm 0,67$ | $0,13 \pm 0,003$ |

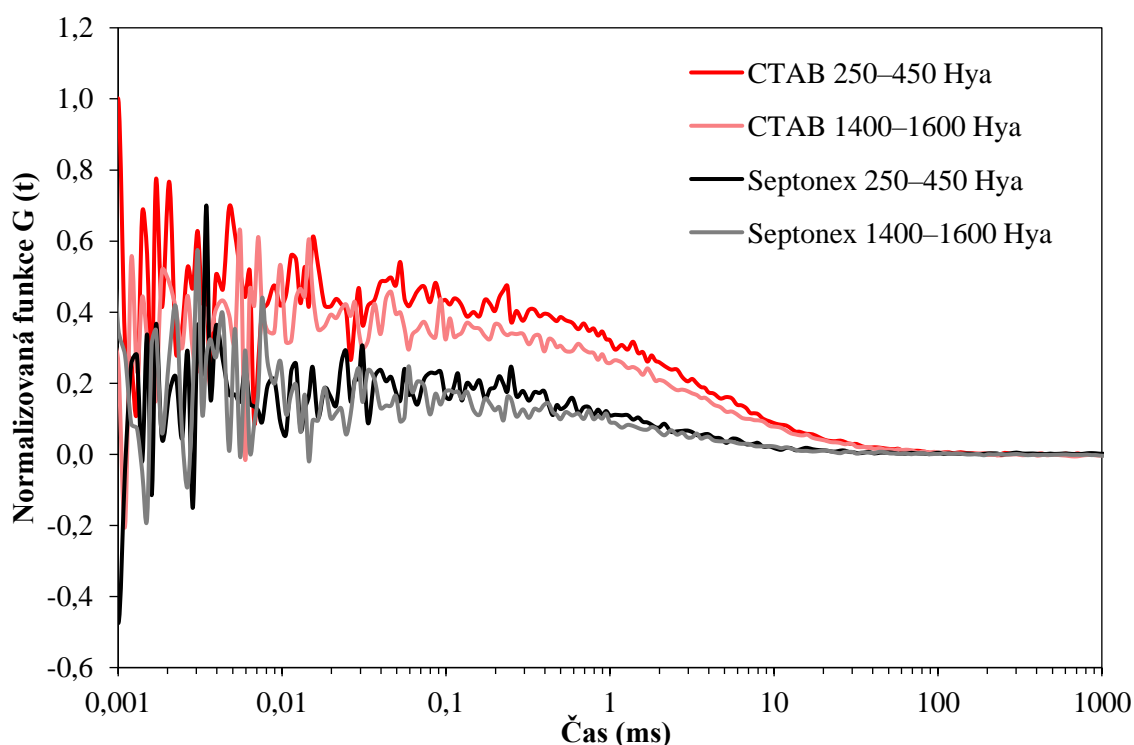


Obr. 22: Difúzní koeficienty sondy nilská červeň měřené FCS v hydrogelech tvořených tenzidy CTAB a Septonex o dvou molekulových hmotnostech hyaluronanu

První měření pohybu fluorescenční sondy v micelárním prostředí nám i zde podává důležité informace o interakci sondy s tenzidy, s čímž budeme porovnávat současně získané výsledky.

V prostředí micelárních koloidů nabýval difúzní koeficient nilské červeně pro tenzid CTAB hodnoty $38 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Porovnáním s oběma prvními vzorky tenzidu CTAB 250–450 Hya a CTAB 1400–1600 Hya je získaný výsledek více než čtyřikrát menší v prostředí hydrogelu, přičemž u druhého vzorku je patrná větší chybová úsečka. Rovněž ve srovnání se sondou Atto 488 nastala řádová změna hodnoty difúzního koeficientu až na jednotky. Vyhodnocení gelu s nilskou červení v práci [90] poskytlo stejnou hodnotu difúzního koeficientu, avšak navíc tripletní čas. Současně lze konstatovat, že gely mají zřejmě stejnou strukturu pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu.

V prostředí micelárních koloidů nabýval difúzní koeficient nilské červeně pro tenzid Septonex hodnoty $55 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Změna prostředí zapříčinila u vzorků Septonex 250–450 Hya a Septonex 1400–1600 Hya až téměř čtyřnásobné snížení difúzního koeficientu. Taktéž z hlediska sondy Atto 488 došlo k výrazné změně. Porovnáním s předchozí strukturou tenzidu CTAB se zdá, že nilská červeně interaguje a zároveň difunduje prostředím se Septonexem. Následující obrázek znázorňuje normalizovaná data vynesena do grafu, z kterého je možné na časové ose vidět rychlejší pohyb sondy nilské červeně v hydrogelu tvořeném Septonexem oproti jeho strukturnímu analogu CTAB a současně zrychlený pohyb v gelu s vysokomolekulárním hyaluronanem v rámci porovnání CTAB, který vlivem zprůměrování nezměnil celkovou hodnotu difúzního koeficientu.



Obr. 23: Srovnání normalizovaných autokorelačních křivek sondy nilská červeně pro hydrogely vzniklé interakcí určitého tenzidu a hyaluronanu

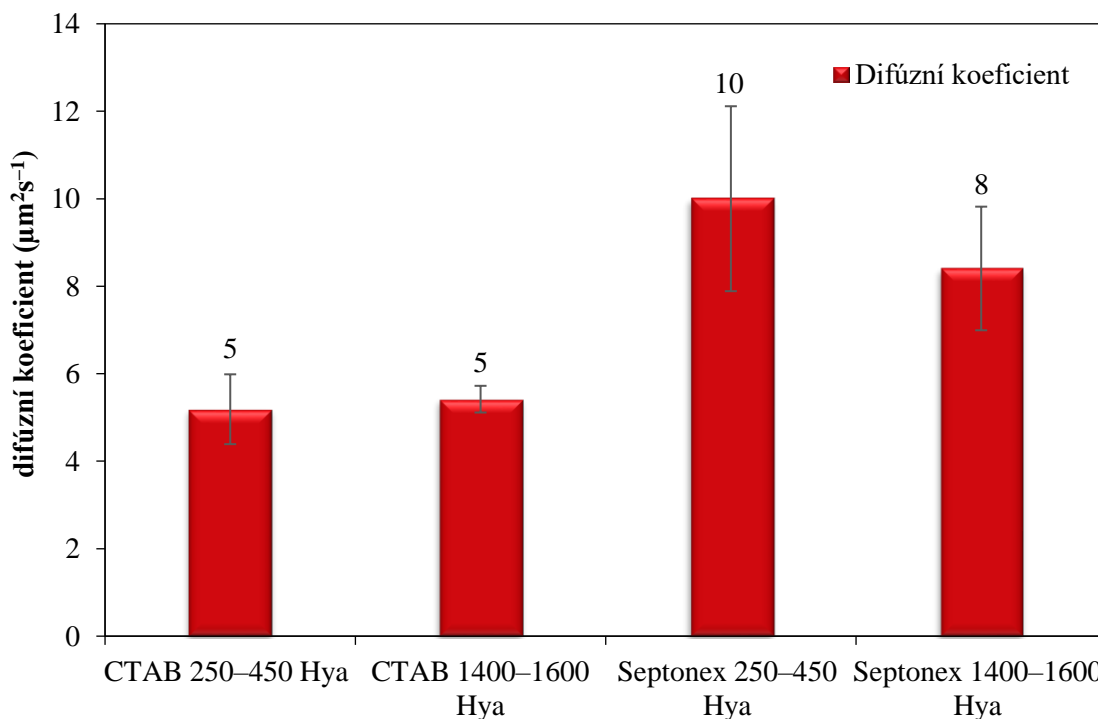
Tabulka č. 8 shrnuje, že difúzní koeficienty jsou obecně menší a zároveň mají menší chyby pro vzorky hydrogelů tvořených CTAB a současně mají větší zastoupení oproti Septonexu, přičemž jsou jejich chyby zastoupení stejné.

4.3.2 Stanovení difúzních vlastností metodou 2f-FCS

Úvodem této kapitoly je nutné zdůraznit, že nilská červeň nemá příliš vhodnou fotofyziku, a vzhledem k její preferenci hydrofobního prostředí očekáváme, že poskytnutý signál pochází z lokalizace z méně polárního prostředí. Doposud získané výsledky mají původ v klasické FCS, která podléhá optickým aberacím, z nichž pro náš experiment tvoří největší nesnázi změna indexu lomu. Povaha tohoto problematického aspektu spočívá v prvotní kalibraci systému na vodné prostředí, přičemž následné měření probíhá v hydrogelech. Proto hydrogely podřizujeme měření robustní 2f-FCS, u níž změna indexu lomu může poněkud rozličně uzpůsobit tvar detekčních objemů, ale stanovená vzdálenost Nomarského hranolu zůstává neměnná. Předpokladem je, že vyšší červené vlnové délky pronikají do gelu a vytvářejí mnohem menší a lépe definovaný objem. Uvedená vzdálenost Nomarského hranolu byla stanovena změřením sondy Rhodamin 6G o nanomolární koncentraci ve vodě na hodnotu 413 nm a získaný difúzní koeficient s parametry tvaru detekčního objemu je znázorněn v následující tabulce.

Tabulka č. 9: Tabulka s parametry tvaru detekčního objemu a difúzním parametrem sondy nilská červeň v hydrogelech měřené 2f-FCS

| Vzorek | D 1 ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) | w ₀ (nm) | R ₀ (nm) |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|
| CTAB 250–450 Hya | 5,19 ± 0,04 | 336,67 | 104,00 |
| CTAB 1400–1600 Hya | 5,42 ± 0,04 | 332,67 | 111,83 |
| Septonex 250–450 Hya | 10,00 ± 0,03 | 350,33 | 95,17 |
| Septonex 1400–1600 Hya | 8,41 ± 0,02 | 320,83 | 111,33 |



Obr. 24: Difúzní koeficienty sondy nilská červeň měřené 2f-FCS v hydrogelech tvořených tenzidy CTAB a Septonex o dvou molekulových hmotnostech hyaluronanu

Základem pro diskuzi srovnání získaných výsledků v podobě stanovených difúzních koeficientů pro jednotlivé hydrogely s nilskou červeň poslouží především předchozí experiment zabývající se měřením hydrogelů klasickou metodou FCS a zároveň výsledky se sondou Atto 488 přispívající hydrofilním pohledem.

Obr. 24 graficky znázorňuje, že naměřené difúzní koeficienty vykazují stejnou hodnotu pro vzorky CTAB 250–450 Hya a CTAB 1400–1600 Hya. Oproti výsledkům poskytnutým klasickou metodou jsou však tyto hodnoty zanedbatelně nižší. V rozporu se nacházíme s hydrofilní sondou Atto 488, která poskytovala průměrnou hodnotu difúzního koeficientu pro tenzid CTAB $52 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, zde tedy došlo desetkrát ke snížení difúzního koeficientu. To by znamenalo, že micely se pohybují desetkrát pomaleji.

Nepatrný rozdíl v hodnotě difúzního koeficientu je možné pozorovat u vzorku hydrogelu Septonex 250–450 Hya a Septonex 1400–1600 Hya obsahující největší chybové úsečky. Porovnáním se sondou Atto 488 se změny difúzních koeficientů pro dané tenzidy nacházejí ve stejném poměru a lze tedy říci, že v tomto případě je to komplementární. Uvedený řádový pokles difúzního koeficientu pravděpodobně odkazuje na micelu pohybující se desetkrát pomaleji. Za účelem interpretace se nabízí vysvětlení, že z hlediska hydrofilního pohledu se Atto 488 v hydrogelu hýbe nezávisle v rámci nějaké integrované nanodomény, ale nilská červeň pravděpodobně putuje se Septonexem. Nabízí se zde otázka, jaké hodnoty by nabýval difúzní koeficient nevázané sondy ve vodném prostředí, ale na to je, vlivem její velmi omezené rozpustnosti ve vodě, složitá odpověď.

Tabulka č. 9 znázorňuje vyšší chyby určení difúzních koeficientů pro tenzid CTAB a zároveň podobné hodnoty modelových parametrů detekčního objemu ve srovnání s předchozím měřením 2f-FCS.

4.3.3 Srovnání použitých metod pro sondu nilská červeň

Současná kapitola se zabývá srovnáním použitých metod na základě získaných výsledků, které porovnává nejen v rámci nilské červene, ale také s dosud získanými výsledky sondou Atto 488 za účelem částečné charakterizace hydrogelů.

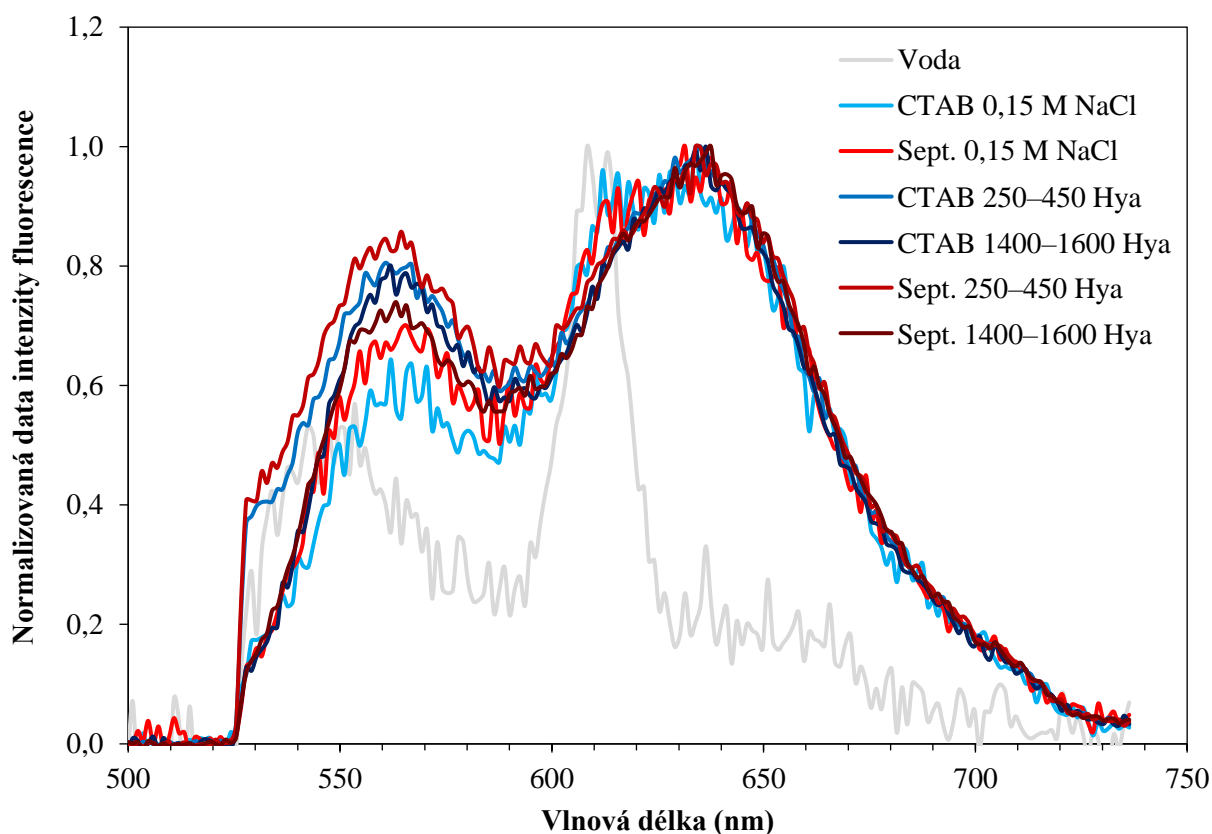
Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2.3, klasická FCS je velmi senzitivní na změny indexu lomu, z tohoto důvodu srovnáváme získané výsledky s přesnější 2f-FCS. S uvážením zanedbatelného vlivu molekulové hmotnosti hyaluronanu, nabývala nilská červeň pro CTAB průměrně $8 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ a pro Septonex $14 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ klasickou metodou, což je ve stejném poměru s výsledky 2f-FCS. Tabulka č. 8 a Tabulka č. 9 znázorňují hodnoty difúzních koeficientů, jejichž chyby jsou při porovnání tenzidů v rámci jedné metody navzájem podobné, s výjimkou hydrogelů vzniklých interakcí hyaluronanu a Septonexu měřených FCS. Porovnáním s rozdíly hodnot difúzních koeficientů sondy Atto 488, je možné tyto odlišnosti zanedbat.

Na základě doposud získaných výsledků pro zkoumaný tenzid Septonex můžeme říci, že sonda Atto 488 nevykazuje výraznou interakci díky pravděpodobnému vytlačení do prostoru, v němž se nenaváže a nilská červeň putuje prostředím se Septonexem.

Dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie opět potvrdila výsledky získané klasickou metodou a zároveň poukázala na konzistentní chování hydrogelů.

4.4 Spektra nilské červeně v jednotlivých prostředích

Poslední kapitola nám podává informace o spektrálních vlastnostech nilské červeně v jednotlivých prostředích měřených pomocí spektrografu Andor. Fluorescenční sonda nilská červeně byla individuálně analyzována v prostředí vody, CTAB v 0,15 M NaCl, Septonexu (Sept.) v 0,15 M NaCl a v hydrogelech vzniklých interakcí uvedených tenzidů a dvou molekulových hmotnostech hyaluronanu. Pozornost je tedy především upírána na diskuzi zabývající se naměřenými emisními spektry nilské červeně a současně tato kapitola shrnuje dosavadní poznatky o studovaných systémech, čímž poskytuje orientační náhled na vnitřní prostředí hydrogelů, které zaujímá stěžejní pozici této diplomové práce.



Obr. 25: Spektra nilské červeně v jednotlivých prostředích znázorňující přechod z hydrofobní oblasti do hydrofilní

Fluorescence sondy nilská červeně je velmi citlivá na polaritu prostředí. Uvedená polaritní konsekvence spočívá v reakci na zvyšující se polaritu prostředí posunem emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Analogicky, posun k modrým vlnovým délkám nastává s klesající polaritou prostředí. Tyto posuny, indukované změnou povahy okolí, označujeme jako solvatochromní posuny a látky, které je vykazují jako solvatochromní. Významným představitelem těchto látek je právě nilská červeně.

V koloidních systémech pravděpodobně dochází, po překročení kritické micelární koncentrace, k začleňování molekul hydrofobní sondy do nepolárních oblastí micel, čímž prudce klesá vlnová délka emisního maxima.

Obr. 25 znázorňuje zaznamenaná emisní spektra nilské červeně v jednotlivých prostředích, které vykazují poněkud zvláštní tvar prostřednictvím dvou výrazných piků, což je pravděpodobně vlivem pozorování více molekul fluorescenční sondy z různých prostředí. Pozorované molekuly nilské červeně ve všech vzorcích nabývají v hydrofobní oblasti maximum zhruba při 560 nm a v hydrofilní oblasti při 640 nm, přičemž první hodnota by mohla odpovídat pohledu do vnitřního jádra a druhá na solvatovanou vrstvu micely. Zároveň bylo zaznamenáno emisní spektrum vody, které přisuzujeme Ramanovu rozptylu.

Provedená měření byla uskutečněna použitím filtru 690/70, a je tedy patrné, že měření neprobíhala v maximu. Uvedená měření se zřejmě odehrávala v palisádové vrstvě, což je oblast micely, v níž se kolem kladného náboje tenzidu nachází uspořádané molekuly vody, které nepředstavují vyloženě strukturu zmrzlého stavu, ale přítomností hydrofilních povrchů v gelu, se snaží zaujmout určitou konformaci, a tudíž se nenacházejí v nahodilém uspořádání jako normální voda. Tato vrstva představuje jedinou možnost, kdy mohla nilská červeně vlivem kladného náboje tenzidu a delokalizovaného systému π -elektronů vycestovat z jádra micely a podlehnout interakci s touto vodou.

Motivací tohoto experimentu bylo zjistit, jak vypadají tvary jednotlivých emisních spekter hydrogelů vzniklých fázovou separací hyaluronanu a tenzidu s nilskou červení, přičemž bylo dokázáno, že použité tenzidy CTAB a Septonex si navzájem odpovídají.

Hlavním teoretickým předpokladem těchto systémů bylo, že mikroskopicky v hydrogelech pozorujeme více populací prostředí, které se budou víceméně měnit spojitě. Tyto populace jsme očekávali, že nám rozliší navržené sondy prostřednictvím odlišení jednotlivých difúzních pohybů. Nicméně, na základě doposud získaných výsledků se jeví, že v hydrogelu se moc prostředí nevyskytuje a spíše vykazuje unifikované chování.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou difúze organických molekul v koloidních a hydrogelových systémech. Obsahově navazuje na předchozí bakalářskou práci zabývající se především charakterizací jednotlivých dílčích prostředí hydrogelů. Současná práce disponuje primárním zaměřením na hydrogely vzniklé fázovou separací hyaluronanu s tenzidy CTAB a Septonex, který však není běžně využíván na školícím pracovišti Fakulty chemické, a tudíž seznámení se s jeho vlastnostmi výrazně přispěje do výzkumu hydrogelových soustav. Za účelem mikroskopického prozkoumání uvedených systémů se navrženými fluorescenčními sondami staly Atto 488 a nilská červeň, s nimiž bylo provedeno měření pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie a její upravené verze dvouhnikové fluorescenční korelační spektroskopie.

Na základě zadání diplomové práce byla v teoretické části zpracována literární rešerše na téma využití dvouhnikové fluorescenční korelační spektroskopie v koloidních systémech. Současný stav řešené problematiky odkazuje na vhodné využití této metody pro studium difúzních vlastností systémů o nanomolární koncentraci.

Souhrnným cílem této diplomové práce bylo pomocí zmíněných metod charakterizovat vnitřní strukturu hydrogelu prostřednictvím stanovení difúzního chování fluorescenční sondy. Na počátku práce byla studována specifická interakce obou použitých fluorescenčních sond s tenzidy ve vodném prostředí, která posloužila především k porovnání s následujícími hydrogelovými soustavami a současně podala první náhled na pravděpodobné interakce sond s asociativními koloidy.

Studium hydrogelů bylo nejdříve provedeno hydrofilní sondou Atto 488. Strukturně tato sonda představuje volnou karboxylovou kyselinu s teoreticky záporným nábojem, která zaujímá polární prostředí hydrogelu a s ohledem na přítomnost hyaluronového řetězce zde přichází jediné v úvahu přitažlivá elektrostatická interakce sondy s kladně nabitými hlavami tenzidu CTAB tvořících micelární agregáty. Podobné chování bylo očekáváno od tenzidu Septonex, který však opakovaně vykazoval až dvojnásobné zvýšení difúzního koeficientu oproti CTAB. Příčinou této překvapivé hodnoty by mohlo být vysvětlení, že hydrogel obsahuje prostor odpovídající vodě, do něž je sonda vytlačena vlivem interakcí micel s hyaluronanem, který sondě stericky znepřístupňuje povrch micel. Tím pádem sonda nemůže příliš interagovat s tenzidem a pohybuje se tak nezpomaleně prostorem, čímž odkazuje pouze na slabou interakci se Septonexem o dvakrát menší velikosti micel oproti CTAB, případně v prostoru s dvakrát nižší viskozitou oproti vodě.

Následně bylo studium hydrogelů uskutečněno hydrofobní sondou nilská červeň. Srovnáním s čistě micelárním prostředím a se sondou Atto 488 v gelu bylo zjištěno, že došlo k řádovému poklesu difúzního koeficientu, což by mohlo být způsobeno lokalizací sondy v nepolárním prostředí jádra micely. Nalezené zpomalení sondy bylo také potvrzeno předchozí bakalářskou prací. Porovnáním s předchozím tenzidem bylo zjištěno, že došlo k opětovnému zvýšení difúzního koeficientu tenzidu Septonex a lze se domnívat, že nilská červeň interaguje a difunduje prostředím se Septonexem. Postupným uvážením bylo také zjištěno, že hydrogely mají zřejmě stejnou strukturu pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu, které neovlivňují měření a v hydrogelu hrají pouze roli makrovýztuže.

Naměřená spektra nilské červeně znázornily, že měření se odehrávala pravděpodobně v palisádové vrstvě micely, jejíž fluidní charakter umožnil sondě vycestovat z jádra micely vlivem delokalizovaného systému π -elektronů a kladného náboje tenzidu a podlehnout tak interakci s okolní molekulou uspořádané vody.

Ze znalostí z literatury vyplynulo, že výsledky získané fluorescenční korelační spektroskopii by mohly být ovlivněny změnou indexu lomu měřených hydrogelů, a proto byly tyto soustavy podrobeny robustní metodě 2f-FCS. Porovnání získaných výsledků bylo provedeno srovnáním chyb určení difúzního koeficientu a bylo zjištěno, že takto malé chyby jsou v rámci zanedbání, což je pravděpodobně způsobeno měřením v malé hloubce hydrogelu. Na základě tohoto zjištění je možné doporučit, že pokud se naskytuje možnost měřit uvedený typ hydrogelů ve vzdálenosti kousek od sklíčka, nejlépe ve vzdálenosti zhruba 5 μm , tak není nezbytné použití pokročilé metody 2f-FCS.

Závěrem lze říci, že se podařilo úspěšně stanovit difúzní chování navržených sond v hydrogelech a současně porovnat obě použité metody, čímž byly získány cenné informace, které přispějí k dalšímu kognitivnímu studiu hydrogelových soustav. Zadané cíle práce byly splněny a do budoucna se jeví zajímavé podrobit hydrogely skenovací FCS, která je v současné době zkoumána jako alternativní metoda delšího měření vzorků s nízkými difúzními koeficienty.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KHABAROV, V., P. BOYKOV, M. SEL'YANIN a F. POLYAK. *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine*. John Wiley & Sons. 2015, 216 s. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [2] MEYER, K. a J. W. PALMER. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1934, (107), 629–634.
- [3] HOLLINGER, J. *An Introduction to Biomaterials*. Broken Sound Parkway New York: CRC Press Taylor and Francis Group, 2012. Jeffrey O. Hollinger. ISBN 978-1-4398-1257-0.
- [4] THOMAS, S., M. SEBASTIAN a A. GEORGE. *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends and IPNs: Advances in Materials Science*. 2. Apple Academic Press, 2013. Sabu Thomas, PhD, Neethu Ninan, Sneha Mohan, Elizabeth Francis. ISBN 978-1-926895-16-1.
- [5] HASCALL, V. a T. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties: Chemical structure. *Glycoforum: Hyaluronan Today* [online]. 1997 [cit. 2017-01-31]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [6] SCOTT, J. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences.: The Hydrophobic Patch in Hyaluronan. *Glycoforum: Hyaluronan Today* [online]. 1998 [cit. 2017-01-31]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html#II>
- [7] LAPČÍK, L., S. DE SMEDT a J. DEMEESTER. *Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications*. 1998. DOI: 10.1021/cr941199z. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr941199z>
- [8] COWMAN, M. a S. MATSUOKA. *Experimental approaches to hyaluronan structure*. 2005. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621505000534>
- [9] BOERIU, C., J. SPRINGER a F. KOOY. *Production Methods for Hyaluronan*. 2013. DOI: 10.1155/2013/624967. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/>

- [10] JIANG, L., S. TITMUSS, A. COWLEY a J. KLEIN. *Direct measurement of forces between cell-coating polymers and chiral crystal surfaces: the enantioselectivity of hyaluronan*. 2008. DOI: 10.1039/B717940E. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b717940e>
- [11] *Comprehensive Biomaterials: Metallic, ceramic and polymeric biomaterials*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2011, 744 s. Paul Ducheyne: Kevin Healy, Dietmar Huttmacher, David Grainger, C. James Kirkpatrick. ISBN 978-0-08-055302-3.
- [12] VÁZQUEZ, J., I. RODRÍGUEZ-AMADO a M. MONTEMAYOR. *Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes*. 2013. DOI: 10.3390/md11030747. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/11/3/747/>
- [13] BOAS, N. Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. *The Journal of Biological Chemistry*. 1949.
- [14] SARANRAJ, P. a M. A. NAIDU. Hyaluronic acid production and application: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. 2013.
- [15] *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009, 293 s. Bernd H. A. Rehm. ISBN 978-1-904455-36-3.
- [16] WIDNER, B., R. BEHR, S. VON DOLLEN et al. *Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis*. 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>
- [17] JING, W. a P. L. DEANGELIS. *Synchronized Chemoenzymatic Synthesis of Monodisperse Hyaluronan Polymers*. 2004. DOI: 10.1074/jbc.M402744200. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M402744200>
- [18] LEBEL, L. *Advanced Drug Delivery Reviews: Clearance of hyaluronan from the circulation*. 7. 1991, (2), 221–235. ISSN 0169409x.
- [19] VOLPI, N., J. SCHILLER a R. STERN. *Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan*. 2009, 28 s. DOI: 10.2174/092986709788186138. Dostupné také z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>

- [20] MORETTO, P., E. KAROUSOU a M. VIOLA. *Regulation of Hyaluronan Synthesis in Vascular Diseases and Diabetes*. 2015. DOI: 10.1155/2015/167283. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/167283/>
- [21] RODÉN, L., P. CAMPBELL, J. FRASER a T. LAURENT. *Enzymic pathways of hyaluronan catabolism*. Ciba Foundation. 1989.
- [22] GOES, F. J. *The Eye in History*. Antwerp, Belgium: Jaypee Highlights Medical Publishers, 2013, 502 s. ISBN 978-93-5090-274-5.
- [23] TAMMI, R. a M. TAMMI. Hyaluronan in the Epidermis. *Glycoforum: Hyaluronan Today* [online]. 1998 [cit. 2017-02-02].
- [24] *Hyaluronan in Cancer Biology*. Academic Press, 2009, 468 s. Robert Stern. ISBN 978-0-12-374178-3.
- [25] BARAN, R. a H. MAIBACH. *Textbook of Cosmetic Dermatology*. 4. United Kingdom: Informa Healthcare, 2010. ISBN 9781841847009.
- [26] ASARI, A. a S. MIYAUCHI. Medical Applications of Hyaluronan: Sodium Hyaluronate for Osteoarthritis. *Glycoforum* [online]. 2000 [cit. 2017-02-03].
- [27] *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*. United Kingdom: Smithers Rapra Technology, 2014. Maurice N. Collins. ISBN 978-190903-077-0.
- [28] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005, 244 s. ISBN 80-7080-579-X.
- [29] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [30] SHCHUKIN, E. D., A. V. PERTSOV, E. A. AMELINA a A. S. ZELENEV. *Colloid and Surface Chemistry*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B.V., 2001. ISBN 0-444-50045-6.
- [31] NOVÁK, J. *Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011.

- [32] FARN, R. *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell Publishing, 2006, 331 s. Richard J. Farn. ISBN 978-14051-2696-0.
- [33] RUYS, A. *Biomimetic biomaterials: Structure and applications*. Woodhead Publishing, 2013, 307 s. Andrew J. Ruys. ISBN 978-0-85709-888-7.
- [34] DE, S. a S. MONDAL. *Micellar Enhanced Ultrafiltration: Fundamentals and Applications*. CRC Press, 2012. ISBN 978-1-4398-9803-1.
- [35] MYERS, D. *Surfactant Science and Technology*. 3. United States of America: Wiley Interscience, 2006, 448 s. ISBN 978-0-471-68024-6.
- [36] *Water-Insoluble Drug Formulation*. Interpharm CRC Press, 2000, 672 s. Rong Liu. ISBN 1-57491-105-8.
- [37] Sigma Aldrich: Hexadecyltrimethylammonium bromide. *Sigma Aldrich: CTAB* [online]. b.r. [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/855820?lang=en®ion=CZ>
- [38] *Český lékopis 2009 Doplněk 2015: Zkoumadla*. Praha: Grada Publishing, 2015, 968 s. ISBN 9788024755229.
- [39] *Handbook of organic materials for optical and (opto)electronic devices: Properties and applications*. Woodhead Publishing, 2013, 832 s. Oksana Ostroverkhova. ISBN 978-0-85709-876-4.
- [40] Material Safety Data Sheet: Cetyltrimethylammonium bromide MSDS. *Science Lab: Chemicals and Laboratory Equipment* [online]. 2013 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923367>
- [41] RAY, P., H. YU a P. FU. *Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs*. 2009. DOI: 10.1080/10590500802708267. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590500802708267>
- [42] PELT-VERKUIL, E., A. BELKUM a J. HAYS. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer, 2008, 330 s. ISBN 978-1-4020-6241-4.
- [43] ONUCHE, P, F OKIBE a V AJIBOLA. *Biodegradation of Cetyltrimethylammonium Bromide and Methylparaben in Shampoo and Hair Dressing Salon Waste Using Bacteria Isolated from Sewage Treatment Sludge*. 2016. DOI: 10.9734/ACRI/2016/25278. Dostupné také z: <http://sciencedomain.org/abstract/13788>

- [44] *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. William Andrew, Elsevier, 2016, 970 s. Alina Maria Holban, Alexandru Mihai Grumezescu. ISBN 9780323477222.
- [45] Cetrimonium Bromide. *Pub Chem: Open chemistry database* [online]. b.r. [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5974>
- [46] MOHAMED, G., M. EL-SHAHAT a A. AL-SABAGH. *Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations*. 2011. DOI: 10.1039/C0AN00662A. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [47] *Český lékopis 1997: Carbethopendecinii bromidum*. Praha, 1997. Dostupné také z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecinii_bromidum.htm
- [48] Carbaethopendecine Bromide. *Pub Chem: Open chemistry database* [online]. b.r. [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160944#section=Top>
- [49] KRONBERG, B., K. HOLMBERG a B. LINDMAN. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*. John Wiley & Sons, 2014, 496 s. ISBN 9781119961246.
- [50] KOGEJ, K. a J. ŠKERJANC. Effect of polyelectrolyte on the aggregation of cationic surfactants in aqueous solutions. *Acta Chim. Slov. Slovenia*, 1998, (4), 443–453. Dostupné také z: <http://acta-arhiv.chem-soc.si/45/45-4-443.pdf>
- [51] HOLMBERG, K., B. JÖNSSON, B. KRONBERG a B. LINDMAN. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2. John Wiley & Sons, 2002, 547 s. ISBN 0-471-49883-1.
- [52] THALBERG, K. a B. LINDMAN. *Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight*. 1991. DOI: 10.1021/j100161a073. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100161a073>
- [53] THALBERG, K. a B. LINDMAN. *Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water*. 1990. DOI: 10.1021/j100373a075. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100373a075>

- [54] HERSLOEF, A., L. SUNDELOEF a K. EDSMAN. *Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system*. 1992. DOI: 10.1021/j100184a061. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100184a061>
- [55] BJOERLING, M., A. HERSLOEF-BJOERLING a P. STILBS. *An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide*. 1995. DOI: 10.1021/ma00124a038. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00124a038>
- [56] TOKITA, M. *Progress in Colloid and Polymer Science: Gels: Structures, Properties and Functions*. Springer Science & Business Media, 2009, 213 s. F. Kremer, W. Richtering.
- [57] KŘÍŽEK, T., P. COUFAL a Z. BOSÁKOVÁ. Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické Listy*. 2009, (103), 130–135. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_130-135.pdf
- [58] WEN, Q. a Y. DONG. *Gels Handbook: Fundamentals, Properties and Applications*. World Scientific, 2016. Utkan Demirci, Ali Khademhosseini. ISBN 978-981-4656-13-9.
- [59] CHESTER, S. *Gel Mechanics: A Thermo-mechanically Coupled Theory for Fluid Permeation in Elastomeric Materials*. 2015. DOI: 10.1016/j.piutam.2014.12.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210983814000765>
- [60] SCHERER, G. *Structure and properties of gels*. 1999. DOI: 10.1016/S0008-8846(99)00003-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008884699000034>
- [61] AHMED, E. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2015. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [62] H. GULREZ, S. a S. AL-ASSAF. *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. 2011. DOI: 10.5772/24553. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>

- [63] GERLACH, G.. a K. ARNDT. *Hydrogel sensors and actuators: Methods and Applications*. New York: Springer, 2009, 272 s. Springer series on chemical sensors and biosensors, 06. ISBN 35-407-5645-0.
- [64] TSOU, Y., J. KHONEISSER, P. HUANG a X. XU. *Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate*. 2016. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.05.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X1630010X>
- [65] LAKOWICZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [66] FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze* [online]. b.r. [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [67] VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications Weinheim*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-60024-8.
- [68] SLAVÍK, J. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes: Fluorescent Probes*. Springer Science & Business Media, 2013, 306 s. ISBN 978-1-4899-1868-0.
- [69] ATTO-TEC: Fluorescent Labels and Dyes. *ATTO-TEC GmbH* [online]. Germany, b.r. [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: https://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?language=en&info=p99_ATTO-488.html
- [70] ATTO dyes. *ATDBio* [online]. b.r. [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.atdbio.com/content/36/ATTO-dyes#Properties-and-structures>
- [71] SAUER, M., J. HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [72] Atto 488: Application. *Sigma-Aldrich* [online]. b.r. [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/41051?lang=en®ion=CZ>
- [73] Laser dyes. *Resonance*. 2010. DOI: 10.1007/s12045-010-0090-9. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12045-010-0090-9>

- [74] SAXENA, R., S. SHRIVASTAVA a S. HALDAR. *Location, dynamics and solvent relaxation of a Nile red-based phase-sensitive fluorescent membrane probe*. 2014. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2014.04.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308414000516>
- [75] SCHWILLE, P. a E. HAUSTEIN. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications*. Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Germany, b.r.
- [76] KUBITSCHKE, U. *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 978-3-527-67160-1.
- [77] ENDERLEIN, J. *Fluorescence correlation spectroscopy (IUPAC Technical Report)*. 2013. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-11-17. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2013.85.issue-5/pac-rep-11-11-17/pac-rep-11-11-17.xml>
- [78] ARBOUR, T. J. a J. ENDERLEIN. Application of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy to microfluidic flow-velocity measurement. *The Royal Society of Chemistry, Lab Chip*. 2010. DOI: 10.1039/b924594d. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b924594d>
- [79] DERTINGER, T., V. PACHECO a I. VON DER HOCHT. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007. DOI: 10.1002/cphc.200600638. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200600638>
- [80] MÜLLER, C., K. WEIß, W. RICHTERING, A. LOMAN a J. ENDERLEIN. Calibrating Differential Interference Contrast Microscopy with dual-focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Optical Society of America*. 2008. DOI: 10.1364/OE.16.004322. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-16-6-4322>
- [81] MÜLLER, C., A. LOMAN, W. RICHTERING a J. ENDERLEIN. Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy of Colloidal Solutions: Influence of Particle Size. *J. Phys. Chem. B*. American Chemical Society, 2008. DOI: 10.1021/jp802280u. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp802280u>

- [82] GOOSSENS, K., M. PRIOR, V. PACHECO, D. WILLBOLD, K. MÜLLEN, J. ENDERLEIN, J. HOFKENS a I. GREGOR. Accurate Diffusion Coefficients of Organosoluble Reference Dyes in Organic Media Measured by Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Acs Nano*. American Chemical Society, 2015. DOI: 10.1021/acsnano.5b02371. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.5b02371>
- [83] LOMAN, A., I. GREGOR, Ch. STUTZ, M. MUND a J. ENDERLEIN. Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*. The Royal Society of Chemistry and Owner Societies, 2010. DOI: 10.1039/b9pp00029a. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B9PP00029A>
- [84] MAFFRE, P., K. NIENHAUS, F. AMIN, W. PARAK a G. NIENHAUS. Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2011. DOI: 10.3762/bjnano.2.43. Dostupné také z: <http://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/2/1/43>
- [85] WEIß, K. a J. ENDERLEIN. Lipid Diffusion within Black Lipid Membranes Measured with Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *ChemPhysChem*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012. DOI: 10.1002/cphc.201100680. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.201100680>
- [86] MÜLLER, C., K. WEIß, A. LOMAN, J. ENDERLEIN a W. RICHTERING. Remote temperature measurements in femto-liter volumes using dual-focus-Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Lab Chip*. The Royal Society of Chemistry, 2009. DOI: 10.1039/b807910b. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b807910b>
- [87] MÜLLER, C. a W. RICHTERING. Sealed and temperature-controlled sample cell for inverted and confocal microscopes and fluorescence correlation spectroscopy. *Colloid Polymer Science*. Springer, 2008. DOI: 10.1007/s00396-008-1901-3. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-008-1901-3>
- [88] LEHMANN, S., S. SEIFFERT a W. RICHTERING. Spatially Resolved Tracer Diffusion in Complex Responsive Hydrogels. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 2012. DOI: 10.1021/ja306808j. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja306808j>

- [89] KORLANN, Y., T. DERTINGER, X. MICHALET, S. WEISS a J. ENDERLEIN. Measuring diffusion with polarization-modulation dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Optics Express*. Optical Society of America, 2008. DOI: 10.1364/OE.16.014609. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-16-19-14609>
- [90] HOLUBOVÁ, A. *Použití difúzních technik ve studiu hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. Bakalářská práce. Vedoucí práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|--------------------|--|
| 2f-FCS | dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie |
| A1 | autokorelační funkce prvního ohniska |
| A2 | autokorelační funkce druhého ohniska |
| a.u. | libovolné jednotky |
| CAC | kritická agregační koncentrace |
| CAS | registrační číslo |
| CD44 | specifický receptor pro hyaluronan |
| CEC | kritická elektrolytická koncentrace |
| CMC | kritická micelární koncentrace |
| CTA+ | tenzidový anion |
| CTAB | cetyltrimethylamonium bromid |
| č. š. | číslo šarže |
| DIC | diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| FCS | fluorescenční korelační spektroskopie |
| fl | femtolitr |
| HAS1, HAS2, HAS3 | hyaluronansyntáza |
| Hya | hyaluronan |
| MDF | molekulová detekční funkce |
| nmol | nanomol |
| NR | nilská červeň |
| PIE | excitační režim |
| pmFCS | polarizační modulační dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie |
| PSF | rozptylová funkce |
| RHAMM | specifický receptor pro hyaluronan |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného |
| SPAD | označení detektorů |
| TCSPC | jednotka s časově rozlišeným čítáním fotonů |
| X12 | kroskorelační funkce mezi ohnisky |
| X21 | kroskorelační funkce mezi detektory |
| c | koncentrace |
| $C(\mathbf{r}, t)$ | koncentrace molekul v určité pozici \mathbf{r} a čase t |
| D | difúzní koeficient |
| $F(t)$ | intenzita fluorescence v čase |
| G_{AF} | autokorelační funkce |
| G_{inf} | autokorelační funkce když $\tau \rightarrow \infty$ |
| G_{KF} | kroskorelační funkce |
| h | poloměr pinhole dělený zvětšením objektivu |
| k | Boltzmannova konstanta |

| | |
|--------------------------------|---|
| k_{nr} | rychlostní konstanta |
| M | molekulová hmotnost |
| n | index lomu prostředí |
| N | počet částic |
| Q | kvantový výtěžek |
| r | hydrodynamický poloměr |
| R_0 | parametr detekčního objemu |
| S_0 | základní stav molekuly |
| S_1 | první excitovaný singletový stav molekuly |
| S_2 | druhý excitovaný singletový stav molekuly |
| T | podíl částic nacházející se v tripletním stavu (kapitola 2.6.3) |
| T | teplota (kapitola 3.4.2.1) |
| T_1 | první excitovaný tripletový stav molekuly |
| T_2 | druhý excitovaný tripletový stav molekuly |
| $U(\mathbf{r})$ | molekulová detekční funkce |
| V_{ef} | efektivní objem |
| w_0 | parametr detekčního objemu |
| w_r, w_z | rozměry detekčního objemu v laterální a axiální pozici |
| $w(z)$ | modelový parametr značící poloměr konfokálního objemu |
| $W(0)$ | středová laserová intenzita |
| $W(\mathbf{r})$ | laserová intenzita v určité pozici |
| $\overline{W(\mathbf{r})}$ | normalizovaná rozptylová funkce |
| $\hat{\mathbf{x}}$ | jednotkový vektor podél osy x |
| $X_{\text{triplet}}(\tau)$ | dynamika tripletního stavu |
| γ_{FCS} | geometrický faktor |
| Γ | rychlostní konstanta |
| δ | okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty |
| ε | molekulární jas |
| $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ | faktory spojené s excitační silou a detekční účinností |
| η | viskozita |
| ϑ | vzdálenost Nomarského hranolu |
| κ | excentricita detekčního objemu |
| $\kappa(z)$ | modelový parametr značící excentricitu konfokálního objemu |
| λ_{em} | vlnová délka emise |
| λ_{ex} | vlnová délka excitace |
| ρ | příspěvek difúzní částice |
| τ_D | difúzní čas |
| τ_{triplet} | relaxační čas tripletu |
| $\langle \rangle$ | průměrná hodnota |