



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**FLUORESCENČNÍ SONDY PRO STUDIUM VLASTNOSTÍ
HYDROGELOVÝCH SYSTÉMŮ**

FLUORESCENCE PROBES TO STUDY THE PROPERTIES OF HYDROGEL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jakub Máčala

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1208/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Jakub Máčala**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Fluorescenční sondy pro studium vlastností hydrogelových systémů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na způsob přípravy fázově separovaných hydrogelů s inkorporovanou fluorescenční sondou.
- 2) Charakterizovat pomocí stacionární fluorescence chování vybraných fluorescenčních sond [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina, HPTS (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina) a Prodan v různých prostředích.
- 3) Připravit fázově separované hydrogely na bázi interakce polyelektrolyt-tenzid, stanovit stacionární emisní charakteristiky z hydrogelového prostředí a z prostředí obsahující jednotlivé komponenty hydrogelu.
- 4) Na základě získaných dat odhadnout lokalizaci těchto sond v hydrogelové matici a dostupné informace ze stacionární fluorescence o vlastnostech připravených gelů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Jakub Máčala
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi použití vybraných fluorescenčních sond ke studiu vlastností hydrogelových systémů. Vybranými fluorescenčními sondami byly Prodan pro studium polarity, HPTS pro studium pH prostředí a komplex platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina kvůli svým unikátním fluorescenčním vlastnostem a potenciálu například pro měření přenosu energie v hydrogelových systémech. Spektrální vlastnosti fluoroforů byly nejprve definovány ve vybraném souboru rozpouštědel o různé polaritě pomocí metody stacionární fluorescenční spektroskopie. Vlastnosti sondy HPTS byly rovněž zkoumány v pufrách o různém pH. Následně byly připraveny hydrogely na bázi hyaluronan-septonex a na bázi dextran-SDS s inkorporovaným fluorescenčními sondami. Měření stacionární fluorescence fluoroforů z prostředí hydrogelů probíhalo pomocí optických vláken fluorimetru. Bylo zjištěno, že sondy Prodan a HPTS se zdají být vhodným prostředkem ke studiu polaritě a pH hydrogelů a pravděpodobně budou moci být použity pro studium hydrogelů i dalšími technikami, jako je fluorescenční mikroskopie, zatímco komplex platiny je kvůli nízké intenzitě fluorescence a možnému zhasnutí polárním vodným prostředím nejspíše dále nepoužitelným pro další měření.

ABSTRACT

This bachelors thesis is focused on possibility of selected fluorescent probes for study of properties of hydrogel systems. Chosen probes are Prodan for polarity study, HPTS for measurement of pH of the probe environment and platinum complex [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatinum(II) for its unique fluorescence properties and potential of energy transfer studies in hydrogel systems. Spectral properties of fluorophores were defined in selected set of solvents with different polarity with steady state fluorescence spectroscopy method. Properties of HPTS probe were also tested in buffers with different pH. Subsequently, hydrogels based on hyaluronan-septonex and dextran-SDS with incorporated fluorescence probes were prepared. Steady state fluorescence measurement of fluorophores from hydrogel were made using fluorimeter optical fibres. It was found, that probes Prodan and HPTS are suitable for study of polarity and pH of hydrogels and probably they will be able to be used for study of hydrogel with other techniques, like fluorescence microscopy, however platinum complex is, due to the low fluorescence intensity and possible quenching by polar water environment, probably not suitable for other measurements.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydrogel, hyaluronan, dextran, tenzidy, Septonex, SDS, ustálená fluorescence, sondy, fluorofory, fyzikální chemie

KEYWORDS

Hydrogel, hyaluronan, dextran, surfactants, Septonex, SDS, Steady State fluorescence, probes, fluorophores, physical chemistry

MÁČALA, J. *Fluorescenční sondy pro studium vlastností hydrogelových systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 72 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, trpělivost a čas, který mi věnoval. Rovněž bych chtěl poděkovat všem kolegům z laboratoře 2002, kteří mi při vypracování této práce pomohli nebo poradili.

OBSAH

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Fluorescence	10
2.1.1	Obecné principy fluorescence.....	10
2.1.2	Jabloňského diagram	10
2.1.3	Pravidla popisující fluorescenci.....	11
2.1.4	Doba života a kvantový výtěžek fluorescence.....	12
2.1.5	Excitační a emisní spektrum	12
2.1.6	Vliv prostředí na vlastnosti fluoroforů.....	13
2.2	Fluorescenční sondy	14
2.2.1	Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)	14
2.2.2	HPTS (trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové kyseliny).....	15
2.2.3	Komplex platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina.....	16
2.3	Fluorescenční spektroskopie.....	16
2.3.1	Instrumentace pro fluorescenční spektroskopii	17
2.3.2	Využití fluorescenčních technik	18
2.4	Gely.....	18
2.4.1	Vznik gelů.....	18
2.4.2	Vlastnosti gelů	19
2.4.3	Rozdělení gelů	20
2.4.4	Využití gelů.....	20
2.5	Hydrogely	20
2.5.1	Vlastnosti a struktura	21
2.5.2	Využití hydrogelů	21
2.6	Polyelektrolyty.....	22
2.7	Hyaluronan (HyA)	22
2.7.1	Vlastnosti	23
2.7.2	Využití	23
2.8	Dextran.....	24
2.8.1	Historie.....	24
2.8.2	Struktura a využití.....	24

2.9	Tenzidy	25
2.9.1	Tvorba micelárních soustav	25
2.9.2	Micelární struktura.....	26
2.9.3	Septonex.....	26
2.9.4	SDS	27
3	Současný stav řešené problematiky	28
3.1	Práce vypracované na Fakultě chemické	28
3.2	Použité fluorescenční sondy	30
3.3	Interakce hyaluronan-tenzid	31
3.4	Hydrogely s inkorporovanou fluorescenční sondou	32
4	Experimentální část	33
4.1	Použité chemikálie	33
4.2	Příprava vzorků.....	34
4.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	34
4.2.2	Příprava pufrů	35
4.2.3	Příprava vzorků pro charakterizaci fluorescenčních sond v různých prostředích.....	36
4.2.4	Příprava hydrogelů s inkorporovanými fluorescenčními sondami	36
4.3	Použité metody	36
4.3.1	Charakterizace fluorescenčních sond v různých prostředích pomocí stacionární fluorescence.....	36
4.3.2	Stanovení fluorescenčních charakteristik vybraných sond prostředí hydrogelů	37
5	Výsledky a diskuze	39
5.1	Charakterizace vybraných fluorescenčních sond v různých prostředích	39
5.1.1	Komplex platiny	40
5.1.2	Prodan	42
5.1.3	HPTS.....	44
5.2	Měření stacionárních fluorescenčních charakteristik vybraných fluorescenčních sond z prostředí hydrogelů	50
5.2.1	Hydrogely s inkorporovaným komplexem platiny	50
5.2.2	Hydrogely s inkorporovanou sondou Prodan	53
5.2.3	Hydrogely s inkorporovanou sondou HPTS	55
5.3	Použití fluorescenční mikroskopie.....	58

6	Závěr	62
7	Seznam použitých zdrojů	64
8	Seznam použitých zkratek a symbolů	69
9	Přílohy	70

1 ÚVOD

Hydrogely jsou v několika posledních desetiletích dynamicky se rozvíjející součástí výzkumu biologických, farmaceutických a chemických věd. Jedná se o systémy tvořené polymerními řetězci spojenými uzly do trojrozměrných souvislých sítí, jejichž nejdůležitější vlastností je schopnost do své struktury vázat velké množství vody, což se promítá i do jejich názvu, jelikož hydro znamená vodný. Hydrogely skýtají mnoho možností využití. Od materiálu pro výrobu kontaktních čoček, které byly vynalezeny v polovině minulého století Otto Wichterlem a Drahoslavem Límem, přes různá další použití ve farmacii, medicíně, chemii, biologii, potravinářství, zemědělství a mnoha dalších oblastech. Dalšími důležitými vlastnostmi, souvisejícími s použitím biopolymerů jako stavebních řetězců hydrogelových systémů, jsou biokompatibilita a biodegradabilita. Tyto vlastnosti umožňují použití hydrogelů například jako nosiče léčiv pro jejich řízené uvolňování, scaffoldy pro tkáňové inženýrství nebo prostředky pro krycí materiál při hojení povrchových ran.

Dříve než je však možné hydrogel pro určitou specifickou aplikaci využít, je nutné znát jeho chemickou a fyzikálně-chemickou strukturu a vlastnosti systému, které podmiňují jeho další použití. Jedním z možných způsobů studia vlastností hydrogelů je použití technik fluorescenční spektroskopie a fluorescenčních sond. To jsou molekuly, které změnou svých spektrálních vlastností reagují na své okolní mikroprostředí a mohou tedy být využity pro jeho studium.

Cílem předložené bakalářské práce je pomocí metod ustálené fluorescence charakterizovat spektrální vlastnosti vybraných fluorescenčních sond Prodanu, HPTS a [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatiny(II), připravit hydrogely s inkorporovanými fluorescenčními sondami a pokusit se definovat pomocí fluorescenční spektroskopie vlastnosti hydrogelů, jako jsou například pH a polarita prostředí, rovněž určit lokalizaci molekul sond v hydrogelové matici a také předpovědět použitelnost vybraných fluoroforů pro možnost studia hydrogelových systémů dalšími technikami, především časově rozlišenou fluorescencí a fluorescenční mikroskopií.

Bakalářská práce navazuje na výzkum hydrogelových systémů prováděný na Fakultě chemické VUT v Brně, především na práce vzniklé pod hlavičkou výzkumné skupiny Biokol, zabývající se biokoloidní chemií, z nichž některé jsou stručně shrnuty v kapitole informující o současném stavu řešené problematiky v oblasti hydrogelů, viz kapitola 3.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

2.1.1 Obecné principy fluorescence

Jako luminescence je označován jev, při kterém dochází k emisi záření z elektronově excitovaného stavu. Pokud proběhla excitace elektronu pomocí absorpce světelného záření, nazýváme tento proces fotoluminescencí, kterou dále můžeme rozdělit na fluorescenci, fosforescenci a opožděnou fluorescenci.

Fluorescence se vyznačuje tím, že emise světelného záření probíhá ze singletového elektronového stavu, tedy stavu, při kterém mají excitovaný elektron i párový elektron v základním stavu rozdílný (opačný) spin. Následná deexcitace elektronu je tedy tzv. spinově dovolená a emise světelného záření probíhá velkou rychlostí, která se pohybuje průměrně kolem 10^8 s^{-1} , doba života excitovaného stavu se typicky rovná přibližně 10 ns. Látky vykazující schopnost fluorescence označujeme jako fluorofory, nejčastěji se jedná o organické sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb nebo o některé organokovové sloučeniny.

Oproti tomu pro fosforescenci je charakteristická emise světla z tzv. tripletového elektronového stavu, tedy stavu, kdy se spin elektronu excitovaného shoduje se spinem párového elektronu v základním stavu. Deexcitace je tedy v tomto případě tzv. spinově zakázaná a probíhá pomaleji, rychlostí přibližně $10^3\text{--}10^0 \text{ s}^{-1}$, doba života excitovaného stavu se poté pohybuje v řádech milisekund až sekund. Fosforescenční spektrum je posunuto k vyšším vlnovým délkám, než je tomu u fluorescence, a to z toho důvodu, že energie nejnižší vibrační hladiny u tripletového stavu T_1 je nižší, než je tomu u singletového stavu S_1 .

Opožděná fluorescence nastává v tom případě, když excitovaný elektron přejde ze singletového na tripletový stav a následně se vrátí zpět tzv. reverzním mezisystémovým přechodem. Tento proces může nastat jen v tom případě, když je rozdíl v energii singletového a tripletového stavu malý a doba života tripletového stavu T_1 je dostatečně dlouhá. Tato emise bývá tepelně aktivovaná, tedy její účinnost stoupá se zvyšující se teplotou. Emisní vlastnosti se nijak neliší od normální fluorescence [1, 2].

2.1.2 Jablůnskiho diagram

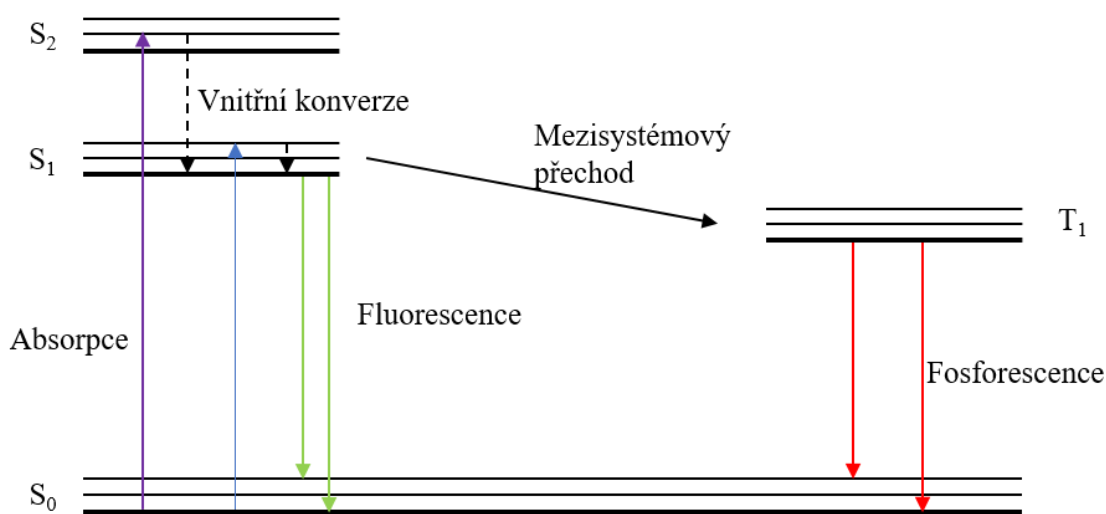
Pro schématický popis procesů probíhajících mezi absorpcí a emisí světelného záření molekulou fluoroforu bývá používán Jablůnskiho diagram, ve kterém jsou znázorněny jak zářivé přechody mezi základními a vyššími elektronovými stavy, tak přechody tzv. nezářivé, mezi které řadíme vibrační relaxaci, vnitřní konverzi a mezisystémové přechody (viz. obrázek 1).

Po absorpci světla trvající asi 10^{-15} s je fluorofor nejčastěji excitován ze základního stavu S_0 na nějakou vyšší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 nebo S_2 . Poté téměř vždy procesem vibrační relaxace dojde za uvolnění tepelné energie do okolí k relaxaci na nejnižší vibrační hladinu S_1 , čímž se systém stabilizuje. Vibrační relaxace trvá přibližně 10^{-12} s . Následuje tedy deexcitace elektronů ze základní vibrační hladiny excitovaného stavu S_1 na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu S_0 ,

následně je opět pomocí vibrační relaxace dosaženo stabilizace systému. Proces fluorescence probíhá typicky v řádu 10^{-8} s.

Dalším procesem, kterým může molekula v excitovaném stavu S_1 projít je změna spinu, tedy přeměny singletového excitovaného stavu na stav tripletový T_1 . Tento nezářivý proces se označuje jako mezisystémový přechod a vede k jevu fosforescence.

Molekula také může nezářivě přejít až na základní elektronový stav S_0 , a to spojením vnitřní konverze, která je procesem, při němž molekula přechází ze základní vibrační hladiny daného excitovaného stavu na vyšší vibrační hladinu nižšího stavu, a vibrační relaxace [1, 2].



Obrázek 1: Jablonského diagram [1]

2.1.3 Pravidla popisující fluorescenci

Fluorescence je popsána několika základními pravidly. Nejdůležitější z nich je pravděpodobně Stokesovo pravidlo, někdy označováno jako Stokesův posun. Toto pravidlo nám říká, že vlnová délka světla emitovaného by měla být vždy vyšší než vlnová délka světla absorbovaného. To je způsobeno tím, že elektron po své excitaci na vyšší elektronový stav ztrácí část své energie ve formě tepla při vnitřních konverzích směřujících k základní vibrační hladině excitovaného stavu, ze kterého poté probíhá deexcitace na stav základní [2].

Dalšími pravidly popisujícími jev fluorescence jsou pravidlo Kashova a Vavilovovo. Kashovo pravidlo nám říká, že fluorescenční emisní spektrum obvykle není závislé na vlnové délce světla, kterou byl fluorofor excitován, což je zapříčiněno tím, že při excitaci do vyššího elektronového nebo vibračního stavu je následně přebytečná energie rychle uvolněna (10^{-12} s) a fluorofor se před deexcitací na základní stav nachází v nejnižší vibrační hladině elektronového stavu S_1 . Vavilovovo pravidlo vychází z Kashova a určuje, že kvantový výtěžek fluorescence je obecně nezávislý na excitační vlnové délce [1].

2.1.4 Doba života a kvantový výtěžek fluorescence

Doba života a kvantový výtěžek fluorescence patří mezi nejdůležitější charakteristiky fluoroforu. Kvantový výtěžek je číslo označující poměr množství fotonů vyzářených k množství fotonů absorbovaných molekulou. Fluorofory s velkým kvantovým výtěžkem, blížícím se k hodnotě jedna, vykazují nejjasnější emisi záření, tedy většina jimi absorbované světelné energie je následně zářivě emitována. Hodnota kvantového výtěžku je však vždy menší kvůli Stokesovským ztrátám. Kvantový výtěžek může být vypočten podle rovnice:

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

kde Γ je rychlost zářivého přechodu a k_{nr} je rychlost nezářivého přechodu.

Doba života excitovaného stavu fluoroforu je definována jako doba, kterou průměrně molekula setrvává v excitovaném stavu. Jinak může být také definována jako převrácená hodnota rychlostní konstanty zániku excitovaného stavu, pro singletový excitovaný stav je tedy doba života ovlivněna vnitřní konverzí, mezisystémovými přechody a zářivými procesy. Doba života excitovaného stavu τ se vypočte jako:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Typicky se rychlostní konstanta zániku excitovaného stavu S_1 pohybuje okolo 10^8 s^{-1} a doba života fluorescence je pak v řádu 10 ns, nicméně jsou známy fluorofory s dobami života fluorescence v rozmezí od pikosekund po stovky nanosekund [1, 3].

2.1.5 Excitační a emisní spektrum

Excitační a emisní spektrum patří mezi další důležité charakteristiky každého fluoroforu, díky kterým můžeme sledovat závislost intenzity fluorescence na vlnové délce. Excitační spektrum představuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce budícího záření při konstantní vlnové délce záření emitovaného. Můžeme zde pozorovat jistou podobnost s absorpčním spektrem molekuly, které představuje závislost množství absorbovaného záření na vlnové délce. Lze tedy říci, že excitační spektrum je nepřímým měřením procesu absorpce.

Emisní spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při neměnné délce excitačního záření. Za vlnovou délku budícího záření zpravidla volíme tu, při které molekula vykazuje nejvyšší intenzitu fluorescence, tedy excitační maximum. U emisního spektra lze pozorovat posun k vyšším vlnovým délkám, tedy již zmiňovaný Stokesův posun, způsobený uvolněním energie ve formě tepla při vibrační relaxaci. Různé fluorofory vykazují různě velký Stokesův posun, což je dáno změnami v geometrii molekul při excitaci. Čím větší je změna v geometrii, tím je větší míra vibrační excitace, která poté vede k velkému množství vibračních relaxací v základním i excitovaném stavu, a tedy i k většímu Stokesovu posunu. Toho lze využít ve fluorescenční spektroskopii nebo mikroskopii, jelikož u molekul s velkým Stokesovým posunem je jednodušší odfiltrovat excitační záření od toho fluorescenčního. Nicméně velký posun je spojen s větším vyzářením energie ve formě tepla, čímž může docházet k zahřívání vzorku a rychlejší degradaci fluoroforu.

Lze si také všimnout, že emisní spektrum často připomíná zrcadlový obraz absorpčního spektra, především v části odpovídající prvnímu excitovanému stavu S_1 . Za touto symetrií stojí fakt, že procesu absorpce i emise záření se účastní stejné přechody a podobné vibrační hladiny stavů S_0 a S_1 [3, 4].

2.1.6 Vliv prostředí na vlastnosti fluoroforů

Excitační i emisní spektra, stejně jako další vlastnosti, jsou citlivé na lokální prostředí, ve kterém se fluorofor nachází. Parametry prostředí jako např. polarita, pH nebo interakce s jinými molekulami mohou ovlivnit fluorescenční spektra, čehož bývá využíváno pro studium různých systémů a procesů pomocí fluorescenčních sond [4].

Organické fluorofory jsou často tvořeny velkým počtem atomů a vykazují rozsáhlé vibrační spektrum, fluorofor má tedy velké množství možných, energeticky rozdílných přechodů na vibrační hladiny základního stavu po excitaci vhodnou vlnovou délkou. Díky interakcím mezi solvatačním obalem a fluoroforem jsou při pokojové teplotě tyto vibrační přechody značně rozšířené. Protože elektronová distribuce se při excitaci mění, pozměňují se také vazebné síly a dipólové momenty. Pro molekuly rozpouštědla tedy nastává nová rovnovážná konfigurace, které se za pokojové teploty přizpůsobí během krátkého okamžiku. Kinetika procesu dielektrické relaxace molekul rozpouštědla může být sledována pomocí časově závislého posunu v emisním spektru, jenž může být rozlišen v řádu pikosekund. V případě, že je fluorescenční molekula excitována do více polárního excitovaného stavu, elektrická polarizace rozpouštědla se okamžitě přizpůsobí novému rozmístění elektronů v molekule. Orientační polarizace molekul rozpouštědla se však při excitaci nezmění, a proto není v rovnováze s excitovanou molekulou. Z toho důvodu musí molekula rozpouštědla provést dielektrickou relaxaci, dokud není dosaženo rovnovážné konfigurace odpovídající excitovanému stavu. Ke stejnému jevu dochází při fluorescenční emisi, kdy orientační polarizace zůstává při téměř okamžitém optickém přechodu neměnná. Fluorescenční spektrum prochází časově závislým červeným posunem vyjádřeným funkcí $C(t)$:

$$C(t) = \frac{v(t) - v(\infty)}{v(0) - v(\infty)}, \quad (3)$$

kde $v(0)$, $v(t)$ a $v(\infty)$ představují frekvence maxima fluorescence ihned po excitaci, v čase t , a po úplném dokončení relaxace.

Při monoexponenciální relaxaci rozpouštědla můžeme u časově rozlišených měření při různých vlnových délkách detekce pozorovat, že při kratších detekčních vlnových délkách je fluorescence detekována především z molekul, jejichž solvatační obal ještě není zcela relaxován. U vyšších detekčních vlnových délek je oproti tomu fluorescence řízena těmi molekulami, jejichž solvatační obal je zcela relaxovaný. Tím pádem se doba života fluorescence fluoroforu vždy pohybuje mezi hodnotami pro molekuly s kompletně relaxovaným solvatačním obalem a hodnotami pro molekuly s neúplnou relaxací obalu.

Lze také pozorovat změnu dipólového momentu způsobenou odlišnými vlastnostmi základního a excitovaného stavu, která vyúsťuje v posun v absorpčním a emisním spektru závislý na polaritě rozpouštědla. Tento jev se nazývá solvatochromismus. Aby byl solvatochromní efekt kompletně popsán, je třeba brát v potaz i index lomu n a dielektrickou konstantu ϵ_s rozpouštědla, stejně jako změnu dipólového momentu fluoroforu při excitaci.

Lippertovou rovnicí

$$v_{abs} - v_{em} = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{cha^2} \left[\frac{2(\epsilon_s - 1)}{(2\epsilon_s - 1)} - \frac{2(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)} \right] \quad (4)$$

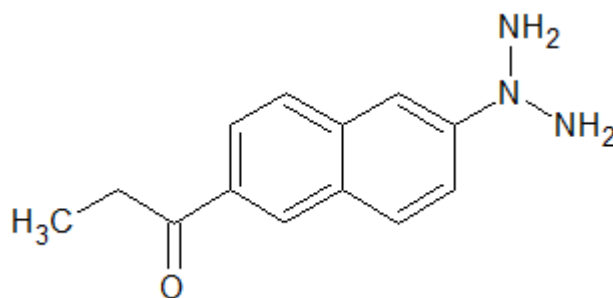
může být Stokesův posun vyjádřen pomocí funkce vlastností rozpouštědla (n, ϵ_s), dipólového momentu fluoroforu v základním stavu μ_g , v excitovaném stavu μ_e , kde c značí rychlost světla, h Plankovu konstantu, a a Onsagerův radius fluoroforu v určitém rozpouštědle [5, 6, 7].

2.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční molekuly jsou často používány z toho důvodu, že jejich určité, převážně emisní charakteristiky, mohou být ovlivněny různými vlastnostmi prostředí, čehož může být použito právě pro studium těchto vlastností, jako například polarita, pH či viskozita. Takovéto fluorofory označujeme jako fluorescenční sondy. Jejich výhodou je vysoká citlivost, specifita, rychlost odezvy a relativně jednoduché použití. K navázání na studovaný systém používají sondy převážně nekovalentní interakce a využívají svého hydrofilního, hydrofobního či amfifilního charakteru. Kromě fluorescenční spektroskopie nacházejí fluorescenční sondy velké využití ve fluorescenční mikroskopii, kde je jich využíváno například pro zobrazování a studium buněčných struktur a různých biomakromolekul [2, 8].

2.2.1 Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)

Prodan, stejně jako některé jiné deriváty naftalenu (např. Laurdan) řadíme mezi lipofilní fluorescenční sondy často používané pro studium membrán a biomakromolekul. Jeho klíčovou a využívanou vlastností je závislost fluorescenčních charakteristik na polaritě prostředí. Díky tomu, že 2-dimethylamino skupina Prodanu (viz. Obrázek 2) se nachází na rozmezí mezi fosfolipidy a vodným prostředím, je Prodan vhodnou sondou také pro studium dynamických a strukturních vlastností makromolekulárních povrchů, přestože steady-state spektra Prodanu v roztocích biomolekul jsou spektra složené a promítá se do nich fluorescence z více prostředí [9].



Obrázek 2: Strukturální vzorec prodanu [9]

Prodan vykazuje neobvykle velký Stokesův posun, jenž je závislý na polaritě prostředí, což souvisí s velkým zvýšením hodnoty dipólového momentu v excitovaném stavu (18–20 D), oproti stavu základnímu (2–2,5 D). Pokud se sonda nachází v hydrofilním prostředí, dochází k velkému přenosu energie z excitovaného stavu Prodanu na okolní

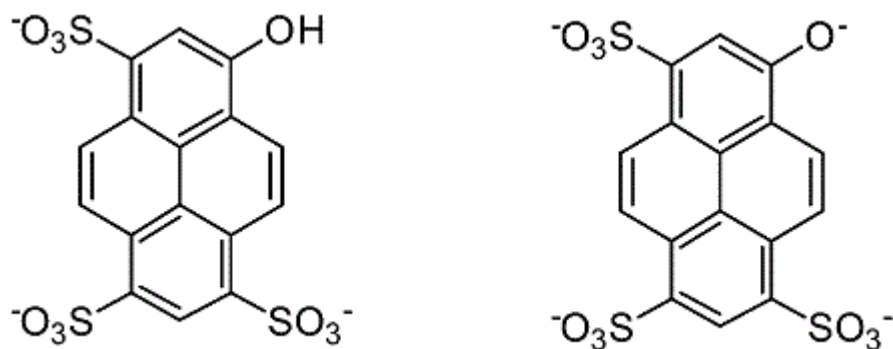
molekuly rozpouštědla. Tato ztráta energie poté vyústí ve významný posun emisního maxima směrem k červené oblasti spektra. S klesajícím hydrofilním charakterem prostředí se zmenšuje míra přenesené energie z excitovaného stavu na molekuly rozpouštědla, a tedy významně klesá i posun maxima emisního spektra [10]. Celková velikost tohoto solvatochromního posunu maxima emise může být až 130 nm, sahá od maxima 401 nm v nepolárním prostředí cyklohexu, až po maximum 531 nm v polárním prostředí vody [11].

V nepolárních a polárních aprotických prostředích můžeme pozorovat jednu dobu života Prodanu (pro cyklohexan jako nepolární rozpouštědlo přibližně 0,2 ns, pro acetonitril 3,3 ns), zatímco v polárních protických prostředích vykazuje dvě doby života (2 ns z 75% a 3,4 ns z 25%). Kratší doba života je způsobena tvorbou komplexu rozpuštěné látky s rozpouštědlem vytvořením vodíkových vazeb [11].

2.2.2 HPTS (trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové kyseliny)

Derivát pyrenu HPTS je silně fluoreskující, kvůli přítomnosti tří sulfonových skupin velmi dobře ve vodě rozpustná, fluorescenční sonda (viz. obrázek 3). Díky obsahu fenolické hydroxylové skupiny ve své struktuře se tato sonda vyznačuje citlivostí na pH prostředí. Hodnota pKa HPTS se mění od $\approx 7,7$ v základním stavu až po $\approx 0,6$ ve stavu excitovaném, ve kterém se tedy HPTS nachází v disociované formě. Molekula podstupuje tzv. intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu (ESPT). ESPT reakce je velmi citlivá k parametrům ovlivňující stabilizaci nebo solvataci disociovaného protonu, stejně jako konjugované báze a je proto citlivá také k vlastnostem okolního mikroprostředí, které tyto děje ovlivňují. Toho bývá využíváno při zkoumání těchto vlastností, například při studiu povrchových struktur a uspořádání biopolymerů.

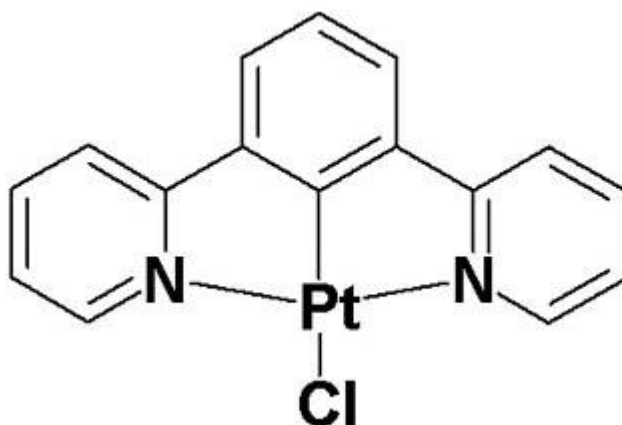
Mimo to je HPTS používáno jako pH sonda. pH prostředí ovlivňuje absorpční charakteristiky HPTS, v absorpčním spektru lze rozlišit dva píky s maximy v 404 nm a 454 nm. První pík odpovídá protonované formě HPTS (ROH), druhý pak odpovídá konjugované bázi (RO⁻). Změny v pH pak vyústí ve změny hodnoty absorbance na pozicích těchto píků, což je promítnuto také do změny ve fluorescenčním excitačním spektru [12], [13].



Obrázek 3: Struktura HPTS, protonovaná (vlevo) a deprotonované formě [14]

2.2.3 Komplex platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina

Nábojově neutrální komplex dvojmocné platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina byl vyvinut především pro časově rozlišenou emisní zobrazovací mikroskopii (TREM) jako prostředek pro zobrazování a mapování živých buněk a to díky svým vlastnostem, jako je fotochemická stabilita, vysoký kvantový výtěžek a dlouhá doba života v řádu mikrosekund. Komplex nejvíce absorbuje mezi 350 a 380 nm a v roztocích za laboratorní teploty vykazuje fluorescenci v rozmezí 480–600 nm. Se zvětšující se polaritou prostředí sonda vykazuje mírný posun ke kratším vlnovým délkám [15].



Obrázek 4: Strukturální vzorec komplexu platiny [15]

2.3 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopii lze rozdělit na dva typy měření: měření v ustáleném stavu, tzv. steady-state a časově rozlišené měření, tzv. time-resolved. Steady-state měření se vyznačuje tím, že je vzorek v kyvetě konstantně excitován světelným zářením a je zaznamenávána intenzita emise a excitační či emisní spektrum. Jelikož fluorescence probíhá v řádu nanosekund, ustáleného stavu je dosaženo prakticky ihned po prvním ozáření vzorku paprskem světla.

Časově rozlišené měření je používáno k měření poklesu intenzity nebo poklesu anizotropie. Vzorek je exponován krátkému světelnému pulsu, jehož délka je kratší než doba života fluoroforu. Pokles intenzity v čase je poté sledován vysokorychlostním detektorem schopným měření na nanosekundové úrovni. Intenzita steady-state měření může být vyjádřena jako průměrná hodnota časově rozlišených jevů poklesu intenzity a souvisí tedy s dobou života fluoroforu. Intenzita je proto dána rovnicí:

$$I_{SS} = \int_0^{\infty} I_0 e^{-t/\tau} dt = I_0 \tau, \quad (5)$$

kde I_0 je parametrem, který je závislý na koncentraci fluoroforu a parametrech měřících přístrojů, τ je dobou života. Z rovnice lze vyvodit, že intenzita je době života fluoroforu přímo úměrná [1].

2.3.1 Instrumentace pro fluorescenční spektroskopii

Pro měření fluorescenčních excitačních a emisních spekter se používá přístroj zvaný spektrofluorimetr, skládající se z několika základních a nepostradatelných komponent (obrázek 5).

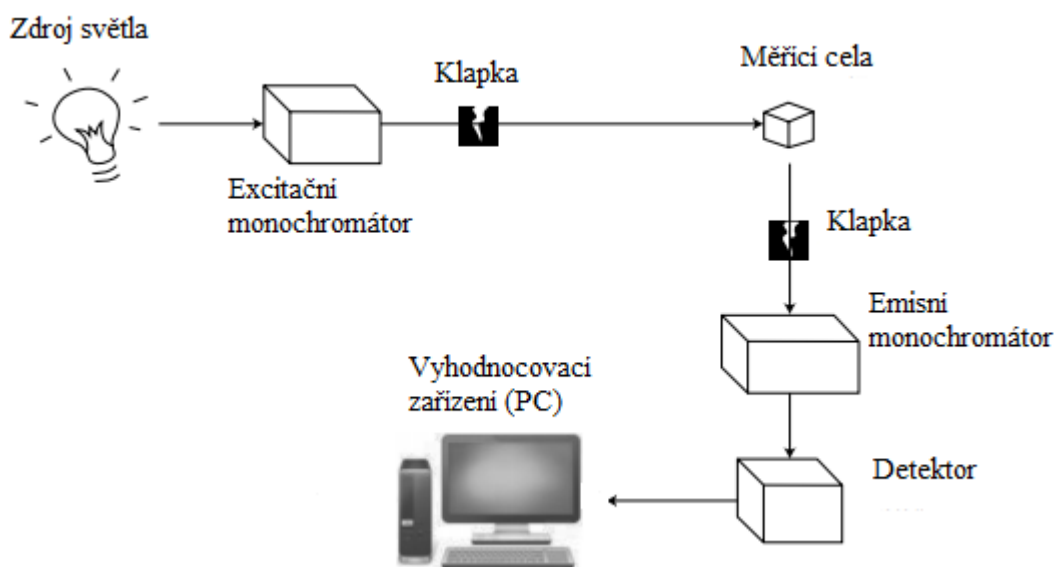
Jako zdroj excitačního záření běžně slouží xenonová lampa. Její výhodou je vysoká intenzita vyzařovaného světla ve velkém rozsahu vlnových délek převyšujících 250 nm. Důležité je, aby byl světelný zdroj schopen vyzařovat konstantní počet fotonů při všech vlnových délkách.

Dalším prvkem je excitační monochromátor. Monochromátory slouží k vybrání určité vlnové délky z polychromatického záření. Toho bývá docíleno nejčastěji pomocí optické difrakční mřížky. Monochromátory jsou většinou opatřeny nastavitelnou vstupní i výstupní štěrbinou, jejíž šířka ovlivňuje množství prošlého záření a rozlišení. Širší štěrbina je schopna propustit větší množství záření, ale zároveň se snižuje rozlišení měření.

Následuje měrná cela s kyvetou. Typicky jsou používány křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm. Kyvetové prostory bývají často schopny temperování na určitou teplotu.

V kolmém směru k excitačnímu paprsku se nachází emisní monochromátor, pracující na obdobném principu jako monochromátor excitační. Umožňuje vybrat určitou vlnovou délku emitovaného záření, která dále prochází na detekční zařízení.

Nejčastěji používanými detektory jsou fotonásobiče. Fotonásobič funguje jako zdroj proudu, který odpovídá na každý individuální foton a záření dopadené na detektor může být detekováno ve formě průměrného signálu nebo mohou být počítány jednotlivé fotony a signál je poté převeden na digitální a dále zpracováván a ukládán v počítači [1].



Obrázek 5: Schéma spektrofluorimetru [16]

2.3.2 Využití fluorescenčních technik

Fluorescenční spektroskopie je pro své široké možnosti uplatnění oblíbenou technikou především v biologických a chemických oborech. Měření fluorescenčních charakteristik nám může poskytnout informace o velkém množství procesů, které mohou molekuly podstupovat, jako například interakce rozpouštědel s fluorofory či lokalizace fluoroforu ve struktuře makromolekuly, rotační difuze biomolekul, informace o vazebných a konformačních interakcích, pH a polaritě prostředí a mnoho dalších [1].

2.4 Gely

Pod pojmem gel si můžeme představit systém tvořený trojrozměrnou sítí a vytvářející souvislou strukturu, která prochází celým objemem disperzního prostředí. Za spojité tedy lze považovat nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. Disperzní podíl obvykle tvoří částice koloidních rozměrů o velikosti 1–500 nm. Částice disperzního prostředí nejsou schopné se disperzním prostředím nezávisle pohybovat a jsou schopny vykazovat pouze vibrační pohyb. Síly spojující částice, a tedy tvořící prostorovou síť, mohou být jak chemického, tak fyzikálního charakteru, podle čehož můžeme gely dělit na chemicky síťované a fyzikálně síťované. Přestože je disperzním prostředím kapalina, vykazují gely v důsledku spojení částic vlastnosti charakteristické pro tuhý stav látky [17, 18]. Někdy bývají gely nazývány pojmem lyogely, soustavy s disperzním prostředím jako kapalinou. Po odstranění disperzního prostředí je gel označován jako xerogel [19].

2.4.1 Vznik gelů

Vznik gelu označujeme jako gelaci. Při tomto procesu dochází k interakcím mezi polymerem a disperzním prostředím vedoucím ke vzniku spojů mezi makromolekulami. Pokud je těchto spojů (uzlů) dostatečný počet, vytvoří se v celém objemu disperzního prostředí trojrozměrná makromolekulární síť tvořící strukturu gelu. Pokud spoje vzniknou v důsledku chemické reakce, mají vzniklé makromolekulární sítě kovalentní povahu spojů a mluvíme o kovalentně síťovaných gelech. Druhým způsobem vzniku spojů je působení mezimolekulárních fyzikálních (nekovalentních) interakcí, jakou jsou například van der Waalovy síly, dipolární síly nebo vodíkové můstky. Takto vzniklé gely označujeme jako fyzikálně síťované gely [19].

Proces gelace může být ovlivňován několika parametry, například teplotou, pH a koncentrací. Zvýšení teploty často brání gelaci, jelikož v závislosti na zvyšování teploty roste i tepelný pohyb makromolekul v roztoku, což způsobuje pokles množství vazeb mezi makromolekulami a dobu jejich života. Zvyšující se koncentrace naopak napomáhá tvorbě gelu, protože pravděpodobnost srážek mezi makromolekulami nebo jejich částmi a zvětšuje se počet vazeb vznikajících v jednotce objemu gelu. Dalším parametrem je hodnota pH roztoku, gelace probíhá nejlépe při pH v blízkosti izoelektrického bodu makromolekuly [17].

Při tvorbě kovalentně síťovaných gelů vznikají vazby mezi makromolekulami polymerů buď při kondenzační polymeraci jako výsledek nelineární kondenzace nebo při adiční polymeraci, kdy součástí gelatinizace je řetězová reakce, v jejímž průběhu volný radikál reaguje s dvojnou vazbou. Další možností je vznik spojů mezi hotovými polymery, kdy dojde k zesíťování v důsledku aktivace reaktivních míst na řetězci

polymeru pomocí změn podmínek v roztoku podporujících tvorbu sítě nebo po přidání síťovacího činidla. Kovalentně síťované gely vykazují pevnou strukturu a zpětná změna na roztok by byla možná pouze rozrušením chemických vazeb. Výsledný produkt by se však lišil od původního polymeru, protože by pravděpodobně došlo k porušení i jiných vazeb, než jen těch vzniklých při tvorbě gelu [17].

Proces vzniku fyzikálně síťovaného gelu probíhá tím způsobem, že se jednotlivé části makromolekulárních řetězců sdružují do útvarů, které plní funkci uzlů, pomocí fyzikálních sil, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce a další. Počátek tohoto procesu je způsoben snížením afinity vysokomolekulární látky k rozpouštědлу, v důsledku např. snížení teploty nebo přídavku špatného rozpouštědla. Fyzikálně vytvořené uzly zpravidla vykazují větší rozměry než uzly kovalentní, proto se někdy označují jako uzlové nebo spojné oblasti. Makromolekulární řetězce mohou být díky své velikosti někdy začleněny i do více uzlových oblastí najednou, po délce řetězce se pak začleněné části střídají s volnými úseky, které si zachovávají svou původní ohebnost a tepelný pohyb. Spojování částí makromolekuly do uzlových oblastí můžeme popsat jako asociaci, často podmíněnou přechodem do šroubovitě konformace, nebo jindy jako nedokonale provedenou fázovou separaci, která nemohla být dokončena z důvodů specifických pro makromolekulární soustavy. V druhém případě je uzlová oblast submikroskopickou fází, která je podle podmínek oblastí amorfní nebo krystalickou [17, 19].

Fyzikálních uzlů existuje celá řada typů lišících se od sebe svým vznikem a vlastnostmi, především pevností a dobou života. Oproti kovalentně síťovaným gelům nemůžeme u gelů fyzikálně síťovaných zanedbat fakt, že jejich uzly mohou v čase zanikat a opět vznikat v jiné konformaci, taktéž při působení mechanických sil na gel se mohou uzly rozpadat. Na životnosti a pevnosti uzlových oblastí pak závisí celá řada vlastností gelů, především reologických. Gely obsahující ve své struktuře pevné spoje vykazují podobné chování jako kovalentně síťované gely, gely se slabými uzly vlivem většího napětí přecházejí ve velmi viskózní kapalinu vlivem narušení uzlů. Po ponechání systému v klidu však zpětně přechází na gel [17, 19].

2.4.2 Vlastnosti gelů

I přes přítomnost kapalného disperzního prostředí můžeme pozorovat u gelů některé vlastnosti charakteristické pro pevný stav hmoty. Gel například odolává tečnému napětí, a to až do určité hodnoty, pod kterou jeho chování připomíná elastické tuhé těleso. Gely obsahující uzly kovalentní povahy, které mají v jednotce objemu obsažený velký počet vazeb, vykazují značnou elasticitu. Se zvětšujícím se počtem vazeb mezi řetězci polymeru klesá možnost změny tvaru makromolekuly a struktura gelu je rigidnější. Některé reverzibilní i ireverzibilní fyzikálně síťované gely se vyznačují vlastností zvanou tixotropie. V případě, že jsou síly tvořící síť disperzních částic v gelu slabé, je možné působením mechanické energie převést gel na sol, protože se slabé vazby mezi disperzními částicemi poruší. Tento proces je vratný a po ponechání solu v klidovém stavu se vazby obnoví a znovu dojde ke gelaci.

Elektrická vodivost gelů zůstává téměř stejná jako v odpovídajícím solu díky obsahu disociovaných nízkomolekulárních elektrolytů v disperzním prostředí. Stejně tak i difuzivita nízkomolekulárních látek v prostředí gelu zůstává na téměř stejné úrovni, přestože se vznikem gelu prudce vzrůstá viskozita systému. Díky síťovitému charakteru

struktury navíc není difuzivita nízkomolekulárních iontů téměř ovlivněna prouděním ani tepelnými konvekcemi [20]. U větších molekul, jejichž rozměry jsou srovnatelné se vzdálenostmi mezi nejbližšími uzly síťovité prostorové struktury, však dochází ke snížení difuzní a elektroforetické pohyblivosti [19]. U čerstvých gelů, reverzibilních i ireverzibilních, dochází k některým samovolným jevům, jelikož se systém nenachází ve své termodynamické rovnováze. Nastává tzv. stárnutí gelu, při kterém roste počet styčných bodů a následně se celá trojrozměrná síťovitá struktura smrští a s ní i celý objem gelu. Z toho důvodu je z gelu vytlačena část kapaliny, pro kterou už není ve struktuře místo. Proces vytékání disperzního prostředí z gelu se nazývá synergeze [20].

2.4.3 Rozdělení gelů

Gely můžeme dělit podle několika hledisek. Podle chování ve vysušeném stavu je dělíme na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní gely při vysoušení zmenší svůj objem a přechází v kompaktní xerogel, jenž je schopen přijmout zpět disperzní prostředí a vrátit se do původního stavu tzv. bobtnáním. Tyto vlastnosti jsou typické pro makromolekulární gely. Reverzibilní gely dále můžou být rozděleny podle povahy sil, které tvoří síťovitou strukturu na fyzikálně síťované a kovalentně síťované. Ireverzibilní gely, vznikající většinou gelatinizací lyofobních solů, zaujímají po vysušení přibližně stejný objem jako původní lyogel, avšak jejich struktura je porézní. Jejich přeměna na xerogel je nevratná, ireverzibilní gely jsou schopny zpátky přijmout pouze určité množství disperzního prostředí a do původního stavu se vrátit nedokážou [17].

2.4.4 Využití gelů

Gely a procesy tvorby gelů mají velký význam v několika oblastech, například v lékařství, farmacii (enkapsulace látek, krytí ran, tvorba scaffoldů aj.) a biologii. Gelatinizace makromolekulárních látek je důležitým článkem mnoha technických výrob, jako je například výroba vláken, aplikace lepidel, zpracování kůží atp. Tvorbu gelů rovněž využívá řada procesů a postupů v potravinářském a pekařském odvětví průmyslu. S neustále se rozvíjejícím výzkumem gelových systému vyvstávají nové možnosti pro jejich použití v dalších oblastech, kupříkladu pro zpracování a čištění odpadních vod, pro absorpci škodlivin ze životního prostředí aj. [20, 21].

2.5 Hydrogely

Pod pojmem hydrogel se skrývá trojrozměrný hydrofilní síťovaný materiál, jehož struktura je schopná pojmout velké množství vody, které je zadržováno v matici tvořené polymerní látkou. Trojrozměrná integrita hydrogelů je zabezpečena pomocí fyzikálního nebo chemického síťování, které chrání hydrogel před rozpuštěním. Schopnost zadržovat ve své struktuře velké množství vody je dána přítomností funkčních skupin na polymerním řetězci, např. $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$. Kapilární efekty a osmotický tlak mohou také ovlivňovat množství vody obsažené v hydrogelové síti. Důležitou vlastností je, že voda uvnitř struktury hydrogelu umožňuje volnou difúzi rozpuštěných molekul [22, 23].

2.5.1 Vlastnosti a struktura

Typickými vlastnostmi hydrogelů je jejich permeabilita a možnost poutat ve své struktuře vodu. Polární hydrofilní funkční skupiny jsou nejprve hydratovány a vodu podílejí se na této hydrataci označujeme jako primárně vázanou. V důsledku této hydratace struktura bobtná a umožňuje kontakt vody s hydrofobními funkčními skupinami, což vede k vytvoření hydrofobně-vázané vody, nazývané jako sekundárně vázaná voda. Primárně a sekundárně vázaná voda je souhrnně označována jako celkově vázaná voda. Další voda může být absorbována působením osmotických sil polymerních řetězců vůči dalšímu zředění. Proti dalšímu bobtnání však stojí retrakční síla způsobená spojením řetězců v uzlových oblastech a hydrogel dosáhne rovnovážné úrovně nabobtnání. Tato tzv. volná voda vyplňuje mezery mezi řetězci nebo vyplňuje póry hydrogelu.

Propojení jednotlivých řetězců polymeru pomocí uzlových oblastí dává hydrogelu některé vlastnosti tuhých látek jako je např. elasticita a pevnost, přítomnost velkého množství vody dává struktuře přizpůsobivost typickou pro přírodní tkáň.

Některé hydrogely mohou snadno změnit své vlastnosti v reakci na vnější podněty, jako je například teplota, pH, iontová síla, přidání elektrolytu aj. V závislosti na změně prostředí se projeví změna v integritě hydrogelu nebo v obsahu vody ve struktuře, čehož může být využito například při cíleném uvolňování léčiv.

Pro aplikace hydrogelů v tkáňovém inženýrství a cíleném uvolňování léčiv je klíčovou vlastností biodegradabilita a biokompatibilita. Biodegradovatelné gely obsahují slabé vazby buď v polymerním řetězci, případně v uzlových oblastech a tyto vazby mohou být za fyziologických podmínek chemickou nebo enzymatickou cestou štěpeny. Biokompatibilitou rozumíme schopnost hydrogelu nezpůsobovat poškození a nevyvolávat nežádoucí reakci organismu. Biokompatibilní musí být jak hydrogel, tak produkty vznikající při jeho degradaci uvnitř organismu [24, 25, 26]. Tyto vlastnosti mají především hydrogely připravené z přírodních materiálů. Oproti tomu syntetické hydrogely zpravidla nedisponují biokompatibilitou a biodegradabilitou, avšak jejich výhodou je exaktně definovaná struktura, jejíž modifikací může být těchto vlastností dosaženo [27].

2.5.2 Využití hydrogelů

Hydrogely jsou díky svým unikátním vlastnostem systémy s širokou možností využití v biologických, medicínských i průmyslových oblastech. Díky biokompatibilitě a biodegradabilitě mnohých hydrogelů je možné je využívat v medicíně jako systémy pro řízené uvolňování léčiv, kdy léčivá látka je zabudována do hydrogelu a poté může být několika způsoby v závislosti na vlastnostech systému cíleně uvolňována, např. difúzně kontrolovaným uvolňováním nebo reakcí na podmínky lokálního prostředí. Možná je aplikace v tkáňovém inženýrství, kdy bývá hydrogelu využito jako tzv. scaffoldu, tedy lešení pro růst nových tkání. Mezi již rozšířené aplikace patří krytí ran tzv. mokřými obvazy, které mohou díky své prodyšnosti, přilnavosti a schopnosti udržet v ráně ideální prostředí pro hojení výrazně zkrátit dobu regenerace. Dlouho využívanou aplikací je také výroba kontaktních čoček, kde se hydrogel ukázal jako vhodný materiál z hlediska mechanických a optických vlastností, propustnosti pro kyslík a vlhkosti povrchu.

Dalé je možné hydrogely využívat například jako prostředky pro absorpci těžkých kovů nebo různých barviv z životního prostředí a odpadních vod. Zde je využíváno nabitých funkčních skupin nacházejících se ve vnitřní struktuře hydrogelu, které mohou s atomy kovů či jinými polutanty tvořit komplexy a tím je absorbovat [26, 28].

2.6 Polyelektrolyty

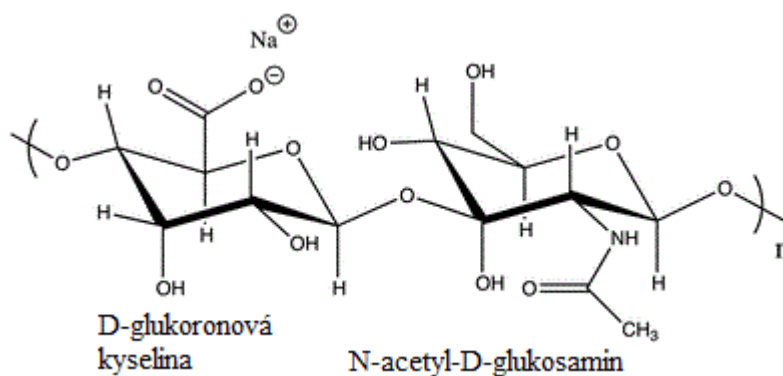
Makromolekulární polymerní látky obsahující ionizovatelné funkční skupiny označujeme jako polyelektrolyty. Po rozpuštění ve vhodném rozpouštědle funkční skupiny disociují a zanechávají řetězec nabitý, vzniká tedy makroion o velkém počtu elementárních nábojů a stejný počet malých iontů opačného náboje, protiontů [29]. Podle povahy disociujících skupin je dělíme na polyelektrolyty obsahující kyselou skupinu ($-\text{COO}^-$, OSO_3^-), polyelektrolyty s bazickou funkční skupinou ($-\text{NH}_3^+$) a na elektrolyty amfoterní, které obsahují oba tyto druhy (např. proteiny). U amfoterních molekul závisí míra disociace na pH, při vysoké hodnotě pH jsou disociovány pouze kyselé skupiny, zásadité skupiny disociaci nepodstupují a molekula je nabitá záporně. Při nízkém pH disociují pouze zásadité skupiny a náboj molekuly je tedy kladný. Při střední hodnotě pH dochází k částečné disociaci obou skupin a vzniká obojetný iont, tzv. amfiont. V izoelektrickém bodě je vyrovnán poměr kladných i záporných skupin a celkový náboj molekuly je nulový. Vlastnosti makromolekul, které podléhají v roztoku disociaci, jsou ovlivňovány mezimolekulárními disperzními silami a silami elektrostatickými. Elektrostatické síly se však ve velké míře zmenšují, pokud je v roztoku obsažen kromě vysokomolekulárního elektrolytu i v malém množství elektrolyt nízkomolekulární [17].

2.7 Hyaluronan (HyA)

V roce 1934 Karl Meyer v očním sklivci dobytka objevil a izoloval látku, kterou nazval kyselina hyaluronová. Bylo zjištěno, že se jedná o polysacharid obsahující kyselinu D-glukoronovou a N-acetyl-D-glukosamin, ale ještě dvě desetiletí nebylo objasněno, že tento polysacharid tvoří opakující se $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ spojená disacharidová jednotka. Byly objeveny rovněž další zdroje pro izolaci kyseliny hyaluronové, a to například hřebínek kohoutů nebo pupeční šňůra [30]. Za důležitý je považován rok 1937, kdy F. Kendall izoloval hyaluronan z kapsul streptokokových bakterií skupin A a C. Tento úspěch měl velký význam především z praktického hlediska, jelikož do dnešní doby je izolace hyaluronanu z bakteriálních zdrojů nejekonomičtější způsob jeho průmyslové produkce [31]. V živých organismech se kyselina hyaluronová vyskytuje především v extracelulární matrix. V lidském těle je jí nejvíce obsaženo v synoviální kapalině, v pupeční šňůře a v očním sklivci. Přibližně polovina z celkového obsahu kyseliny hyaluronové v organismu se nachází v kůži. Kromě funkce jako kotvící matrix pro buňky vykazuje v kůži mnoho důležitých úloh. Kyselina hyaluronová má schopnost ve své struktuře zadržovat vodu a tím může měnit objem či stlačitelnost pokožky. Také má schopnost ovlivňovat proliferaci, diferenciaci a opravu buněk, slouží i pro zachytávání volných radikálů vzniklých pomocí ultrafialového slunečního záření a brání poškození nebo zničení buněk. V synoviální kapalině, která obsahuje vysokou koncentraci vysokomolekulární kyseliny hyaluronové, plní funkci kloubního lubrikantu a slouží pro absorbování nárazů [32].

2.7.1 Vlastnosti

Kyselina hyaluronová se především vyskytuje ve formě své sodné soli, tedy jako hyaluronan. Strukturálně se jedná o lineární polysacharid, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek tvořených D-glukoronovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem, které spojuje glykosidická vazba $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$. HyA řadíme mezi skupinu glukosaaminoglykanů, je jejich nejjednodušším členem a jako jediný není kovalentně spojen s jádrovými proteiny, není syntetizován v Golgiho aparátu a není sulfatován (viz. obrázek 6). Molekulová hmotnost HyA může dosahovat hodnot až 10^7 Da [32].



Obrázek 6: Strukturální jednotka hyaluronanu [33]

HyA je velmi silně hygroskopickou látkou, což je pravděpodobně klíčová vlastnost přispívající k jeho velkému funkčnímu využití v živých organismech. Viskoelastické vlastnosti odkazují k možnosti tlumit nárazy a vykazovat lubrikační schopnosti. Jediné reologické vlastnosti bývají hojně využívány v očním lékařství [34].

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu vyztužena pomocí kombinace vazeb mezi disacharidy, vnitřními vodíkovými můstky a interakcemi s molekulami rozpouštědla. Axiální atomy vodíku ve struktuře HyA vytvářejí nepolární, částečně hydrofobní oblasti, zatímco ekvatoriální části řetězce tvoří polární, tedy více hydrofilní část. Molekulu HyA lze tedy považovat za amfifilní [35].

2.7.2 Využití

Hyaluronan vykazuje několik důležitých vlastností, které umožňují jeho široké použití v medicíně a farmacii, a to jak lidské, tak i zvířecí. Jedná se především o jeho biodegradabilitu, biokompatibilitu, vysokou hygroskopicitu a jeho mechanické a viskoelastické vlastnosti. Důležitý je také fakt, že struktura HyA se v různých organismech neliší a jeho použití nezpůsobuje nežádoucí reakci imunitního systému [36].

V dermatologii a při plastických operacích je využíván k augmentaci, pro vyplnění obličejových vrásek a jizev. Vysokomolekulární HyA rovněž podporuje hojení čerstvých ran na kůži i dlouhotrvajících ran chronických, díky svým antioxidačním účinkům bývá používán jako protizánětlivá komponenta materiálů pro krytí ran. Velkou roli hraje HyA v oftalmologii a oční chirurgii, jelikož se jedná o hlavní část očního sklivce. Důležitým

použitím je částečná náhrada ztrát očního sklivce při operacích šedého zákalu nebo při implantaci umělé oční čočky. V ortopedii a revmatologii se používá HyA k viskosuplementaci, tedy k aplikaci do kloubních prostorů vyplněných synoviální tekutinou, čehož bývá toho využíváno při léčbě kloubních zranění a pooperační terapii nebo při léčbě revmatické artritidy, při které dochází mimo jiné k degradaci biopolymerů, tedy i HyA, obsažených v synoviální tekutině. Hyaluronanu bývá také využito pro separaci hojících se tkání po operacích a k zabránění nežádoucích adhezí a tvorbě jizev [36]. Další možnou aplikací je využití pro tvorbu nosičových systémů léčiv, kde je opět velkou výhodou oproti některým jiným systémům biokompatibilita a biodegradabilita. Rozvíjené je především použití HyA nosičů pro cytostatika, které mohou při cestě organismem k nádorovým buňkám poškozovat i zdravé dělicí se buňky a tím způsobovat vážné nežádoucí účinky. Možné je také použití v tkáňovém inženýrství, kde je HyA použit pro tvorbu hydrogelu, který následně slouží jako scaffold pro růst nových buněk a tkání [37].

2.8 Dextran

2.8.1 Historie

V minulosti vedly k použití dextransu především v oblasti klinické praxe dvě cesty. První z nich bylo hledání netoxické náhrady krevní plasmy a druhou studium mikrocirkulace a tokových vlastností krve. Především v období po druhé světové válce a po začátku války v Koreji, kdy nastal akutní nedostatek krevních transfuzí, bylo potřeba nalézt vhodný substituent pro krevní plasmu. V roce 1954 ve Švédsku zjištěno, že roztoky dextransu o určité molekulové hmotnosti by právě pro tento účel mohly být vhodným kandidátem. Od té doby ve Švédsku, některých jiných zemích Evropy a v USA probíhaly klinické testy, které následně tuto hypotézu potvrdily a umožnily rozvoj použití dextransu nejen pro náhradu plasmy, ale i pro další terapeutické využití [38].

2.8.2 Struktura a využití

Dextran patří mezi homopolysacharidy, jeho strukturu tvoří opakující se jednotky monosacharidu α -D-glukopyranosy. Monosacharidové jednotky jsou nejčastěji spojeny pomocí $\alpha(1-6)$ glykosidické vazby. Ve struktuře se mohou objevit i vazby $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-4)$, které způsobují větvení polysacharidového řetězce dextransu. Dextran je nejčastěji produkován bakteriálním kmenem *Leuconostoc mesenteroid* pomocí enzymatického působení na molekuly sacharózy. Dextran mohou produkovat i jiné bakteriální kmeny, výsledné produkty se však liší typem síťování a množstvím větvení, stejně tak jako počtem monosacharidových jednotek. Tyto změny ve velikosti molekul a jejich struktuře poté ovlivňují vlastnosti, jako je například viskozita nebo schopnost procházení skrze semipermeabilní membrány. Pro klinické použití jsou využívány především tři typy dextransu, a to nízkomolekulární dextran s průměrnou molekulovou hmotností 40 000 Da, dextran se střední molekulovou hmotností, jejíž průměrná hodnota činí 75 000 Da a vysokomolekulární dextran s průměrnou molekulovou hmotností 150 000 Da. Jak již bylo zmíněno, nejdůležitějším použitím dextransu v klinické praxi je využití jako náhrady krevní plasmy. K tomuto účelu je využit dextran se střední molekulovou hmotností. Dalším použitím je např. využití dextransu jako antithrombotického činidla [38, 39].

2.9 Tenzidy

Tenzidy, někdy nazývány také jako povrchově aktivní látky, jsou organické sloučeniny, které se už při malé koncentraci hromadí na fázovém rozhraní a způsobují snížení povrchového napětí. Jedná se o amfifilní molekuly, obsahující hydrofobní část označovanou jako nepolární ocas a hydrofilní část nazývanou hydrofilní hlavička. Z toho důvodu jsou tenzidy rozpustné v organických nepolárních rozpouštědlech i ve vodě. V závislosti na použitém rozpouštědle je vždy jedna část molekuly tenzidu rozpustná (lyofilní část) a druhá část nerozpustná (lyofobní část) [40, 41].

Tenzidy dělíme podle charakteru hydrofilní skupiny. Rozeznáváme dvě hlavní skupiny tenzidů, ionické a neionické. Ionické dále dělíme na anionické (anionaktivní), které obsahují nejčastěji karboxylovou nebo sulfátovou skupinu a jsou celosvětově nejpoužívanějšími tenzidy. Jejich příkladem jsou například soli vyšších mastných kyselin, tedy mýdla. Kationické (kationaktivní) tenzidy obsahují atom dusíku nesoucí kladný náboj, jedná se o aminy nebo kvartérní amoniové soli. Aminy fungují jako povrchově aktivní látka pouze v protonované formě, nejsou proto použitelné za vysokého pH, oproti tomu kvartérní amoniové soli nejsou k hodnotě pH citlivé. Amfoterní tenzidy obsahují kladně i záporně nabitou funkční skupinu a jejich vlastnosti se mění v závislosti na pH systému, kladně nabitou skupinou je nejčastěji amoniová skupina, záporně pak karboxylová. Neionické tenzidy obsahují buď polyetherovou nebo polyhydroxylovou jednotku jako polární skupinu, nejčastěji je polární skupinou polyether složený z oxyethylenových jednotek vzniklých při polymeraci ethylen oxidu [41].

2.9.1 Tvorba micelárních soustav

Jednou z vlastností tenzidů vycházející z jejich amfifilní struktury je schopnost tvořit micely. Při určité koncentraci tenzidu v roztoku nastávají změny různých fyzikálně-chemických vlastností. Tato koncentrace je nazývána kritická micelární koncentrace (CMC) a představuje nejvyšší koncentraci, ve které se tenzid v roztoku vyskytuje ještě v molekulové (iontové) formě. Hodnota CMC je pro každou povrchově aktivní látku specifická a její hodnoty kolísají v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm⁻³. Nad hodnotu CMC v roztoku dochází k asociaci molekul ve větší útvary, které se nazývají koloidní micely. Při vyšších koncentracích tenzidu, než je hodnota CMC, můžeme dojít ještě ke druhé změně vlastností v roztoku. Tyto změny nastávají z důvodu změny v typu agregace, interakce micela-micela, micela-monomer aj. Tuto koncentraci označujeme jako tzv. druhou CMC.

Ve vodném prostředí agregáty tenzidů vznikají z uhlovodíkových řetězců, jejichž hydrofilní (lyofilní) části jsou umístěny na vnějším povrchu, micely. Díky tomu dochází k minimálnímu styku mezi hydrofobní (lyofobní) částí molekuly a vodným prostředím. Za příčinu této agregace je považována velká kohezní síla mezi molekulami vody, která převyšuje přitažlivou sílu uhlovodíkových řetězců mezi sebou i přitažlivost mezi molekulami vody a řetězci, v důsledku čehož dojde k vytěsňování uhlovodíkových řetězců z roztoku a k následnému poklesu Gibbsovy energie systému. Pokud se jedná o ionický tenzid, polární skupiny disociují a kolem micel je vytvořena elektrická dvojvrstva tvořená protionty vzniklými při disociaci. V nevodném prostředí mohou vznikat tzv. obrácené micely, u nichž je jádro tvořeno polárními skupinami a uhlovodíkové řetězce jsou orientovány směrem k nepolárnímu vnějšímu prostředí.

Proces tvorby micel ovlivňuje několik parametrů, například hodnota CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. Vliv hydrofilní skupiny ovlivňuje CMC tak, že při stejné délce uhlovodíkového řetězce je CMC neionických tenzidů vyšší než u ionických. Dále mohou hodnotu CMC ovlivňovat také teplota, tlak, tvořené protionty a příměsi v roztoku [17].

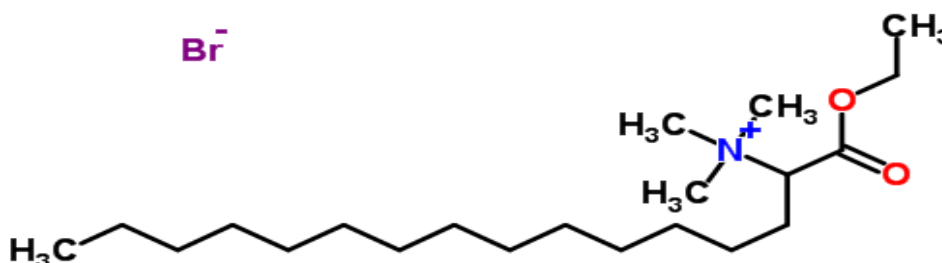
2.9.2 Micelární struktura

Struktura micely závisí na mnoha parametrech, mezi něž patří koncentrace, teplota, struktura tenzidu, charakter mezimolekulárních sil aj. V roztocích o malé koncentraci (avšak nad hodnotou CMC) vznikají malé tzv. Hartleyovy micely. Tyto micely jsou kulovitěho tvaru a uhlovodíkové řetězce tenzidů jsou vzájemně propleteny a tvoří jádro micely, polární skupiny jsou orientovány do vnějšího vodního prostředí. Poloměr micely je přibližně roven délce molekuly tenzidu a micelu tvoří mezi 50 a 150 molekul.

Se zvětšující se koncentrací roztoku roste i velikost micel, uvnitř kterých se uhlovodíkové řetězce začínají orientovat stále více navzájem rovnoběžně. Kulovité micely se nejprve transformují na válcovité útvary a následně při ještě větší koncentraci vznikají laminární micely, zvané také jako McBainovy, tvořené dvěma vrstvami tenzidů, které jsou k sobě orientovány uhlovodíkovými zbytky a polární skupiny směřují ven. Laminární micely ionických tenzidů mají menší náboj než sférické, neboť při velké koncentraci, která je potřebná k jejich vzniku, je snížena míra disociace polárních skupin. Z toho důvodu se laminární micely ukládají vůči sobě rovnoběžně, sousední molekuly jsou k sobě natočeny povrchy, na kterých jsou hydratované skupiny molekul tenzidů. Díky vzájemnému charakteristickému uspořádání laminárních micel mohou roztoky s dostatečnou koncentrací přecházet v gel [17].

2.9.3 Septonex

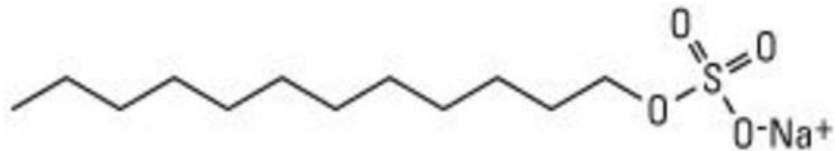
Karbethopendecium bromid, známý pod komerčním názvem jako Septonex, je kationaktivním tenzidem. Molekula Septonexu je tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem tvořícím hydrofobní část a kvartérní amoniovou skupinou, která tvoří část hydrofilní (obrázek 7). Má formu bílého až nažloutlého prášku, vykazuje vysokou rozpustnost ve vodě, ethanolu a chloroformu. Vodné roztoky Septonexu při zamíchání výrazně pění. Používán je jako antiseptický a antimikrobiální přípravek [42].



Obrázek 7: Struktura Septonexu [43]

2.9.4 SDS

Dodecylsulfát sodný (SDS) je zástupcem anionaktivních tenzidů. Jeho hydrofobní část tvoří dvanácti uhlíkatý řetězec a část hydrofilní tvoří sulfátová skupina (obrázek 8). Často nalézá své využití v proteomice pro solubilizaci nebo extrakci hydrofobních či agregovaných bílkovin a k separaci proteinů pomocí PAGE-SDS elektroforézy. SDS ovlivňuje a mění sekundární a terciální struktury proteinů pomocí iontových (interakce s „hlavičkou“ tenzidu) a hydrofobních interakcí (interakce s hydrofobním „ocasem“) [44].



Obrázek 8: Struktura SDS [45]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Práce vypracované na Fakultě chemické

Ve své bakalářské práci se **Lenka Kohutová** zabývala přípravou fyzikálních gelů na bázi hyaluronanu a především studiem interakce mezi roztokem HyA a opačně nabitým tenzidem cetyltrimethylammonium bromidem (CTAB) v prostředí fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl). Byl studován vliv molekulové hmotnosti HyA, koncentrace roztoku HyA a poměru vazných míst na řetězci hyaluronanu a tenzidu na množství sušiny v hydrogelu. Z dosažených výsledků bylo zjištěno, že molekulová hmotnost HyA, stejně tak jako poměr vazných míst, nemají vliv na výsledné množství sušiny. Tuto hodnotu však významně ovlivňovala koncentrace výchozího roztoku HyA. Dále bylo zkoumáno, kolik vody je schopen pojmout zpět vysušený hydrogel a bylo docíleno obdobných závěrů, jako při studiu obsahu sušiny. Následně bylo použito metody fluorescenční spektroskopie k zjištění vlivu molekulové hmotnosti HyA a poměru vazných míst HyA a CTAB na tvorbu excimerů a změnu spektrálních charakteristik. Vzorky pro fluorescenční spektroskopii byly připraveny tak, že z požadovaného objemu zásobního roztoku fluorescenční sondy bylo odpařeno rozpouštědlo a na odparek bylo nalito požadované množství tenzidu. Následně bylo příslušné množství tenzidy se sondou smícháno ve zkumavce s příslušným množstvím roztoku hyaluronanu, směs byla protřepána a odstředěna. Roztok ve zkumavce se rozdělil na dvě fáze, horní fázi tvořil supernatant, spodní fázi gel. Použitými sondami byly pyren, 1,3-bis(pyren-1-yl)propan (P3P) a Prodan. U P3P byla pozorována emise excimeru, u pyrenu však nikoliv. Bylo prokázáno, že molekulová hmotnost neovlivňuje poměr excimeru k monomeru pro P3P, stejně jako poměr prvního a třetího píku u pyrenu. Poměr vazných míst mezi HyA a tenzidem ovlivňoval pouze poměr excimeru a monomeru u fluorescenční sondy P3P. Spektra Prodanu byla použita pro vizualizaci procesů sušení a bobtnání [46].

Ve své diplomové práci **Lenka Kohutová** navázala na problematiku fyzikálních hyaluronanových gelů a především na studium interakce HyA s opačně nabitými tenzidy v prostředí fyziologického roztoku. Součástí práce bylo zjištění obsahu sušiny připravených hydrogelů, a to v závislosti na molekulové hmotnosti HyA a koncentraci roztoku HyA a tenzidu CTAB. Výsledkem bylo zjištění, že se snižující se koncentrací HyA se zvyšovala hodnota obsahu sušiny a naopak. Růst obsahu sušiny se zvyšující se molekulovou hmotností byl nepatrný. K popisu procesu sušení bylo použito sušinových křivek. Další část práce se zabývala charakterizací gelů pomocí procesu bobtnání, konkrétně zjištění množství vody, které je schopen hydrogel přijmout zpět po svém vysušení. Zde bylo dosaženo obdobných výsledků, jako při studiu množství sušiny v hydrogelu. Následně byly gely studovány pomocí reologie. Bylo zjištěno, že při nízké smykové rychlosti je hodnota viskozity zásobních roztoků HyA vyšší s rostoucí koncentrací HyA, zatímco u gelů je tomu naopak [47].

Ve své diplomové práci se **Anna Holubová** zabývala hydrogely vznikajícími fázovou separací hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy cetyltrimethylammonium bromid a Septonex. Pozornost byla zaměřena především na charakterizaci vnitřního chování hydrogelu, k čemuž byla použita metoda fluorescenční korelační spektroskopie a její upravená varianta dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie. Pomocí těchto metod bylo stanoveno difuzní chování fluorescenčních sond Atto 488 a nilské červeně.

Výsledky obou spektroskopických metod byly porovnatelné, fluorescenční sondy interagovaly s CTAB, nicméně Atto 488 oproti nilské červeni vykazovala pouze slabou interakci se Septonexem. Rovněž bylo prokázáno, že interakce mezi sondami a tenzidy byly ovlivněny použitou molekulovou hmotností hyaluronanu [48].

Kateřina Sátorová vypracovala diplomovou práci zabývající se tím, jaké je rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Polymerem byl zvolen hyaluronan sodný s různou molekulovou hmotností a tenzidem CTAB. Experimenty byly provedeny v prostředí fyziologického roztoku (0,15 M NaCl). Použitou analytickou metodou ke studiu rozdělení tenzidu při fázové separaci byla UV-VIS spektroskopie, prostřednictvím které byly sledovány barevné komplexy, jež tvoří CTAB spolu s kyselinou pikrovou v chloroformu. Byla provedena měření pro gely s čtyřmi různými složeními, konkrétně se jednalo o gel tvořený 2% HyA + 200mM CTAB, 2% HyA + 50 mM CTAB, 0,5% HyA + 200 mM CTAB a 0,5% HyA + 50 mM CTAB. Postupně bylo provede celkem pětkrát promytí gelů 0,15 M roztokem NaCl, díky čemuž bylo při porovnávání dat z promývání zjištěno, jaká část tenzidu je v gelech zadržována elektrostaticky a stericky. Stanovení obsahu tenzidu bylo provedeno u nově připravených gelů i u gelů 2 a 4 měsíce starých. Bylo zjištěno, že obsah CTAB v různých časových intervalech od přípravy se neliší, což poukazuje na stabilitu systému. Také bylo prokázáno, že na distribuci CTAB má vliv především původní koncentrace CTAB a HyA [49].

Jan Kotouček ve své diplomové práci studoval deprotonační charakteristiky fluorescenčních sond α -naftolu a HPTS v prostředí komplexů složených z hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech a kationaktivních tenzidů Septonexu a cetyltrimethylamonium bromidu. K měření byly použity dvě fluorescenční metody, konkrétně ustálená a časově rozlišená fluorescenční spektroskopie. Pomocí ustálené fluorescence byly stanoveny kritické agregační koncentrace tenzidů a také hodnoty pK_a^* systémů. Metoda časově rozlišené fluorescence byla použita pro zjištění deprotonačních konstant a průměrné délky doby života fluorescence. Díky porovnání naměřených dat se systémem polystyrensulfonyl-tenzid byl posuzován vliv hydratačního obalu molekul hyaluronanu na vzniknutí komplexu hyaluronan-tenzid. Byly prokázány velké rozdíly mezi deprotonačními charakteristikami v závislosti na použitém tenzidu a zvolené molekulové hmotnosti hyaluronanu. Ze získaných výsledků vyplývá, že hydratační obal je lokalizován v blízkosti disociované karboxylové skupiny, v místě interakce s kladným nábojem tenzidu za následného vzniku komplexu. Následně bylo využito zhasnutí pyrenu pomocí cetylpyridinium chloridu (CPC) pro stanovení agregačního čísla tenzidu Septonexu o koncentraci 20mM, zjištěná hodnota činila 104 molekul. Pomocí CPC byla rovněž zjištěna lokalizace α -naftolu v micelách CTAB, tedy v komplexu polymeru s CTAB [50].

Interakcí hyaluronanu a tenzidu v prostředí fyziologického roztoku se ve svém článku zabývala **Tereza Halasová a spol.** Ke studiu těchto interakcí bylo použito metod tenziometrie a fluorescence za využití fluorescenčních sond pyrenu a nilské červeni. Měření ukázala, že přestože by přítomnost NaCl měla potlačovat interakce opačně nabitých polyelektrolytů a tenzidů, tak jsou interakce v některých systémech hyaluronan-tenzid přítomny i přes ionickou povahu tenzidu. Pomocí sond bylo prokázáno, že docházelo k tvorbě agregátů (micel) za určitých koncentrací tenzidů, především pokud se v systému nachází také hyaluronan. Přítomnost hyaluronanu měla největší vliv na tvorbu agregátů za použití neionického Tween 20 a kationického CTAB [51].

Jakub Mondek a spol. publikoval článek popisující studium interakce polyelektrolytu a surfaktantu pomocí fluorescenční sondy zvané akridinová oranž (AO). Studovány byly systémy na bázi hyaluronan-AO, hyaluronan-CTAB, polystyrensulfonát-AO a polystyrensulfonát-CTAB, experimenty byly prováděny ve vodném prostředí. Za použití steady-state fluorescence, časově rozlišené fluorescence a dimer:monomer absorpčního poměru AO bylo definováno, jak se tvoří dimerní struktury AO na polymerním řetězci molekuly polyelektrolytu. Byla sledována významná tvorba dimerů na polystyrensulfonátovém i hyaluronanovém řetězci, nicméně u hyaluronanu byly pozorovány mnohem slabší elektrostatické interakce. Po přidavku tenzidů bylo patrné zvýšení intenzity fluorescence, což indikovalo disociaci dimerních struktur AO na monomery a nahrazení molekul AO na polymerním řetězci molekulami tenzidu. Dále bylo zjištěno, že molekuly tenzidu se k řetězci váží před dosažení kritické micelární koncentrace [52].

3.2 Použité fluorescenční sondy

Ewa K. Krasnowska a spol. publikovala v roce 1998 článek, ve kterém popisuje použití Prodanu jako fluorescenční sondy pro studium povrchů membrán a konkrétně se zabývala tím, jakým způsobem je možné od sebe odlišit ve fluorescenčním spektru příspěvky fluorescence Prodanu z vodného prostředí a z prostředí lipidické fáze. Snahou bylo rovněž zjistit, jaké je rozdělení sondy právě mezi tyto prostředí a také mezi fázi gelovou a fázi tekutých krystalů fosfolipidů. Za tímto účelem byla představena metoda tzv. tří vlnné generalizované polarizace (3WGP) využívající měření intenzity emise Prodanu při třech rozdílných vlnových délkách (420 nm, 480 nm, 530 nm) vybraných tak, aby došlo k co největšímu oddělení příspěvků fluorescence z ostatních prostředí. Pomocí následných výpočtů bylo zjištěno, že Prodan se přednostně nachází v prostředí tekutých krystalů fosfolipidů a že jeho rozdělení mezi vodnou fázi a mezi membránu závisí na struktuře dvojvrstvy [53].

Arlin Jose Amali a spol. studovali v roce 2011 použití sondy HPTS jako sondy pro detekci pH a koncentraci amoniaku v prostředí. Navržen byl systém tvořený mikrokapsulemi sestávajícími se z nanočástic křemíku spojených pomocí poly-L-lysinu a trisodium citrátu, do kterého byla sonda HPTS zainkorporována. Tímto byl získán odolný indikátorový systém pro detekci za fyziologických podmínek. Sledováním vlastností sondy pod kontinuálním ozářením bylo zjištěno, že v mikrokapsulích sonda vykazuje velkou míru fotostability. Hodnota pH byla měřena pomocí excitace fluoroforu při dvou různých vlnových délkách, konkrétně 402 a 455 nm a následnému snímání poměru intenzity emise při 530 nm při excitaci těmito dvěma různými vlnovými délkami. Systém se ukázal být vhodný pro měření hodnoty pH v rozmezí 5,8–8,0 a úspěšně aplikovatelný pro zjištění koncentrace amoniaku v rozmezí 0–1,2 mM [54].

3.3 Interakce hyaluronan-tenzid

Studiem interakce mezi hyaluronanem a kationaktivními tenzidy se věnovali ve své práci **Kyrre Thalberg** a **Bjorn Lindman**. Zabývali se interakcemi mezi hyaluronanem sodným a alkytrimethylamonium bromidy o různé velikosti uhlovodíkového řetězce, tyto interakce byly sledovány pomocí fázové separace, vodivosti, NMR samo-difuze a studia solubilizace barviv. Z výsledků bylo možné vyvodit, že vázání tenzidů k řetězcům hyaluronanu nastává, pokud alkylový řetězec tenzidu obsahuje 10 nebo více uhlíkových atomů. Také bylo zjištěno, že navázání na hyaluronan je slabší než u většiny jiných karboxylátových polyelektrolytů kvůli nízké lineární hustotě náboje hyaluronanu. Další pozorování, jako například vázání protiontů či solubilizační síla tenzidů vázaných na řetězec polyelektrolytu vůči nenabitým hydrofobním barvivům, indikují struktury micelám podobných clusterů vázaných na polyelektrolytový řetězec. Pokud je dosaženo určitého stupně vázání, komplexy HyA-tenzid přestávají být rozpustné a nastává fázová separace. Koncentrace tenzidu, při které fázová separace nastává, se nachází vysoko nad hodnotou kritické micelární koncentrace. Rovněž bylo zjištěno, že kvůli elektrostatickým efektům, které upřednostňují volné micely před micelami navázanými k řetězci hyaluronanu, se při velkém nadbytku tenzidu sraženina vzniklá při fázové separaci opět rozpustí, což je zapříčiněno tím, že při velkém zvýšení koncentrace tenzidu se zmenší jeho iontová aktivita v důsledku čehož se zmenší i síla vazby k polyiontu [55].

Ve své další práci se **Thalberg a spol.** zabýval interakcí mezi záporně nabitým hyaluronanem a kladně nabitými tenzidy decyl- (C_{10} TAB) a dodecyl- (C_{12} TAB) trimethylamonium bromidy. Systém byl zkoumán pomocí 1H NMR samo-difuzních měření a také pomocí časově rozlišené fluorescence za použití pyrenu jako fluorescenční sondy a dimethylbenzofenonu jako zhášedla. Bylo zjištěno, že pro C_{10} TAB byla kritická agregační koncentrace mírně nižší než kritická micelární koncentrace a pro C_{12} TAB byla hodnota kritické agregační koncentrace přibližně poloviční oproti CMC. Kritická agregační koncentrace rovněž závisí na koncentraci hyaluronanu. Při steady-state fluorescenčním měření se spektrum pyrenu v roztoku tenzidu v přítomnosti hyaluronanu téměř nezměnilo oproti spektru bez přídavku hyaluronanu, z čehož bylo usouzeno, že za přítomnosti hyaluronanu je stále přítomna micelární struktura molekul tenzidu. Fluorescenční doba života pyrenu τ_0 se díky interakci mezi tenzidem a polyelektrolytem zvýšila z důvodu schopnosti polyelektrolytu vytlačit bromidové ionty ze struktury micelárního povrchu. Se zvyšující se délkou uhlovodíkového řetězce tenzidu se fluorescenční doba života zvyšovala znatelněji. Hodnota τ_0 se také mění s poměrem hyaluronanu a tenzidu v systému [56].

Thalberg se svou výzkumnou skupinou se také zabýval tím, jak délka uhlovodíkového řetězce tenzidu a molekulová hmotnost polyelektrolytu ovlivňují fázové chování systému kationaktivní tenzid a záporně nabitý polyelektrolyt. Jako tenzidy zde vystupují alkytrimethylamonium bromidy a jako polyelektrolyt hyaluronan. V systému bylo možné pozorovat fázovou separaci, při které vznikla jedna fáze s velkou koncentrací polyelektrolytu i tenzidu a druhá fáze ve formě velmi zředěného vodného roztoku. Bylo potvrzeno, že se zvětšující se délkou uhlovodíkového řetězce tenzidu se také zvětší oblast, kterou zaujímá dvoufázový region ve fázovém diagramu. Zmenšení molekulové hmotnosti polysacharidu vyústilo pouze v mírné posunutí dvoufázového regionu, velikost této oblasti také téměř ovlivněna nebyla [57].

3.4 Hydrogely s inkorporovanou fluorescenční sondou

Petra Holínková a spol. se ve své práci zabývala studiem mikroviskozity hydrofobních a hydrofilních nanodomén hyaluronových hydrogelů v procesu stárnutí gelů pomocí metody fluorescenční ustálené anisotropie s využitím fluorescenčních sond perylenu, který byl použit pro studium hydrofobních nanodomén a rhodaminu 6G, použitého pro hydrofilní nanodomény. K přípravě hydrogelů byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 750-1000 kDa a kationaktivní tenzid CTAB. Zásobní roztoky hyaluronanu o příslušné koncentraci byly připraveny rozpuštěním látek v 0,15 M roztoku NaCl. Proces gelace probíhal ve skleněných zkumavkách. Nejprve bylo do zkumavky přidáno takové množství příslušné sondy, aby výsledná koncentrace fluoroforu ve vzorku činila 10^{-6} M a poté bylo odpařeno rozpouštědlo. Následně bylo přidáno příslušné množství tenzidu a roztok byl 24 hodin míchán na třepačce. Další den bylo přidáno stejné množství roztoku hyaluronanu, směs byla promíchána na vortexu a opět ponechána po 24 hodin na třepačce. Následná měření poté probíhala po 1, 7 a 14 dnech od přípravy příslušných vzorků. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že mikroviskozita hydrofobních domén se při procesu stárnutí téměř nemění a tyto domény neprochází s postupujícím časem znatelnými strukturními změnami. To ovšem neplatí pro hydrofilní nanodomény, jejichž viskozita s postupem času klesá, což značí strukturní změny v těchto oblastech hydrogelové matrice [58].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný

Hya č. 17 (250-450 kDa), č. šarže: 230215-E1, Contipro a.s.

Dextran hydrochlorid

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

Septonex (Karbethopendecinium bromid)

$M_w = 422$ g/mol, CAS: 151-21-2, č. šarže: SLBT3991, Sigma Aldrich

SDS (dodecylsírán sodný)

$M_w = 288,38$ g/mol, CAS: 9064-91-9, č. šarže: SLBT3991, Sigma Aldrich

Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen

$M_w = 227,30$ g/mol, CAS: 70504-01-7, Sigma Aldrich

HPTS (sodná sůl 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové kyseliny)

$M_w = 524,39$ g/mol, CAS: 6358-69-6, Sigma Aldrich

[2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina(II)

$M_w = 461,80$ g/mol, CAS: 241818-94-0, Sigma Aldrich

Chlorid sodný

$M_w = 58,44$ g/mol, CAS: 7647-14-5, č. šarže: 1903200314

Deionizovaná voda

System ELGA

Použitá rozpouštědla:

Ethanol; $M_w = 46,07$ g/mol, CAS: 64-17-5

Methanol; $M_w = 32,042$ g/mol, CAS: 67-56-1

Isopropanol; $M_w = 60,1$ g/mol, CAS: 67-63-0

Acetonitril; $M_w = 41,05$ g/mol, CAS: 75-05-8

Dimethylsulfoxid; $M_w = 78,13$ g/mol, CAS: 67-68-5

T-butanol; $M_w = 74,12$ g/mol, CAS: 75-65-0

Aceton; $M_w = 58,08$ g/mol, CAS: 67-64-1

Chloroform; $M_w = 119,378$ g/mol, CAS: 67-66-3

Toluen; $M_w = 92,14$ g/mol, CAS: 108-88-3

Cyklohexan; $M_w = 84,14$ g/mol, CAS: 110-82-7

Chemikálie použité pro přípravu pufrů:

Monohydrát kyseliny citronové $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; $M_w = 187,13$ g/mol, CAS: 142-47-2

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; $M_w = 358,14$ g/mol, CAS: 10039-32-4

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 ; $M_w = 136,09$ g/mol, 7778-77-0

Hydroxid sodný NaOH; $M_w = 39,99$ g/mol, CAS: 1310-73-2

Dekahydrát tetraboritanu sodného $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$; $M_w = 381,38$ g/mol, CAS: 1303-96-4

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

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu hydrogelů na bázi hyaluronanu a Septonexu byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 250–450 kDa. K přípravě zásobního roztoku byl použit roztok NaCl o koncentraci 0,15 M. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 8,776 g NaCl v 1 litru deionizované vody. Následně bylo rozpuštěno v 50 ml 0,15 M roztoku NaCl takové množství hyaluronanu, aby byla následně požadovaná koncentrace zásobního roztoku Hya 2 hm. %. Poté byl připravený zásobní roztok Hya ponechán míchat na magnetické míchačce do dalšího dne, aby došlo k úplnému rozmíchání a homogenizaci. Zásobní roztok byl uchováván v ledničce.

Dále byl připraven zásobní roztok Septonexu o koncentraci 200 mM. Pro jeho přípravu bylo opět použito roztoku NaCl o koncentraci 0,15 M. V 100 ml roztoku NaCl bylo rozpuštěno takové množství Septonexu, aby výsledná koncentrace připraveného roztoku dosahovala požadované hodnoty. Do dalšího dne byl roztok míchán na magnetické míchačce pro kompletní rozmíchání Septonexu a homogenizaci směsi. Zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

K přípravě gelů na bázi dextranu a SDS bylo použito zásobního roztoku dextranu o koncentraci 4 hm. %. Tento zásobní roztok byl připraven rozpuštěním takového množství dextranu v 50 ml 0,15 M roztoku NaCl, aby bylo dosaženo požadované koncentrace. Roztok byl poté míchán do dalšího dne na magnetické míchačce pro úplné rozmíchání dextranu a homogenizaci směsi. Zásobní roztok byl uchováván v ledničce.

Zásobní roztok SDS byl připraven o koncentraci 400 mM. Pro jeho přípravu bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,15 M roztoku NaCl takové množství, aby bylo dosaženo požadované koncentrace. Roztok byl poté do dalšího dne míchán na magnetické míchačce pro úplné rozmíchání tenzidu a homogenizaci směsi a poté uchováván při laboratorní teplotě.

Zásobní roztok fluorescenční sondy prodanu byl připraven tak, že bylo rozpuštěno 0,0030 g prodanu v 20 ml acetonu, výsledná koncentrace zásobního roztoku činila

$6,599 \cdot 10^{-4}$ M. Zásobní roztok HPTS byl připraven rozpuštěním 0,0079 g HPTS v 30 ml deionizované vody, koncentrace zásobního roztoku činila $5,022 \cdot 10^{-4}$ M. Zásobní roztok komplexu platiny byl již dodán, jako rozpouštědlo byl použit aceton a koncentrace zásobního roztoku činila $5 \cdot 10^{-4}$ M. Zásobní roztoky fluorescenčních sond byly uchovávány v lednici.

4.2.2 Příprava pufrů

Pro studium chování sondy HPTS v prostředí o různém pH byl připraven soubor pufrů. Nejprve byly připraveny pufrы pro pH v rozmezí hodnot 4–5,5. Pro přípravu těchto pufrů bylo naváženo 2,101 g monohydrátu kyseliny citronové, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na 100 ml deionizovanou vodou, poté bylo naváženo 7,162 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na 100 ml deionizovanou vodou. Pro přípravu pufru o hodnotě pH 4 bylo smícháno 29,4 ml 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ a 20 ml 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$. Pro hodnotu pH 4,5 bylo smícháno 26,7 ml 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ a 23 ml 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$. Pro hodnotu pH 5 bylo smícháno 24,3 ml 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ a 25,7 ml 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$. Pro hodnotu pH 5,5 bylo smícháno 22,2 ml 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ a 27,8 ml 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$.

Pufry pro hodnotu pH 6–7,5 byly připraveny z dihydrogenfosforečnanu draselného a hydroxidu sodného. Bylo naváženo 0,408 g NaOH, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na objem 100 ml deionizovanou vodou. Poté bylo naváženo 1,361 g KH_2PO_4 , navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na objem 100 ml deionizovanou vodou. Pro pufr o hodnotě pH 6 bylo smícháno 10 ml KH_2PO_4 a 1,12 ml NaOH. Pro pufr o hodnotě 6,5 bylo smícháno 10 ml KH_2PO_4 a 2,78 ml NaOH. Pro pufr o hodnotě pH 7 bylo smícháno 10 ml KH_2PO_4 a 5,82 ml NaOH. Pro pufr o hodnotě pH 7,5 bylo smícháno 10 ml KH_2PO_4 a 8,22 ml NaOH.

Pufry pro hodnotu pH 8–9 byly připraveny z dekahydrátu tetraboritanu sodného a kyseliny chlorovodíkové. Bylo naváženo 0,9534 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na objem 100 ml deionizovanou vodou. Kyselina chlorovodíková byla naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 0,1 M. Pro přípravu pufru o pH 8 bylo smícháno 10 ml $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ a 4,1 ml HCl. Pro přípravu pufru o pH 8,5 bylo smícháno 10 ml $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ a 3,04 ml HCl. Pro přípravu pufru o pH 9 bylo smícháno 10 ml $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ a 0,92 ml HCl.

Pufry pro hodnotu pH 9,5–10 byly připraveny z dekahydrátu tetraboritanu sodného a hydroxidu sodného. Bylo naváženo 0,9534 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na objem 100 ml deionizovanou vodou. Bylo naváženo 0,403 g NaOH, navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna na objem 100 ml deionizovanou vodou. Pro pufr o hodnotě pH 9,5 bylo smícháno 10 ml $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ a 1,76 ml NaOH. Pro pufr o hodnotě pH 10 bylo smícháno 10 ml $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ a 3,76 ml NaOH.

Výše popsané hodnoty pH připravených pufrů byly zjištěny jako pouze orientační, hodnoty pH všech připravených pufrů byly změřeny pomocí pH metru a byly zaznamenány.

Tabulka 1: Naměřené skutečné hodnoty pH pufrů

Teoretické pH [-]	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Skutečné pH [-]	4,01	4,45	5,05	5,5	6	6,46	6,9	7,42	7,95	8,44	8,85	9,41	9,95

4.2.3 Příprava vzorků pro charakterizaci fluorescenčních sond v různých prostředích

Pro přípravu vzorků pro studium fluorescenčních sond Prodanu a komplexu platiny v různých prostředích bylo nejprve do vialky napipetováno takové množství zásobního roztoku fluorescenční sondy, aby výsledná koncentrace sondy ve vzorku činila $5 \cdot 10^{-6}$ M. Následně bylo odpařeno původní rozpouštědlo. Poté bylo do vialek napipetováno 5 ml rozpouštědla, ve kterém byly sledovány fluorescenční vlastnosti sond a uzavřené vialky byly ponechány k protřepání na třepačce do dalšího dne. Stejně bylo postupováno při sledování změny fluorescence sond v tenzidech. Pro sondu HPTS byl použit obdobný postup, pouze s tím rozdílem, že původní rozpouštědlo odpařeno nebylo. Podobně bylo postupováno při přípravě vzorků pro studium sondy HPTS v prostředí o různém pH, kdy bylo do vialky k 5 ml příslušného pufru napipetováno takové množství HPTS, aby výsledná koncentrace fluorescenční sondy ve vzorku činila $5 \cdot 10^{-6}$ M.

4.2.4 Příprava hydrogelů s inkorporovanými fluorescenčními sondami

Všechny hydrogely byly připraveny metodou tzv. mokré cesty za použití předem připravených zásobních roztoků polymerů a tenzidů. Proces tvorby gelů probíhal ve vialkách. Nejprve bylo do vialek napipetováno příslušné množství fluorescenční sondy tak, aby výsledná koncentrace sondy ve vzorku činila $5 \cdot 10^{-6}$ M pro Prodan a HPTS, pro komplex platiny pak $1,66 \cdot 10^{-5}$ M. Poté bylo odpařeno původní rozpouštědlo sondy. Vyjimku tvořila sonda HPTS u které rozpouštědlo odpařeno nebylo. Následně bylo do vialek napipetováno 3 ml zásobního roztoku polymeru a 3 ml zásobního roztoku tenzidu. Vialky byly zavíčkované a promíchány na vortexu. Poté byly ponechány do dalšího dne na třepačce. Stejný postup byl použit pro gely na bázi hyaluronanu a Septonexu i pro gely na bázi dextranu a SDS.

4.3 Použité metody

4.3.1 Charakterizace fluorescenčních sond v různých prostředích pomocí stacionární fluorescence

Pro stanovení chování fluorescenčních sond v různých prostředích bylo použito metody stacionární fluorescenční spektroskopie. Pro měření excitační a emisních spekter vybraných fluorescenčních sond bylo použito fluorimetru Aminco-Bowman Series 2. Pro ovládání přístroje a prvotní zpracování dat byl použit program AB2 dodávaný výrobcem a následné vyhodnocení bylo provedeno v programu MS Excel. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty.

Pro měření excitačních a emisních spekter komplexu platiny byl nastaven excitační monochromátor na 380 nm a emisní monochromátor na 490 nm. Šířka štěrbin byla u excitace i emise nastavena na 4 nm, rychlost skenování na 3 nm/s. Excitační spektrum bylo zaznamenáváno v rozmezí od 300–450 nm, emisní spektrum v rozmezí 400–600 nm. Byla sledována změna tvaru spekter, posun excitačního a emisního maxima a změna intenzity fluorescence v závislosti na změně prostředí.

Pro měření excitačních a emisních spekter fluorescenční sondy Prodan byl nastaven excitační monochromátor na 360 nm, nastavení emisního monochromátoru bylo při měření měněno pro lepší citlivost přístroje z toho důvodu, že se emisní maximum spektra Prodanu velmi výrazně posunuje v závislosti na polaritě prostředí, ve kterém se sonda nachází (emisní maximum pro cyklohexan bylo zjištěno kolem 390 nm, pro vodu se hodnota maxima rovnala 520 nm). Rovněž bylo měněno napětí na detektoru, které ovlivňuje jeho citlivost, a tedy zaznamenávanou intenzitu fluorescence, avšak neovlivňuje tvar spektra, který byl u tohoto měření sledován především. Šířka štěrbin byla u excitace i emise nastavena na 4 nm, rychlost skenování na 3 nm/s. Excitační spektra byla zaznamenávána v rozmezí od 290 do 450 nm a emisní spektra v rozmezí od 370–600 nm (370–650 nm pro roztoky tenzidů a vodu).

Při měření excitační a emisních spekter sondy HPTS v různých rozpouštědlech byl excitační monochromátor nastaven na 400 nm, nastavení emisního monochromátoru bylo upravováno podle posunu spektra. Šířka štěrbin pro excitaci i emisi činila 4 nm, rychlost skenu 3 nm/s. Excitační spektrum bylo snímáno v rozmezí 300–550 nm, emisní spektrum v rozmezí 390–600 nm.

Charakteristiky sondy HPTS byly zkoumány také v prostředích (pufrech) o různé hodnotě pH. Pro tato měření byl excitační monochromátor nastaven na hodnoty 405 nm a 450 nm, emisní monochromátor na 510 nm. Šířka štěrbin byla u excitačního i emisního monochromátoru nastavena na 4 nm. Excitační spektrum bylo měřeno v rozpětí 300–550 nm, emisní spektrum v rozpětí 460–620 nm bylo měřeno pro obě zvolené excitační vlnové délky. Rychlost skenu byla 4 nm/s.

4.3.2 Stanovení fluorescenčních charakteristik vybraných sond z prostředí hydrogelů

Pro měření fluorescenčních charakteristik vybraných fluoroforů z prostředí hydrogelu bylo použito přístroje Fluorolog od společnosti Horiba Scientific, data byla zpracována pomocí programu FluorEssence dodávaného výrobcem a následně také v programu MS Excel. Měření bylo provedeno pomocí dvojice optických kabelů, z nichž jeden sloužil jako zdroj excitačního záření a druhý sloužil pro zachycení fluorescence. Měření bylo prováděno takovým způsobem, že vrstva hydrogelu byla nanesena na podložní sklíčko, které bylo poté vloženo do nástavce sloužícího k odstínění okolního záření. Do otvorů v nástavci byly vloženy konce obou kabelů tak, aby směřovaly na sklíčko se vzorkem.

Pro měření hydrogelů s inkorporovaným komplexem platiny byl nastaven excitační monochromátor na 380 nm a emisní monochromátor na 500 nm. Excitační spektra byla zaznamenávána v rozsahu 280–450 nm a emisní spektra v rozsahu 400–650 nm. Šířka štěrbin při měření činila 5 nm, což platilo pro měření charakteristik všech vybraných fluoroforů. Pro měření charakteristik sondy Prodan byl nastaven excitační monochromátor na 360 nm a emisní monochromátor na 500 nm. Excitační spektrum bylo snímání v rozsahu 290–450 nm a emisní spektrum v rozsahu 400–650 nm. Pro sondu

HPTS byl nastaven excitační monochromátor na 405 nm a 450 nm a emisní monochromátor na 530 nm. Excitační spektra byla snímána v rozmezí 280–500 nm a emisní spektra v rozmezí 460–600 nm pro obě zvolené vlnové délky excitace.

Pro komplex platiny a Prodan bylo stejné nastavení použito i pro měření z prostředí vysušených hydrogelů. Pro HPTS byla zvolena vlnová délka excitace 370 nm a emisní sken byl naměřen v rozmezí 380–600 nm. Vrstva hydrogelu byla nanášena na podložní sklíčko, které bylo poté vloženo do sušárny vyhřáté na 50 °C. Hydrogel byl vysušován, dokud neztratil průhlednost, následně bylo sušení přerušeno a byly změřeny fluorescenční charakteristiky sondy inkorporované v hydrogelu. Poté byl hydrogel na 30 minut opět vloženo do sušárny a následně byly znovu změřeny fluorescenční charakteristiky. Dvojí sušení bylo provedeno kvůli tomu, aby bylo ověřeno, zdali se spektrální vlastnosti sondy z obou měření shodují a sušením tedy bylo dosaženo stavu rovnovážné vlhkosti hydrogelu s okolním prostředím.

Pro studium hydrogelů s inkorporovanou sondou Prodan a HPTS pomocí fluorescenční mikroskopie bylo využito systému MicroTime 200, jehož součástí je inverzní mikroskop Olympus IX 71.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace vybraných fluorescenčních sond v různých prostředích

Prvním krokem při záměru pracovat s fluorescenčními sondami by měla být jejich aspoň částečná charakterizace, která nám napoví, jaké jsou jejich spektrální vlastnosti a rovněž jaké můžeme očekávat chování sondy ve studovaných systémech. Pro námi vybrané sondy Prodan, komplex platiny a HPTS byl zvolen soubor rozpouštědel, uvedených v tabulce 2, které vytvořily prostředí pro studium vlastností vybraných fluoroforů. Zvolena byla rozpouštědla od silně nepolárních, jako je například cyklohexan až po silně polární rozpouštědla, jako je například methanol nebo voda. Chování sond bylo rovněž sledováno v tenzidech Septonexu a SDS, které jsou jednou ze složek připravovaných hyaluronanových potažmo dextranových hydrogelů, což nám následně umožní lépe porozumět chování fluorescenčních sond v prostředí hydrogelu a pomůže nám v predikci lokalizace sond v hydrogelovém systému.

Tabulka 2: Použitá rozpouštědla seřazena podle orientační polarizovatelnosti Δf , ϵ značí dielektrickou konstantu a n_D^{20} index lomu [2]

Rozpouštědlo	ϵ [-]	n_D^{20} [-]	Δf [-]
Voda	78,39	1,3325	0,320
Methanol	33,62	1,3288	0,309
Acetonitril	38,80	1,3442	0,306
Ethanol	25,07	1,3611	0,290
Aceton	20,70	1,3587	0,284
Isopropanol	17,90	1,3772	0,272
DMSO	48,90	1,4770	0,265
t-butanol	12,50	1,3878	0,252
Chloroform	4,81	1,4459	0,149
toluen	2,38	1,4961	0,013
Cyklohexan	2,02	1,4266	-0,001

Ve výše uvedené tabulce jsou seřazena použitá rozpouštědla podle jejich klesající orientační polarizovatelnosti Δf , což je parametr kombinující dielektrickou konstantu a index lomu prostředí. Na tomto parametru pak závisí polarizace molekul fluoroforu v prostředí a následné solvatochromní efekty. Orientační polarizovatelnost byla vypočtena dle následující rovnice:

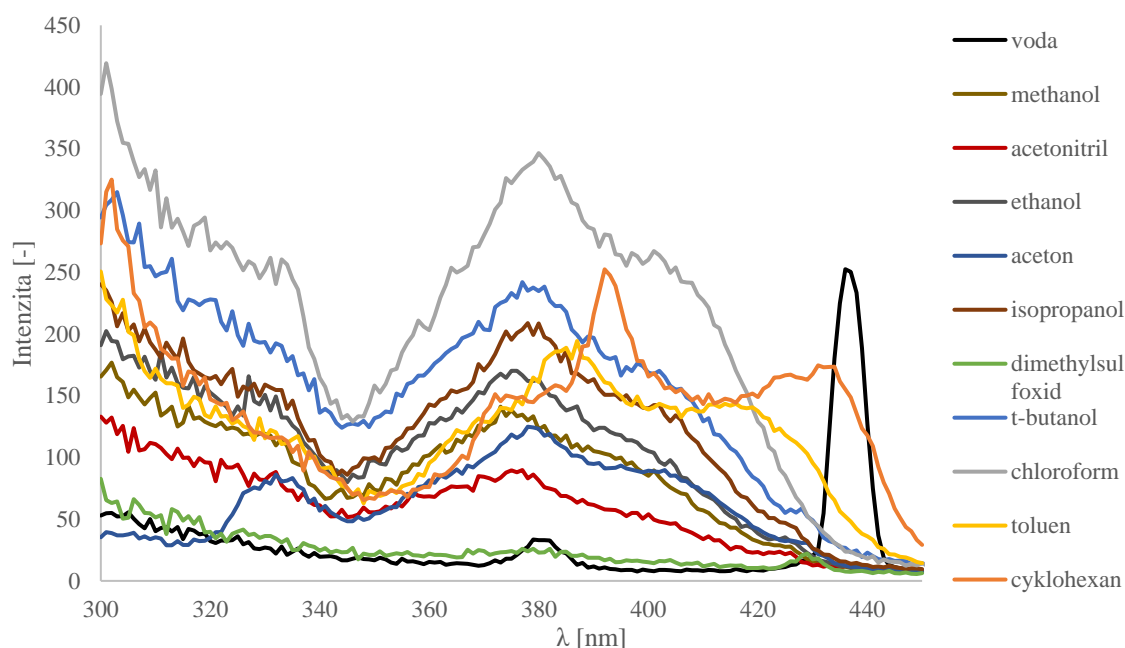
$$\Delta f = f(\epsilon) - f(n^2) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (5)$$

kde ϵ značí dielektrickou konstantu a n značí index lomu [2].

5.1.1 Komplex platiny

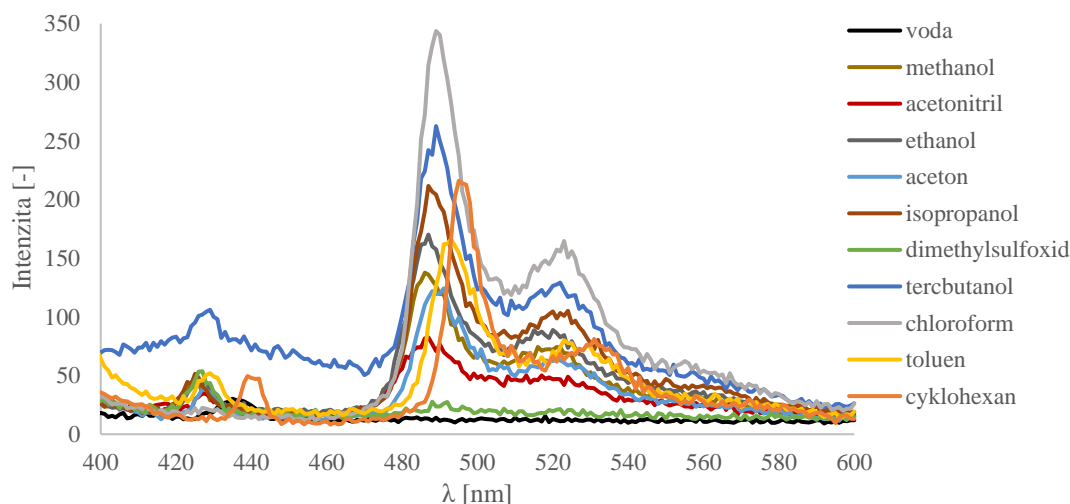
Komplex platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina byl z vybraných sond pro nás nejméně známou molekulou, o které bylo i v dostupných zdrojích k nalezení poměrně malé množství informací. Proto bylo klíčové ověřit a případně definovat důležité spektrální vlastnosti tohoto fluoroforu, jako jsou excitační a emisní maxima a schopnost fluoroforu vykazovat fluorescenci z různých prostředí za dostatečné intenzity. Tato sonda byla vybrána díky jejím unikátním vlastnostem, především velmi dlouhé době života fluorescence, díky čemuž by mohla být využita například pro studium přenosu energie v hydrogelových systémech.

Z níže uvedených excitačních spekter (obrázek 9) fluoroforu v různých rozpouštědlech je patrné, že nejvyšší intenzitu fluorescence sonda vykazuje při excitaci vlnovou délkou přibližně 380 nm. Pouze u toluenu a cyklohexanu, tedy silně nepolárního prostředí, je excitační maximum posunuto k 390 nm. V prostředí dimethylsulfoxidu a vody je v celém excitačním spektru minimální intenzita, z čehož se dalo předpokládat, že v těchto prostředích sonda vůbec nebo téměř vůbec nebude vykazovat fluorescenci, což bylo následně potvrzeno při skenu emisního spektra.



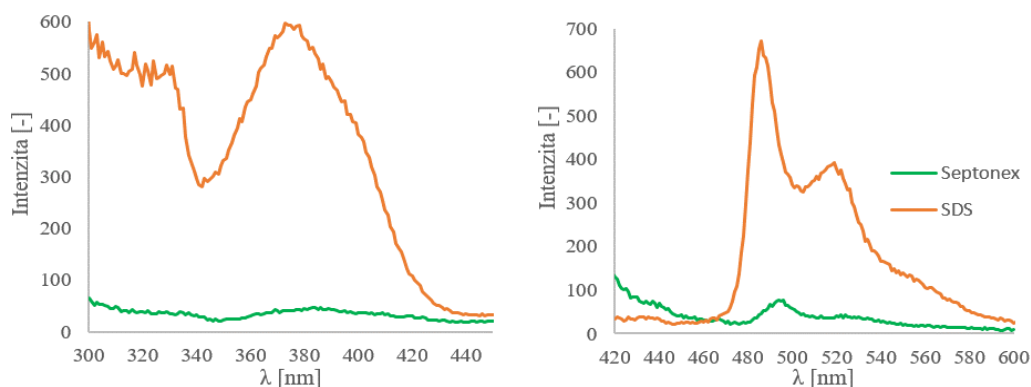
Obrázek 9: Excitační spektra komplexu platiny v různých prostředích

V emisním spektru (obrázek 10) bylo patrné pro všechny prostředí kromě vody a dimethylsulfoxidu maximum intenzity fluorescence při vlnových délkách okolo hodnoty 490 nm. Emisní maximum vykazuje s klesající polaritou prostředí posun směrem k červené oblasti spektra, tedy tzv. bathochromní posun, avšak pouze v jednotkách několika nanometrů. Intenzita emise byla ve všech prostředích relativně nízká, nejvyšší hodnoty dosahovala v prostředí chloroformu, z čehož by bylo možné usoudit, že fluoroforu vyhovuje spíše nepolární prostředí.



Obrázek 10: Emisní spektra komplexu platiny v různých prostředích

V prostředí obou použitých tenzidů byl pozorován markantní rozdíl ve spektrálních vlastnostech sondy (obrázek 11). Z excitačního spektra vyplývá, že maximální intenzita emise by v prostředí SDS měla nastat při excitaci v okolí 375 nm, pro prostředí Septonexu není žádný výraznější pik v excitačním spektru pozorován. U kationaktivního Septonexu je v emisním spektru zřetelný pouze velmi nízký pik s maximem intenzity při 496 nm, u anionaktivního SDS je zřetelný pik s maximem při 486 nm, který v maximu vykazuje téměř desetinásobnou intenzitu oproti Septonexu. Tvarem se spektrum v SDS podobá spektrům ve většině rozpouštědel, nicméně s mnohem větší intenzitou fluorescence, tedy lze předpokládat, že interakce sondy s tenzidem SDS nebo její začlenění do micelární struktury fluorescence podporuje. Oproti tomu spektrum sondy z prostředí roztoku Septonexu, vykazující velmi nízkou intenzitu, by mohlo napovídat o určité formě zhášení fluorescence komplexu platiny v tomto systému, ať už statického nebo dynamického. Možným vysvětlením by byl předpoklad, že fluorescence komplexu zháší velmi silné polární prostředí. K tomuto vysvětlení přispívá téměř nulová intenzita fluorescence sondy ve vodném prostředí (viz. obrázek č.10), tudíž by se dalo předpokládat, že sonda se do micel Septonexu buď téměř nezačleňuje, nebo je přítomna především v povrchové vrstvě prostoupené molekulami vody a její fluorescence je tedy zhášena, zatímco u micel tvořených SDS se sonda začlení do hydrofobního jádra a ke zhášení nedojde.

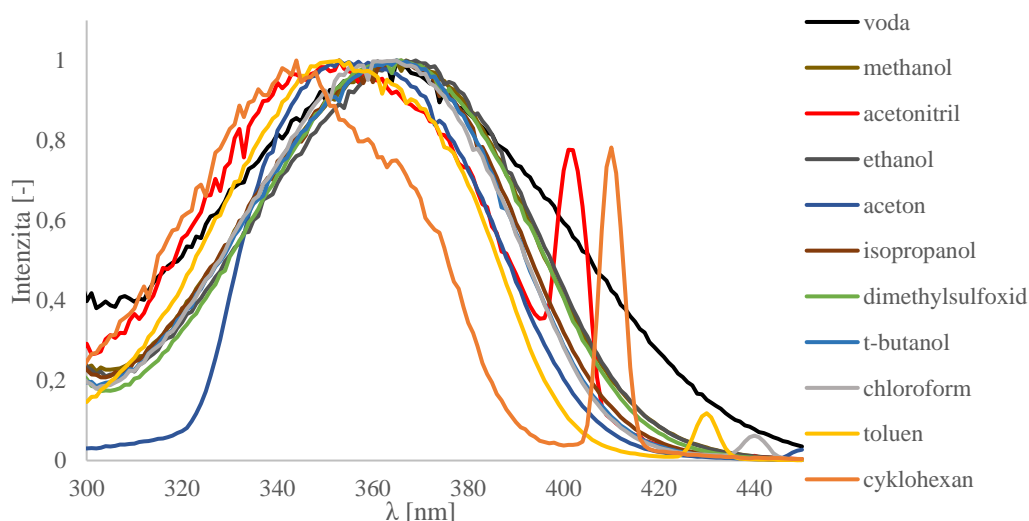


Obrázek 11: Excitační spektrum (vlevo) a emisní spektrum (vpravo) komplexu platiny v tenzidech

5.1.2 Prodan

Fluorescenční sonda prodan byla zvolena pro její schopnost reagovat změnou svých spektrálních vlastností v závislosti na polaritě svého okolního prostředí, čímž se stává vhodným prostředkem pro studium polaritě hydrogelových či jiných, například membránových, systémů. Prodan v různých prostředích vykazuje různě velký Stokesův posun, tedy posun maxima intenzity emisního spektra, které se se vzrůstající polaritou prostředí posouvá blíže k červené oblasti spektra. Abychom získali více informací o velikosti těchto posunů a chování Prodanu v různých prostředích vzhledem k záměru použít tuto sondu pro studium hydrogelových systémů, byla tato sonda zkoumána nejprve opět v prostředích (rozpuštědlech) o různé polaritě a také v příslušných tenzidech tvořících složku následně námi zkoumaných hydrogelů.

Pro vyhodnocení byla excitační i emisní spektra Prodanu pro větší přehlednost normalizována, intenzita fluorescence v každém bodě spektra byla podělena maximální hodnotou intenzity. Maximum intenzity fluorescence se v excitačních spektrech pro různá rozpouštědla mění v rozpětí necelých 30 nm, konkrétně v rozmezí od 344 nm pro cyklohexan až po 369 nm pro ethanol, žádná přímá souvislost mezi polohou maxima a polaritou rozpouštědla zde patrná není (obrázek 12).

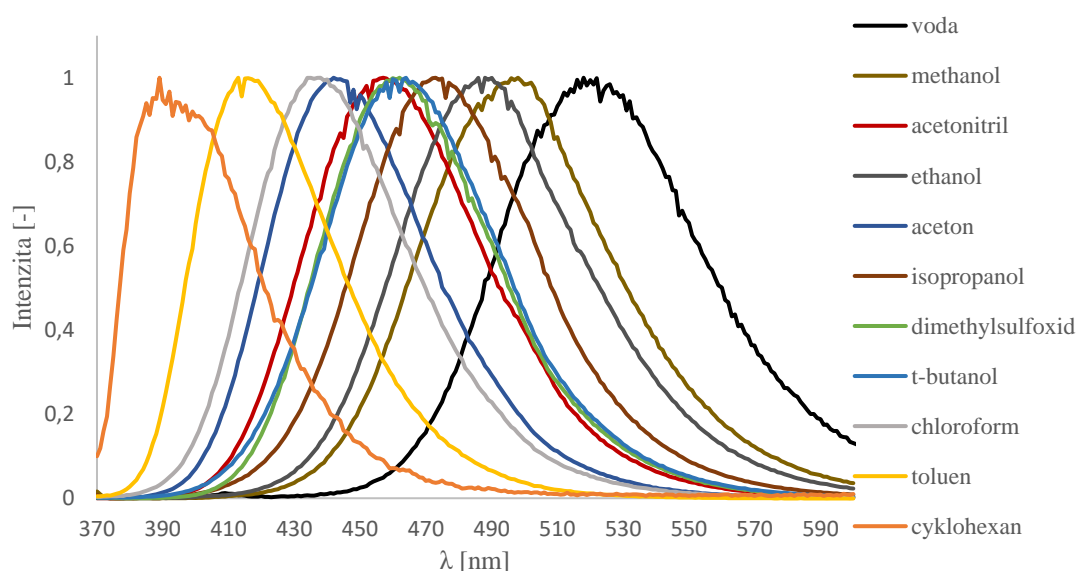


Obrázek 12: Excitační spektra sondy prodanu v různých prostředích

Oproti tomu v emisních spektrech je viditelný posun vlnové délky, při které nastává maximum intenzity, se změnou polaritě prostředí (obrázek 13). Tento jev je nazýván jako tzv. solvatochromismus, konkrétně solvatochromismus pozitivní, kdy se vzrůstající polaritou rozpouštědla dochází k bathochromnímu posunu. Pro naše měření to můžeme nejlépe ilustrovat na příkladu cyklohexanu a vody, tedy nejméně a nejvíce polárního prostředí, kdy pro cyklohexan nastává maximum intenzity emise záření při vlnové délce 389 nm, zatímco pro vodu je toto maximum posunuto o více než 100 nm směrem k červené oblasti spektra, nachází se při vlnové délce 521 nm. Rovněž bylo zjištěno, že posuny ve spektru přesně nekorespondují se změnou orientační polarizovatelnosti prostředí, jako jednoho z parametrů přímo ovlivňujícího solvatochromní posuny, na druhou stranu však pro námi zvolené prostředí přímo sledují změnu relativní polaritě (viz tabulka 3).

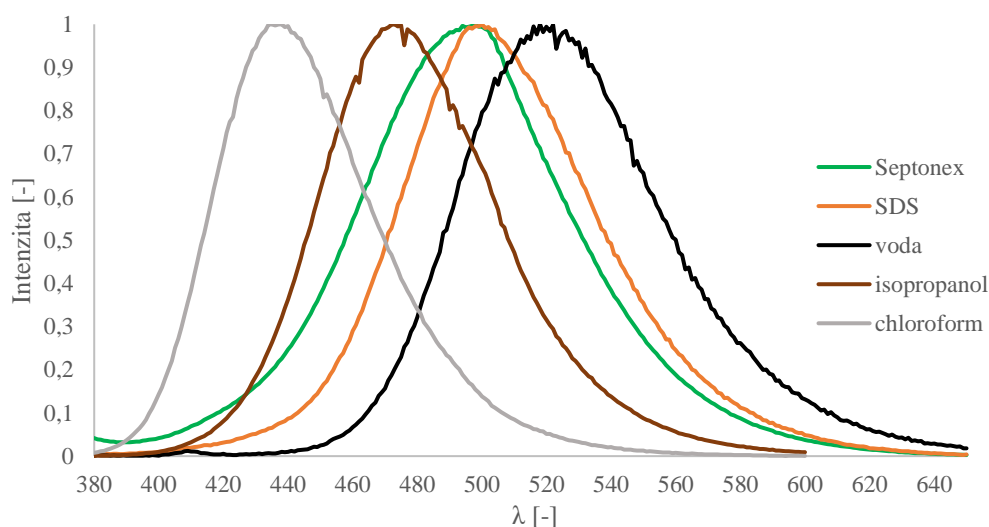
Tabulka 3: Shrnutí efektu prostředí na spektrální vlastnosti prodanu [2, 59]

Prostředí	Excitační max. [nm]	Emisní max. [nm]	Stokesův posun [nm]	Relativní polarita [-]	Orientační polarizovatelnost [-]
voda	363	521	158	1,000	0,320
methanol	367	498	131	0,762	0,309
ethanol	369	488	119	0,654	0,290
isopropanol	366	473	107	0,546	0,272
acetonitril	365	464	99	0,460	0,306
DMSO	366	462	96	0,444	0,265
t-butanol	353	457	104	0,389	0,252
acetonitril	353	442	89	0,355	0,284
chloroform	365	438	73	0,259	0,149
toluen	353	413	60	0,099	0,013
cyklohexan	344	389	45	0,006	-0,001



Obrázek 13: Emisní spektra prodanu v různých prostředích

Z emisních spekter prodanu v prostředí tenzidů můžeme vypočítat, že sonda se nalézá ve zkoumaném systému ve více prostředích lišících se svou polaritou. Sonda se tedy nachází pravděpodobně jak ve vodném prostředí, tak zabudovaná v micelárních strukturách tvořených molekulami tenzidů. V obrázku 14, ve kterém jsou srovnány spektra z prostředí tenzidů a třech různých rozpouštědel o různé polaritě můžeme vidět, že maximum emise sondy v prostředí obou tenzidů nastalo přibližně při hodnotě vlnové délky 500 nm a jejich spektra částečně překrývají jak spektrum ze silně polárního prostředí vody, tak méně polárního prostředí isopropanolu i nepolárního prostředí chloroformu. Proto lze předpokládat, že emisní spektrum z prostředí tenzidů je spektrum složené z příspěvků fluorescence z různých částí micelárního systému, tedy jak z palisádové vrstvy, tak z hydrofobních jader, případně z volného vodného prostředí.

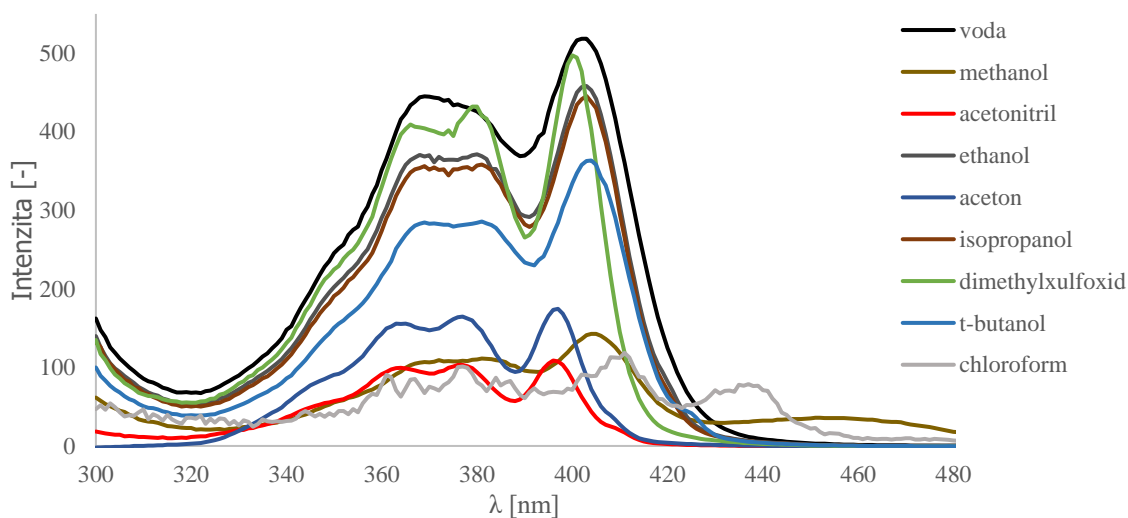


Obrázek 14: Emisní spektrum prodanu z prostředí roztoku tenzidů

5.1.3 HPTS

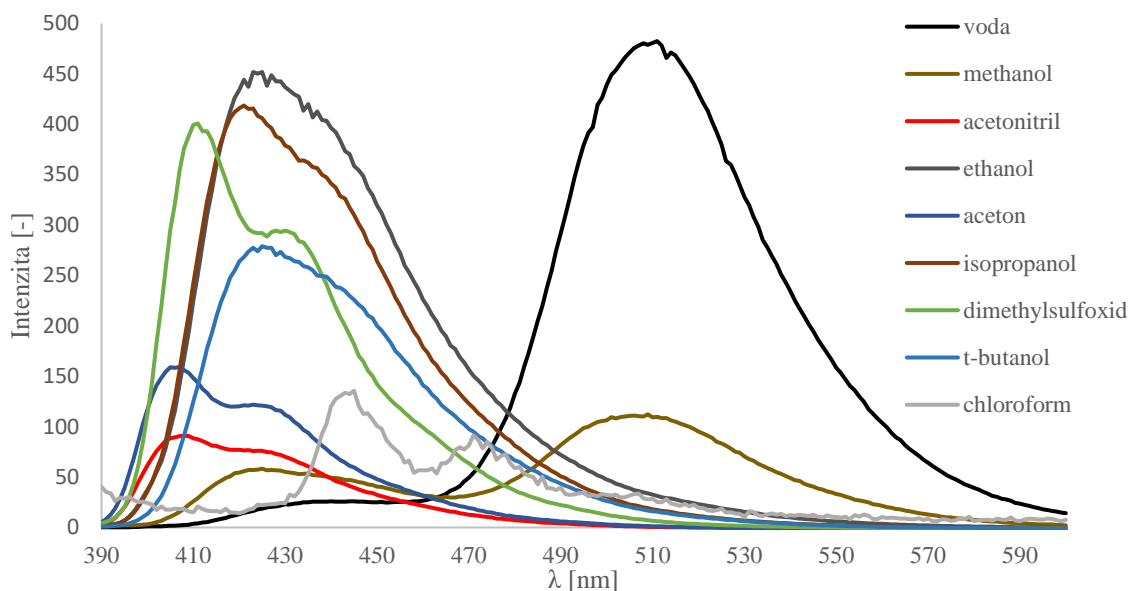
Fluorescenční sonda HPTS byla pro tuto práci zvolena kvůli její schopnosti reagovat změnou svých spektrálních vlastností na hodnotu pH prostředí, ve kterém se sonda nachází. Informace o pH prostředí jsou získávány z poměrů intenzity fluorescence v maximu emisního spektra za dvou různých excitačních vlnových délek 405 nm a 450 nm, kdy jedna odpovídá excitaci protonované formy sondy a druhá formy deprotonované.

Pro zjištění základních charakteristik sondy bylo provedeno měření excitačních a emisních skenů sondy rozpuštěné v různých prostředích, jako tomu bylo u předchozích sond, avšak s výjimkou toluenu a cyklohexanu, jelikož HPTS je jako silně polární látka v těchto nepolárních rozpouštědlech nerozpustná. V excitačním spektru (obrázek 15) můžeme vidět maximum při 405 nm, které odpovídá protonované formě sondy.



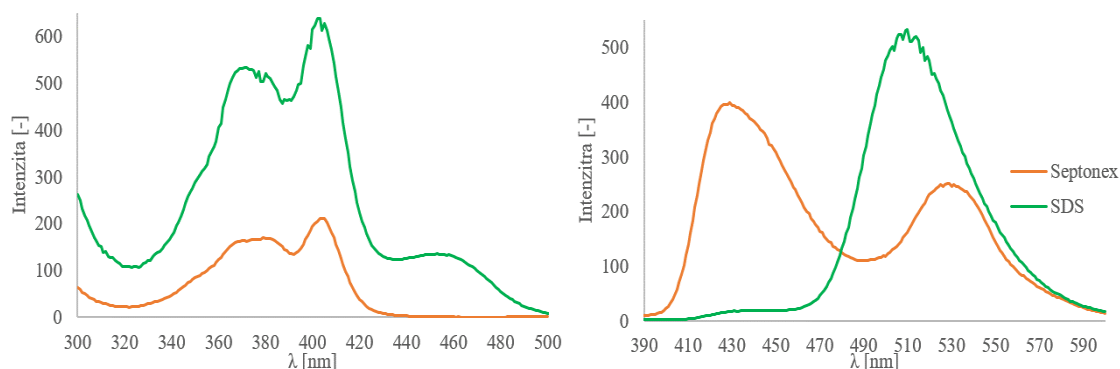
Obrázek 15: Excitační spektra HPTS v různých prostředích

V emisním skenu můžeme vidět, že sonda reaguje na změnu polaritv svého okolního prostředí, což je patrné z posunu maxim emisních spekter a ze změny jejich tvaru, například v prostředí dimethylsulfoxidu se nachází maximum emise při 410 nm a pro methanol při 510 nm (obrázek 16). Emisní spektrum sondy z vodného prostředí, které by mohlo vykazovat podobnost s emisními spektry sondy obsažené v hydrogelu, má maximum intenzity při 511 nm.



Obrázek 16: Emisní spektra HPTS v různých prostředích

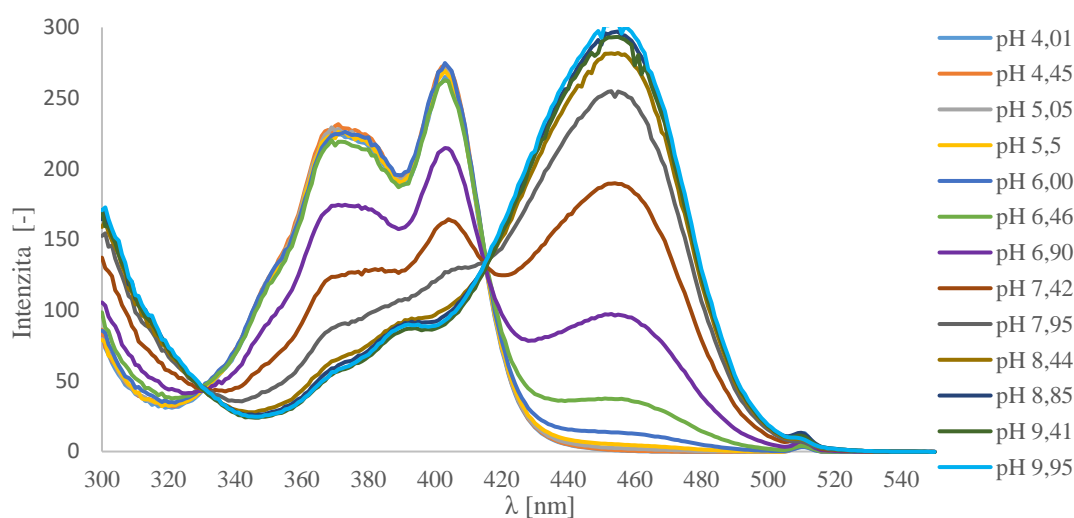
Excitační spektra sondy z prostředí obou používaných tenzidů vykazují podobnost, převažuje protonovaná forma sondy s maximem 405 nm. V prostředí tenzidu je patrné, že malá frakce sondy se nachází v deprotonované formě, což indikuje mírné zvýšení intenzity fluorescence v oblasti okolo 450 nm (obrázek 17).



Obrázek 17: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra HPTS v prostředí tenzidů

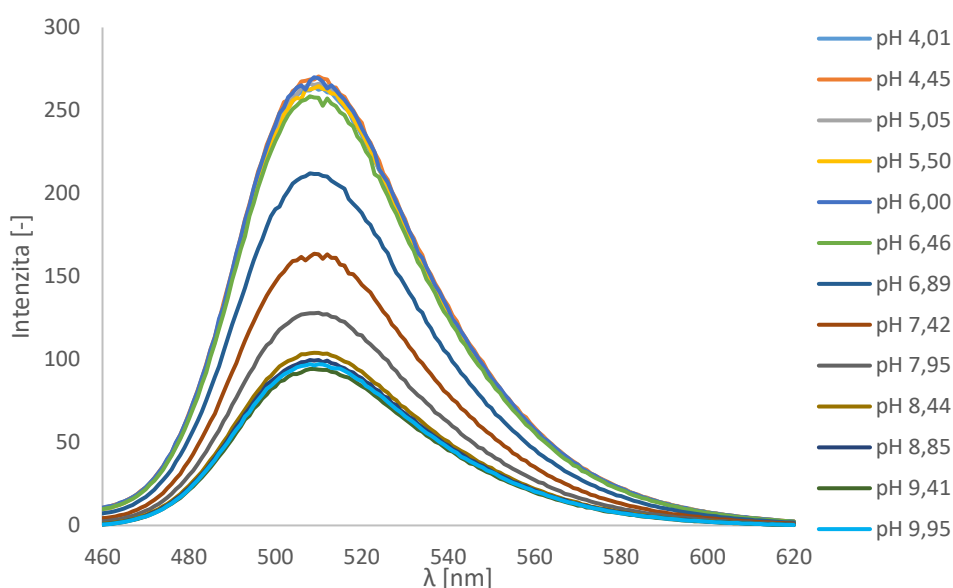
V emisním spektru z prostředí SDS můžeme vidět jeden pík s maximem 510 nm, který svým tvarem i polohou odpovídá emisi z prostředí vody, lze tedy předpokládat, že většina molekul sondy se nachází nezabudovaná do micelárních struktur a emituje tedy z vodného prostředí nebo z povrchu micel, kde se nalézá obklopena molekulami vody. V prostředí roztoku Septonexu můžeme rozeznat dva píky s maximy 430 a 530 nm, což svědčí o tom, že sonda se pravděpodobně nachází ve více prostředích a emituje z vodného prostředí i z micelární struktury, nebo že dochází k tvorbě asociátů.

Pro sondu HPTS, která změnami svých spektrálních charakteristik reaguje na pH svého okolního prostředí, bylo ještě důležitější tyto změny definovat a zjistit, jak se sonda chová v prostředí o různé hodnotě pH. Pro tento účel byl připraven soubor pufrů v rozmezí pH od 4,01–9,95, ve kterém byly vlastnosti HPTS zkoumány. Pro zjišťování pH pomocí fluorescence sondy HPTS je používán poměr intenzity fluorescence při excitaci dvěma různými vlnovými délkami, které odpovídají protonované a deprotonované formě sondy. Nejprve tedy byla proměřena excitační spektra sondy ve všech připravených pufrch (obrázek 18). Bylo zjištěno, že pro pH nižší než 7, tedy v kyselé oblasti škály pH, se nachází excitační maximum v okolí 405 nm odpovídající protonované formě sondy. V pufrch o pH vyšším jak 7, tedy v zásadité oblasti, dochází k deprotonaci hydroxylové skupiny sondy a excitační maximum se posunuje k vyšším vlnovým délkám, konkrétně k 450 nm.

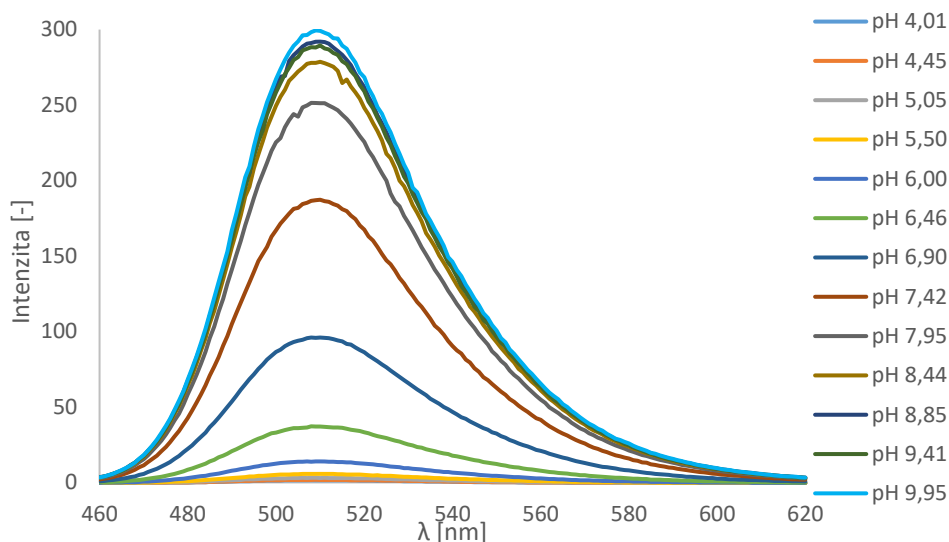


Obrázek 18: Excitační spektra HPTS v prostředí o různém pH

Díky tomuto zjištění tedy byly zvoleny pro excitaci vlnové délky 405 nm a 450 nm. Následně tedy byly snímány emisní skeny za excitace těmito vlnovými délkami. Při nastavení excitačního monochromátoru na 405 nm lze sledovat v emisním spektru pokles intenzity fluorescence v maximu spektra, nacházejícím se při 510 nm, se zvyšující se hodnotou pH prostředí (obrázek 19). Lze tedy sledovat zvyšující se míru deprotonace hydroxylové skupiny sondy nastávající se zvyšující se hodnotou pH. V opačném případě, kdy byla excitace prováděna světelným paprskem o vlnové délce 450 nm, lze v emisním spektru sledovat zvyšující se intenzitu fluorescence v maximu 510 nm se zvyšující se hodnotou pH, což odpovídá deprotonaci sondy, která nastává v alkalickém prostředí (obrázek 20).



Obrázek 19: Emisní spektra HPTS v prostředích o různém pH při excitaci 405 nm

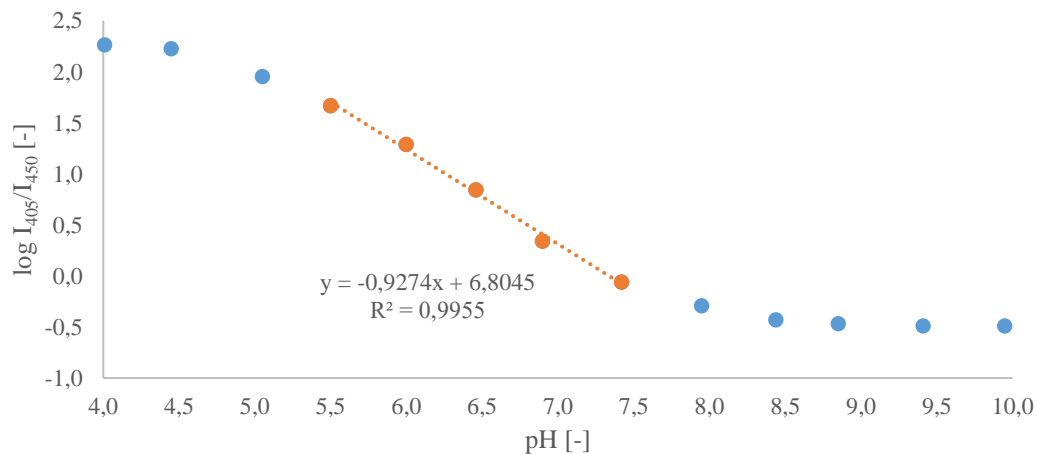


Obrázek 20: Emisní spektra HPTS v prostředích o různém pH při excitaci 450 nm

Z naměřených dat intenzity fluorescence při dvou různých excitačních délkách v prostředí o námi známém pH, uvedených v tabulce 4, byla následně sestrojena kalibrační křivka (viz. obrázek 21), která nám umožní pomocí dosazení poměru intenzity emise fluorescence v maximu 510 nm při excitační vlnové délce 405 nm a 450 nm zjistit hodnotu pH vzorku obsahující HPTS. Z poměrů intenzity fluorescence při excitaci 405 nm a 450 nm byly vypočítány dekadické logaritmy a vypočtené hodnoty byly vyneseny do grafu na osu y, hodnotami pro osu x byly hodnoty pH prostředí, ve kterých se sonda nacházela (tento postup vychází ze článku uvedeném v seznamu citací pod číslem [54]).

Tabulka 4: Hodnoty použité pro sestavení závislosti poměru intenzity fluorescence při excitaci 405 nm a 450 nm na pH prostředí

pH [-]	I ₄₀₅ [-]	I ₄₅₀ [-]	I ₄₀₅ /I ₄₅₀ [-]	log I ₄₀₅ /I ₄₅₀ [-]
4,01	262,41	1,42	183,69	2,26
4,45	270,47	1,60	169,31	2,23
5,05	266,08	2,96	89,89	1,95
5,50	264,35	5,67	46,63	1,67
6,00	269,40	13,82	19,49	1,29
6,46	257,61	36,94	6,97	0,84
6,90	211,68	96,00	2,21	0,34
7,42	163,22	187,27	0,87	-0,06
7,95	128,09	251,18	0,51	-0,29
8,44	103,94	278,65	0,37	-0,43
8,85	99,59	292,01	0,34	-0,47
9,41	93,81	289,46	0,32	-0,49
9,95	97,13	299,14	0,33	-0,49



Obrázek 21: Kalibrační křivka závislosti hodnoty logaritmu poměru intenzity fluorescenci sondy HPTS při excitaci 405 nm a 450 nm na hodnotě pH prostředí

Jak můžeme vidět na obrázku 21, mezi hodnotami pH 5,5–7,5 vykazuje závislost téměř lineární charakter. Tento úsek byl tedy proložen spojnicí trendu ve tvaru přímky, jejíž rovnice v obecném tvaru tvaru:

$$\log \frac{I_{405}}{I_{450}} = -k[pH] + q \quad (6)$$

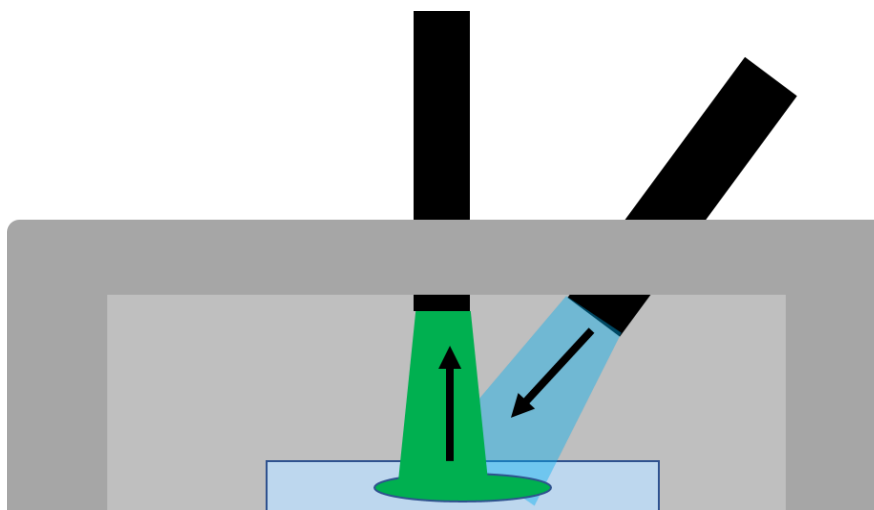
nám dává výpočtový vztah pro poměrně přesné zjištění hodnoty pH prostředí pomocí fluorescence sondy HPTS, pokud se hodnota pH nachází právě v rozmezí 5,5–7,5. Pro zjištění pH prostředí, ve kterém se nachází fluorofor HPTS, je tedy třeba hodnotu logaritmu podílu intenzity fluorescence sondy při excitaci vlnovými délkami 405 nm a 450 nm dosadit do námi získané rovnice:

$$y = -0,9274x + 6,8045 \quad (7)$$

za proměnnou y a poté vyjádřit hodnotu proměnné x , která představuje hodnotu pH zkoumaného prostředí. Můžeme tedy konstatovat, že použití fluorescenční sondy HPTS se zdá být vhodným a jednoduchým prostředkem pro měření pH v hydrogelových systémech v okolí oblasti hodnot pH 5,5–7,5.

5.2 Měření stacionárních fluorescenčních charakteristik vybraných fluorescenčních sond z prostředí hydrogelů

Hlavním úkolem této práce bylo připravit fázově separované hydrogely s inkorporovanými fluorescenčními sondami a poté se pokusit změřit pomocí stacionární fluorescenční spektroskopie jejich fluorescenční charakteristiky. Cílem tedy bylo nejen měření charakteristik vybraných sond, které by nám napovědělo o vlastnostech daných hydrogelových systémů, ale nejprve ověření, zdali je vůbec možné a proveditelné pomocí stacionární fluorescence hydrogelové systémy zkoumat a případně navrhnout vhodný způsob měření. Při měření hydrogelových systému totiž mohou vzniknout problémy, jako je například zakalení hydrogelu nebo vznik vzduchových bublin v jeho struktuře, které by mohly výrazně zkreslit nebo případně znemožnit měření kvůli rozptylu světla. Námi navržený způsob měření spočívající v nanesení tenké vrstvy hydrogelu na krycí sklíčko a následné využití optických kabelů k měření fluorescence, více popsany v kapitole 4.3.2 a schématicky zakreslen na obrázku 22, se ukázal být jako vhodný a použitelný. Fluorescence je sbírána především z povrchové vrstvy hydrogelu naneseného na sklíčko, což eliminuje výše uvedené překážky, které by nastaly např. při měření fluorescence gelu v obvyklé křemenné kyvetě.

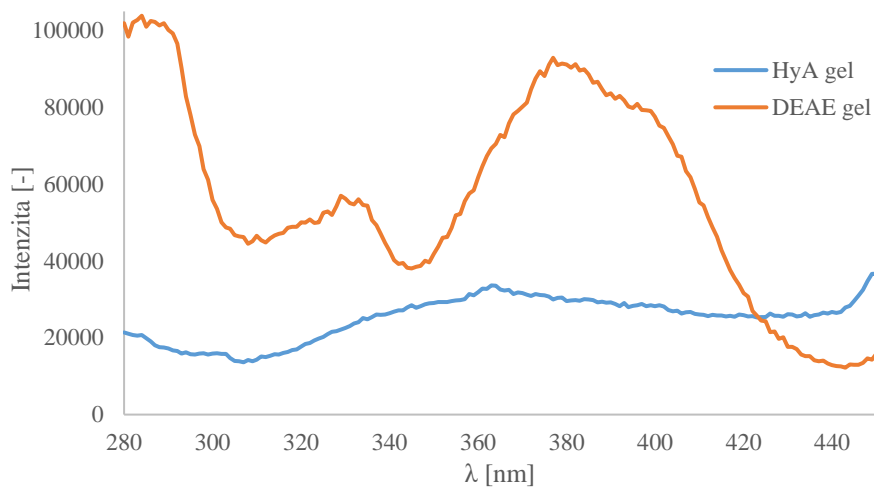


Obrázek 22: Schématický nákres měření fluorescence z prostředí hydrogelů pomocí optických kabelů

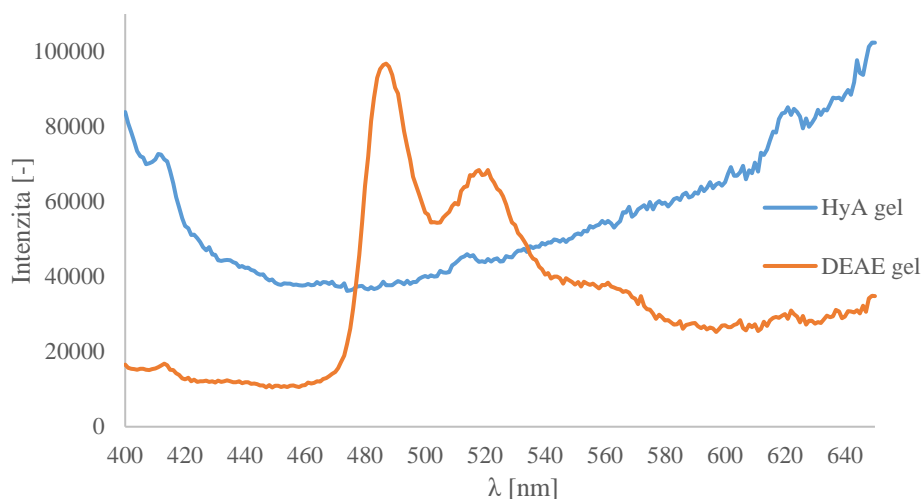
5.2.1 Hydrogely s inkorporovaným komplexem platiny

Jak již bylo zjištěno, komplex platiny vykazuje poměrně nízkou intenzitu fluorescence, a to především v silně polárním vodném prostředí. Excitační maximum této sondy se pohybuje kolem 380 nm a emisní maximum kolem 490 nm. Emise sondy z prostředí roztoku tenzidu Septonexu se velmi podobá emisi z prostředí vody, tudíž lze předpokládat, že se zde nachází sonda v silně polárním prostředí a pravděpodobně se příliš nezačleňuje do micelárních struktur nebo je na jejich povrchu. Oproti tomu v roztoku tenzidu SDS sonda emituje záření s mnohem větší intenzitou a lze předpokládat, že se sonda začleňuje do nepolárního micelárního jádra. Obdobné chování sondy můžeme sledovat z prostředí námi připravených hydrogelových systémů. Hydrogel na bázi dextranu vykazuje výrazně vyšší intenzitu fluorescence, než je tomu

u hydrogelu na bázi hyaluronanu a to i za faktu, že koncentrace komplexu platiny je v hyaluronanovém hydrogelu o řád vyšší, než je tomu v hydrogelu dextranovém. Excitační maximum se pro gel na bázi HyA nachází při 365 nm, pro dextranový hydrogel je maximum posunuto k 380 nm (obrázek 23). V emisním spektru dextranového gelu můžeme vidět maximum při 487 nm, spektrum odpovídá tvarem i polohou maxima emisi z prostředí roztoku SDS. Sonda se tedy nachází pravděpodobně především začleněna do micelárních struktur tvořených molekulami tenzidu. V emisním spektru sondy z prostředí hyaluronanového hydrogelu je patrný pouze nízký pík s maximem při 517 nm, jinak je intenzita emise vzhledem k použité koncentraci sondy relativně nízká (obrázek 24). Tyto informace nám napovídají, že sonda se nachází v systému pravděpodobně nezačleněna do struktur hydrogelu a micel a zůstává ve vodném prostředí, kde dochází k jejímu zhášení.



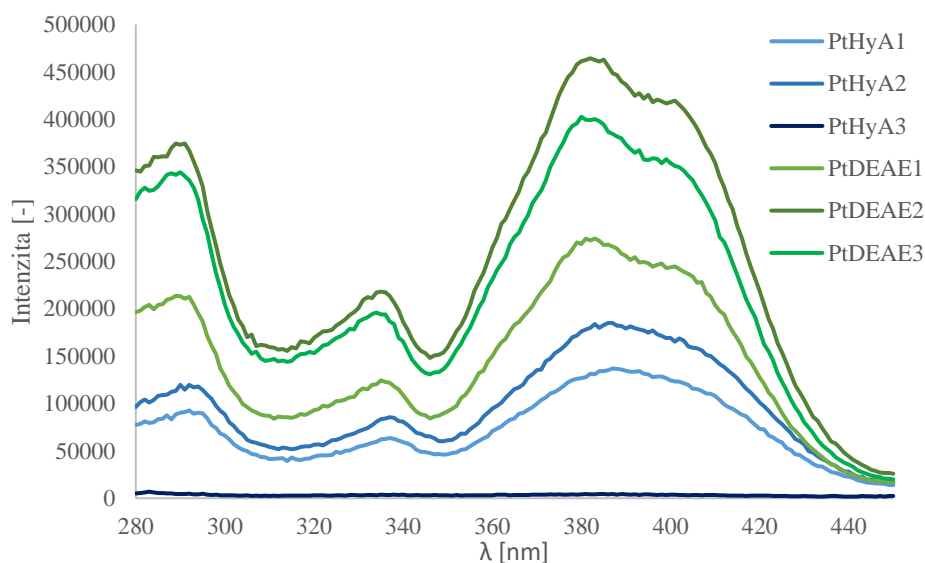
Obrázek 23: Excitační spektra komplexu platiny z hydrogelového prostředí



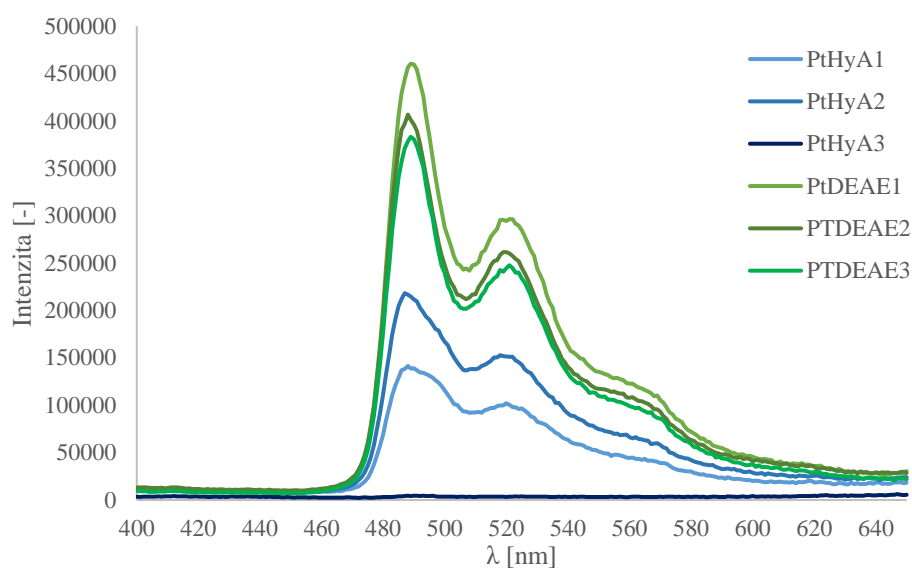
Obrázek 24: Emisní spektra komplexu platiny z hydrogelového prostředí

Rovněž bylo provedeno měření fluorescenčních charakteristik sondy ve vysušeném hydrogelu. Pro každý hydrogel byly provedeny celkem tři měření. První měření proběhlo po sušení probíhající tak dlouho, dokud hydrogel neztratil průhlednost a vizuálně byl považován za suchý. Po prvním měření byl hydrogel na dalších 30 minut umístěn do sušárny a poté opět proměřen. Změna v tvaru spektra by indikovala, že v prvním případě ještě gel nebyl dostatečně vysušen. Je důležité poznamenat, že hydrogely se nedaly považovat za absolutně zbavené vody, ale byly pouze vysušeny do stavu rovnovážné vlhkosti vůči okolnímu prostředí. Třetí měření proběhlo po převrstvení vysušeného hydrogelu vrstvou vody.

Ze získaných fluorescenčních spekter z prostředí dextranových hydrogelů není patrná žádná signifikantní změna ve tvaru spektra nebo poloze maxima intenzity oproti nabobtnanému hydrogelu, a to jak pro vysušené gely, tak pro gely po rehydrataci (obrázky 25 a 26). Zvýšení intenzity fluorescence souvisí se zvýšením koncentrace sondy ve vzorku kvůli odpaření většiny vodného prostředí ze systému. Naopak u hyaluronanových hydrogelů lze pozorovat po vysušení v excitačním i emisním spektru změnu jak tvaru spektra, tak intenzity fluorescence. Spektrum má podobnost se spektrem z prostředí dextranových hydrogelů s maximem intenzity emise při 490 nm. Po následné rehydrataci se však opět mění tvar spektra a rapidně klesá intenzita fluorescence a spektrum opět zaujímá tvar jako u nabobtnaného hydrogelu, což podporuje tezi, že fluorescence komplexu platiny je zhášena silně polárním vodným prostředím.



Obrázek 25: Excitační spektra komplexu platiny z prostředí vysušených a rehydratovaných hydrogelů; číslo 1 představuje první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 rehydratovaný hydrogel

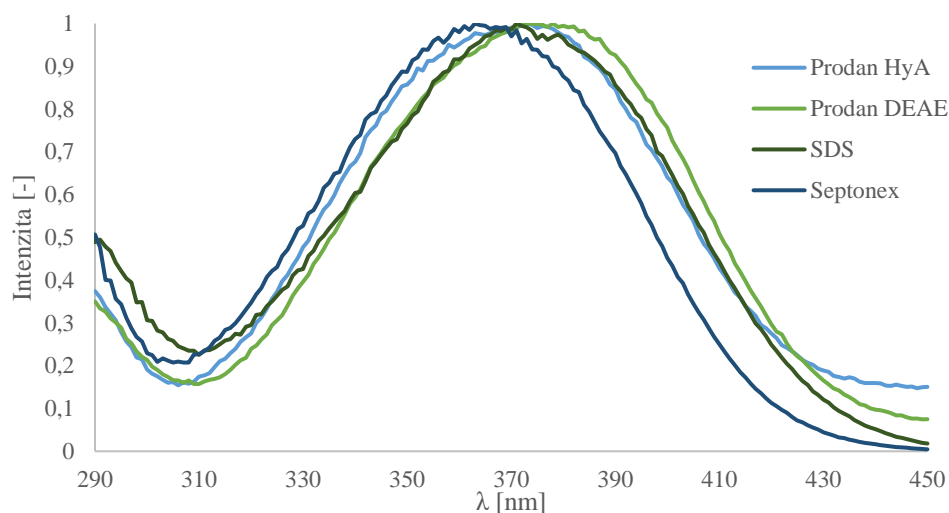


Obrázek 26: Emisní spektra komplexu platiny z prostředí vysušených a rehydratovaných hydrogelů; číslo 1 představuje první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 rehydratovaný hydrogel

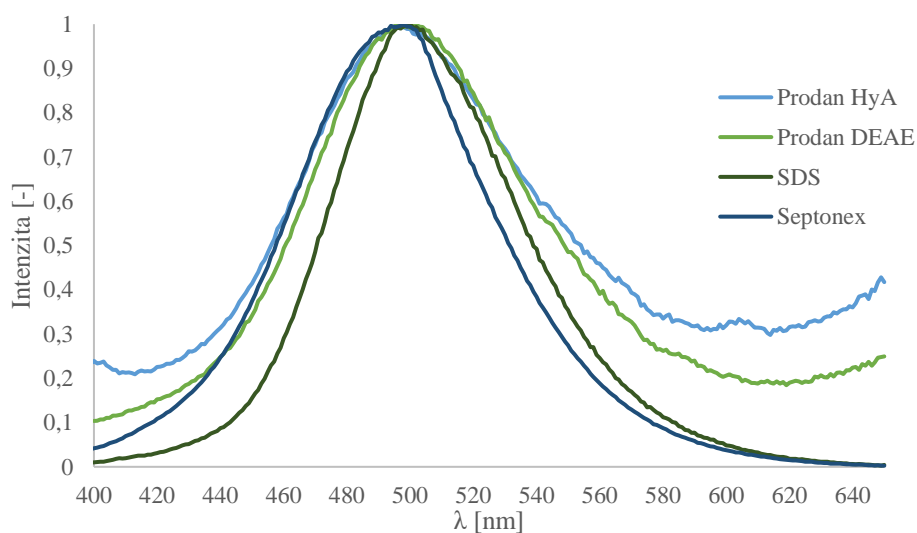
5.2.2 Hydrogely s inkorporovanou sondou Prodan

Jak již bylo potvrzeno předešlými měřeními, fluorescenční sonda Prodan je vhodným prostředkem pro studium polarity systémů, jelikož reaguje posunem maxima emisního spektra na polaritu svého okolního prostředí. Toho by následně mohlo být využito pro studium různých mikrodomén, které se v hydrogelových systémech vyskytují, ať už se jedná o micelární jádra, micelární palisádovou vrstvu, vodné prostředí či řetězce hyaluronanu, jelikož tyto mikrodomény se mimo jiné liší svou polaritou.

Jak můžeme vidět v normalizovaných excitačních i emisních spektrech Prodanu z prostředí hydrogelového systému, excitační i emisní spektra se podobají spektrům z prostředí roztoku příslušného tenzidu (obrázky 27, 28). Emisní maximum se pro hyaluronanový hydrogel nachází v 496 nm, pro dextranových hydrogel v 497 nm. Z podobnosti mezi spektry z hydrogelového prostředí a z prostředí roztoků tenzidů můžeme usuzovat, že distribuce sondy v obou systémech je podobná a Prodan bude obsažen především ve strukturách micel, a to jak v jejich hydrofobním jádře, tak v palisádové vrstvě nebo na povrchu micel. Tento předpoklad podporuje skutečnost, že emisní spektrum Prodanu v micelárním roztoku je spektrum složené, skládající se z příspěvků emise sondy z prostředí o různé polaritě, jako je ilustrováno na obrázku 14. S řetězci polyelektrolytu sonda pravděpodobně příliš neinteraguje. Výše zmíněné zjištění platí jak pro hyaluronanové, tak pro dextranové hydrogely.

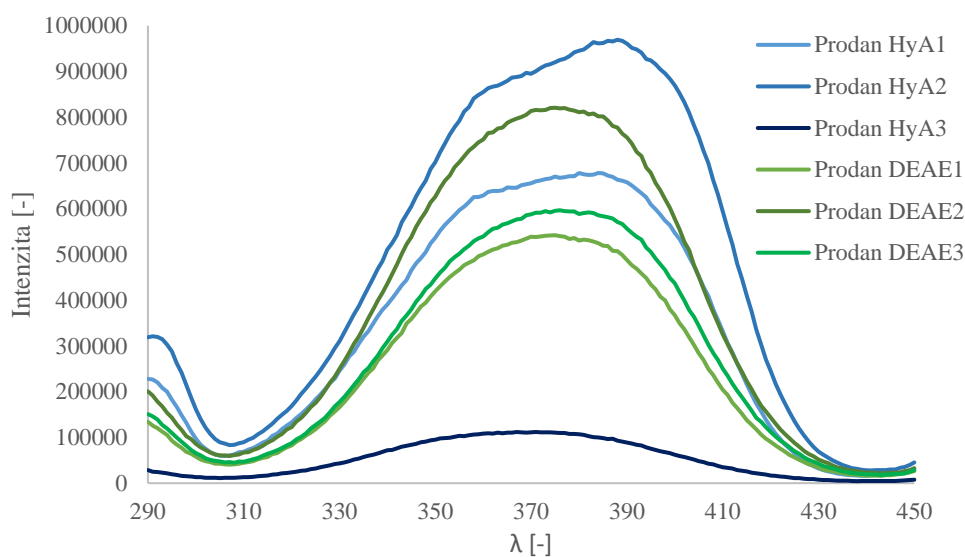


Obrázek 27: Excitační spektra Prodanu z prostředí hydrogelů v porovnání s excitačními spektry z prostředí příslušných tenzidů

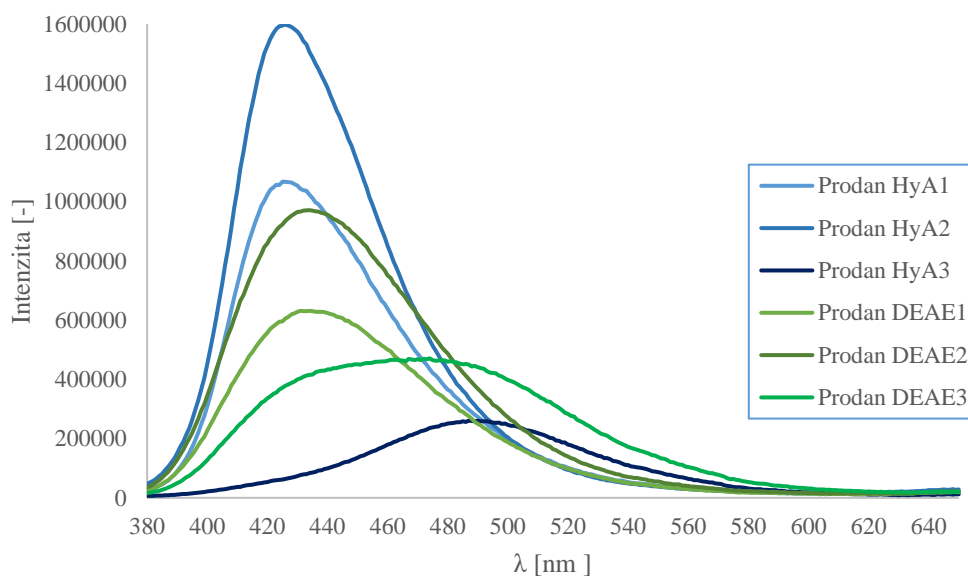


Obrázek 28: Emisní spektra Prodanu z prostředí hydrogelů v porovnání s emisními spektry z prostředí příslušných tenzidů

V emisních spektrech Prodanu z prostředí vysušeného hydrogelu můžeme u obou druhů hydrogelů vidět velmi výrazný posun ke kratším vlnovým délkám (obrázek 30). Tento posun je způsoben rapidním úbytkem vodného prostředí způsobeným vysušením hydrogelu, tedy výrazným úbytkem silně polárního prostředí, ze kterého mohla sonda vykazovat fluorescenci. Po převrstvení vysušeného hydrogelu vodou a jeho rehydrataci je patrný zpětný posun k vyšším vlnovým délkám způsobený zvýšením polarity systému. U dextranových hydrogelů tento posun probíhal pozvolněji, jelikož vysušený hydrogel měl vizuálně kompaktnější strukturu než gel hyaluronanový a jeho rehydratace probíhala pomaleji. V excitačním spektru k výrazným změnám nedošlo (obrázek 29).



Obrázek 29: Excitační spektra sondy Prodanu z prostředí vysušeného a rehydratovaného hydrogelu, číslo 1 značí první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 měření po rehydrataci



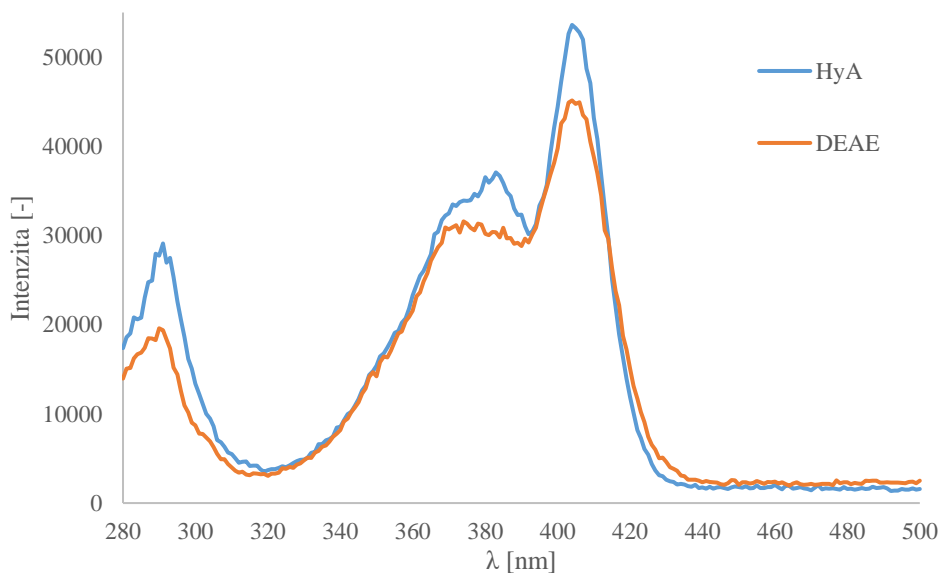
Obrázek 30: Emisní spektra sondy Prodanu z prostředí vysušeného a rehydratovaného hydrogelu, číslo 1 značí první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 měření po rehydrataci

5.2.3 Hydrogely s inkorporovanou sondou HPTS

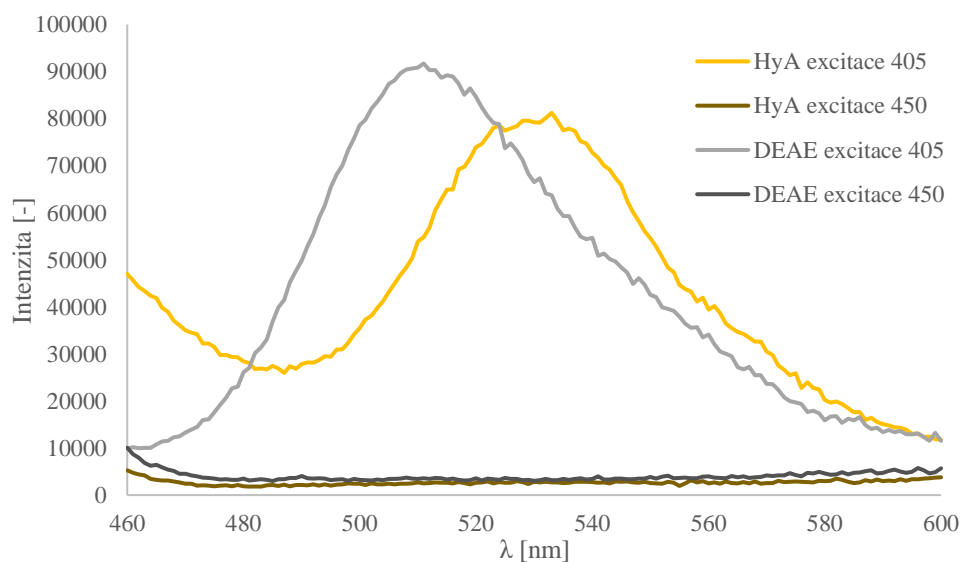
Fluorescenční sonda HPTS umožňuje jednoduché zjištění hodnoty pH hydrogelových systémů. Oproti standartním UV-VIS acidobazickým indikátorům použití sondy HPTS umožňuje využití pokročilejších technik, jako je časově rozlišená fluorescence nebo vizualizace pomocí fluorescenčního mikroskopu, která by umožnila mimo jiné například vytvoření mapy vzorku zobrazující distribuci hodnot pH v systému.

Prvním důležitým krokem, popsaným v kapitole 5.1.3, bylo vytvoření kalibrační křivky závislosti logaritmu poměru intenzity fluorescence při excitaci 405 nm a 450 nm

na hodnotě pH prostředí. Poté již bylo možné přistoupit k měření fluorescence HPTS z prostředí hydrogelů. Z excitačního spektra HPTS lze usoudit, že pH hydrogelu bude v kyselé oblasti, jelikož výrazně převažuje maximum při excitaci 405 nm, které odpovídá protonované formě sondy (obrázek 31).



Obrázek 31: Excitační spektra HPTS z prostředí hydrogelů



Obrázek 32: Emisní spektra sondy HPTS z prostředí hydrogelů při excitaci 405 nm a 450 nm

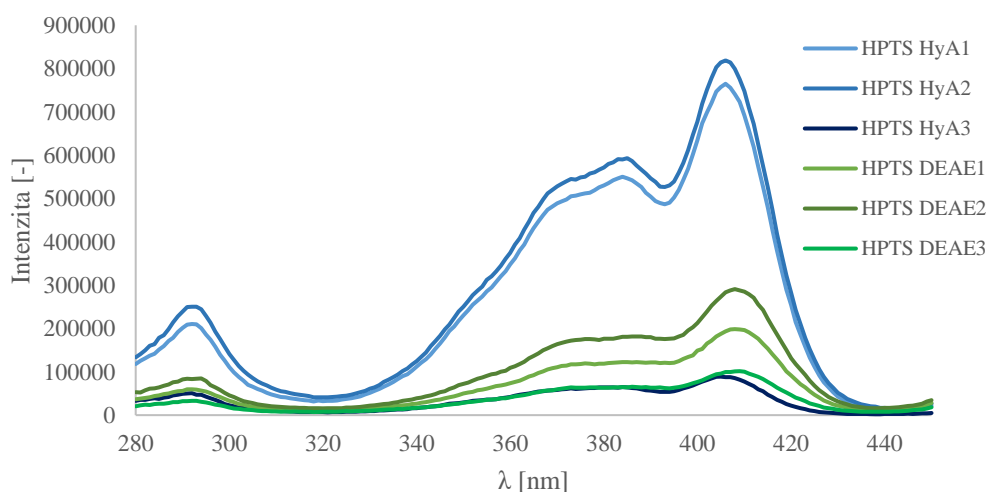
Následně byl na základě naměřených emisních spekter (obrázek 32) vypočítán poměr intenzity fluorescence při excitaci pomocí záření o vlnové délce 405 nm a 450 nm, pro hyaluronanové hydrogely bylo počítáno s intenzitou emise při vlnové délce 530 nm, pro dextranové hydrogely byla zvolena pro výpočet intenzita při vlnové délce 510 nm. Z těchto poměrů byly následně vypočítány dekadické logaritmy a jejich hodnota byla

dosazena do rovnice kalibrační křivky, která je zobrazena na obrázku 21, díky čemuž byla vypočtena hodnota pH hydrogelového prostředí, ve kterém se sonda HPTS nacházela. Hodnoty intenzity potřebné pro výpočet pH i vypočtené hodnoty jsou obsaženy v tabulce 5. Hodnota pH hydrogelu na bázi hyaluronanu byla vypočtena na 5,78 a pro hydrogel na bázi dextransu se hodnota pH rovnala 5,81. Mírně kyselá hodnota pH odpovídá tomu, že se sonda HPTS nachází v hydrogelech především v protonované formě, což bylo dokázáno tím, že excitační maximum sondy se nachází při vlnové délce 405 nm.

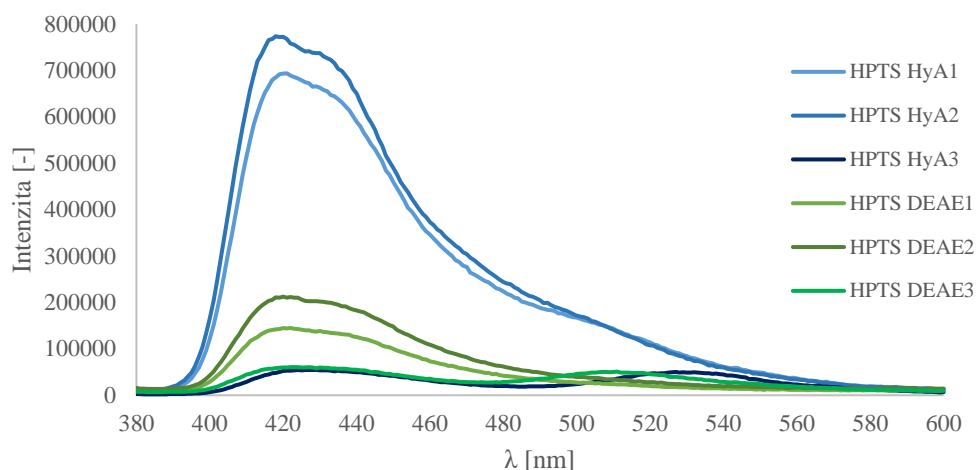
Tabulka 5: Naměřené hodnoty intenzity a vypočítané hodnoty pro zjištění pH hydrogelového prostředí pomocí sondy HPTS

	HyA	DEAE
I_{405} [-]	79208,3	90872,8
I_{450} [-]	2849,71	3470,32
I_{405}/I_{450} [-]	27,79	26,18
$\log I_{405}/I_{450}$ [-]	1,44	1,42
pH [-]	5,78	5,81

Po vysušení hydrogelu můžeme vidět výrazné posunutí emisního spektra (obrázek 34) směrem k modré oblasti způsobené odstraněním polárního vodného prostředí, jelikož sonda HPTS se ukázala být citlivou k polaritním změnám prostředí, jako je viditelné na obrázku č.16. Po převrstvení vysušeného hydrogelu vodou a jeho rehydratování je možné vidět zvyšování intenzity fluorescence v oblasti maxim intenzity spekter nabobtnaných hydrogelů způsobené prostupováním molekul vody do struktury gelu. V excitačním spektru k žádným významnějším posunům nedochází (obrázek 33). Změny v intenzitě fluorescence souvisí se změnou objemu prostředí, ze kterého sonda emituje, v důsledku odpařování nebo dodávání vody.



Obrázek 33: Excitační spektra HPTS z prostředí vysušených a rehydratovaných hydrogelů, číslo 1 značí první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 měření po rehydrataci

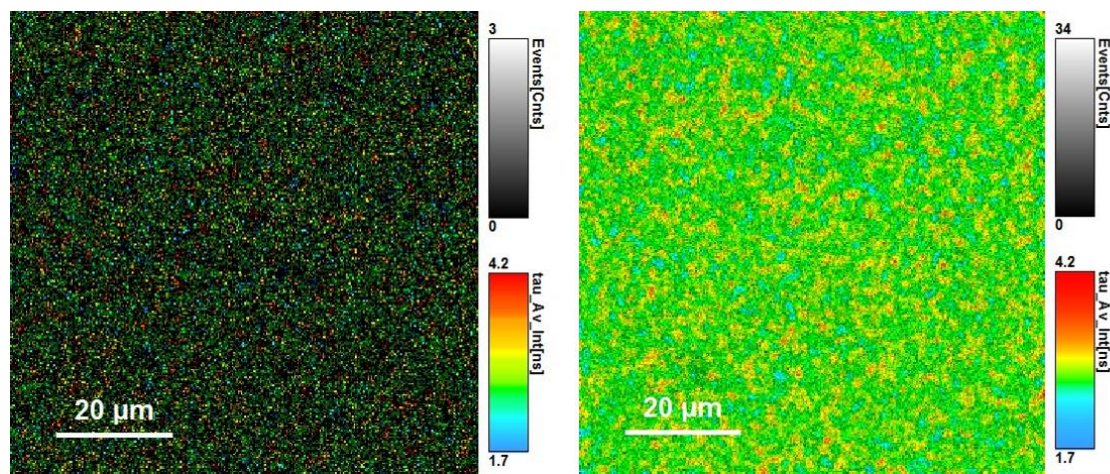


Obrázek 34: Emisní spektra HPTS z prostředí vysušených a rehydratovaných hydrogelů, číslo 1 značí první sušení, číslo 2 druhé sušení a číslo 3 měření po rehydrataci

5.3 Použití fluorescenční mikroskopie

Z předešlých měření bylo usouzeno, že sondy Prodan a HPTS by měly být vhodné pro studium hydrogelů pomocí metody fluorescenční mikroskopie, a to díky tomu, že vykazují dostatečnou intenzitu fluorescence, a především mohou být excitovány pomocí dostupných laserových hlavice. Oproti tomu komplex platiny vykazoval zejména v hydrogelech tvořených hyaluronanem-Septonexem velmi nízkou intenzitu fluorescence a pravděpodobně v těchto systémech docházelo ke zhášení sondy. Pro měření na mikroskopu byly použity pouze gely na bázi hyaluronanu a Septonexu.

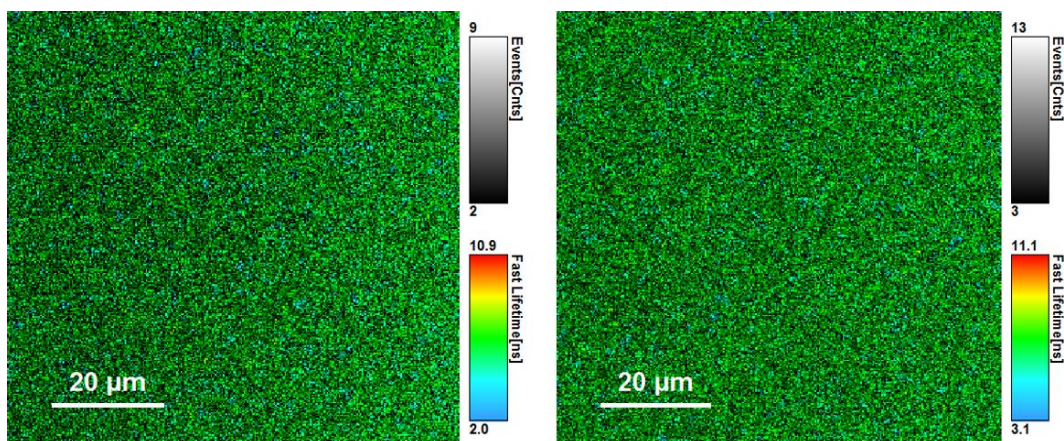
Pro sondu Prodan byly pořízeny snímky pomocí metody FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), což je technika, ve které je kontrast pořízených obrázků založen na rozdílných dobách života fluoroforu ve vzorku. Vzorek byl excitován laserovým paprskem o vlnové délce 370 nm a snímán byl sken o velikosti 300x300 pixelů. Byla provedena dvě měření, první s emisním filtrem 440/40 a druhé s filtrem 520/35.



Obrázek 35: FLIM skeny hydrogelu s inkorporovanou sondou Prodanem, vlevo sken za použití emisního filtru 440/40, vpravo za použití filtru 520/35

Z pořízených obrázků je patrné, že mnohem větší intenzita emise nastává v okně tvořeném emisním filtrem 520/35, tedy v oblasti, kdy emise Prodanu odpovídá silně polárním prostředí (obrázek 35). Toto zjištění tedy koresponduje s výsledky, kterých bylo dosaženo pomocí stacionární fluorescence Prodanu z hydrogelového prostředí.

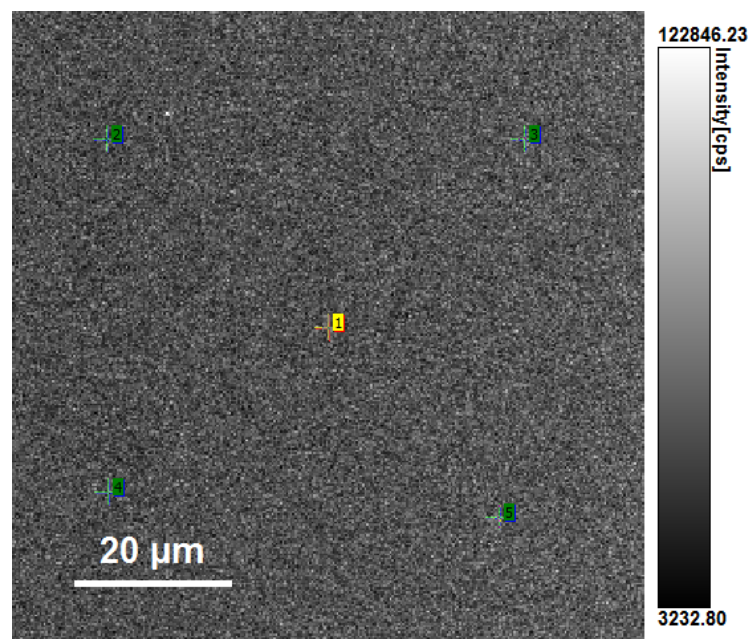
Pro sondu HPTS byly rovněž pořízeny obrázky pomocí FLIM, tentokrát však nebylo použito různých emisních filtrů, ale byly použity dva excitační zdroje, jeden o vlnové délce 405 nm a druhý o vlnové délce 440 nm. Velikost pořízeného skenu byla opět 300x300 pixelů.



Obrázek 36: FLIM skeny hydrogelu s inkorporovanou sondou HPTS, vlevo excitace sondy vlnovou délkou 405 nm, vpravo excitace vlnovou délkou 440 nm

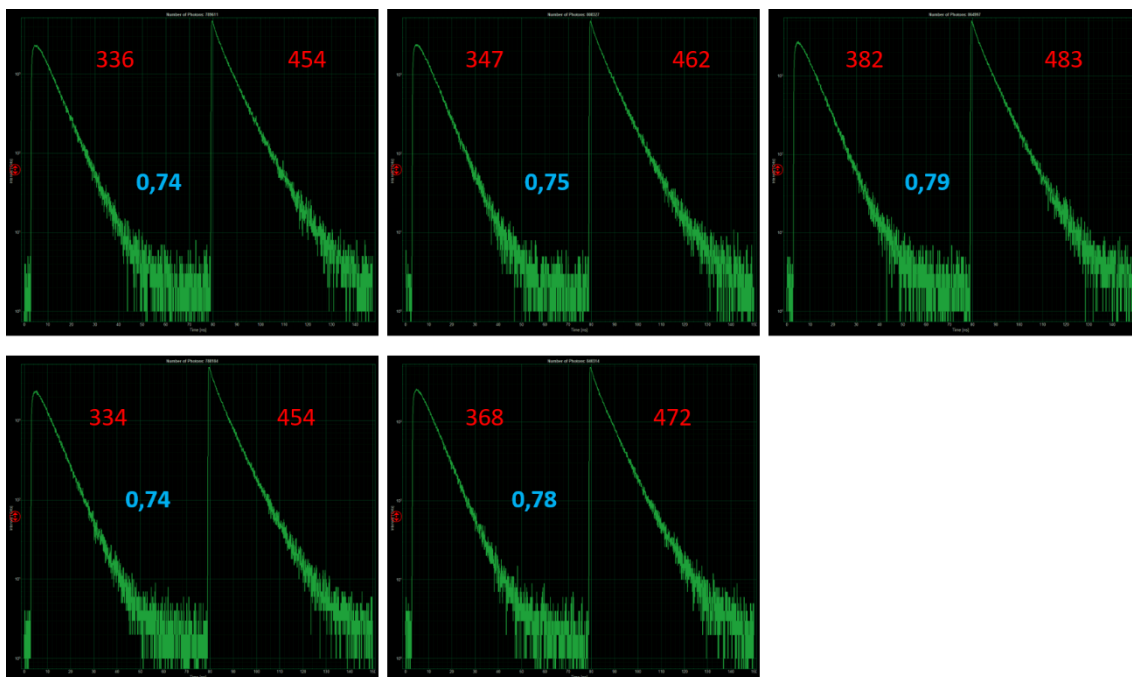
Mezi oběma excitacemi je patrná mírně odlišná distribuce intenzity, a tedy i odpovídajících dob života HPTS (obrázek 36). Excitace HPTS vlnovou délkou 405 nm přísluší protonované formě sondy a excitace 440 nm by měla příslušet deprotonované formě. Nicméně není možné předpovědět, jestli při použití vlnové délky 440 nm nedochází k částečné excitaci protonovaných molekul sondy. Možným řešením by tedy bylo použití excitačního zdroje o vlnové délce 470 nm pro excitace deprotonovaných molekul sondy ve vzorku.

Pro sondu HPTS bylo rovněž provedeno měření v režimu PIE TCSPC, tedy Pulsed Interleaved Excitation Time Correlated Single Photon Counting, spočívající v excitaci vzorku dvěma po sobě jdoucími, avšak dokonale oddělenými pulsy o různých vlnových délkách a následné detekci jednotlivých vyzářených fotonů. Z pořízené mapy hydrogelu se sondou HPTS bylo vybráno pět bodů (obrázek 37), pro které byla provedena excitace nejprve vlnovou délkou 405 nm a poté 440 nm a byl sledován počet jednotlivých fotonů zachycených detektorem při jednotlivých excitacích.



Obrázek 37: Mapa hydrogelu se sondou HPTS zobrazující vybrané vody pro PIE měření

Z počtu zachycených fotonů bylo zjištěno, že toto měření neodpovídá námi získaným informacím ze stacionární fluorescence. Jelikož bylo zjištěno, že excitační maximum 405 nm odpovídá protonované formě sondy a také, že pH hydrogelu je v kyselé oblasti a sonda by se v jeho struktuře měla vyskytovat především právě v protonované formě, tak by dle předpokladu měl počet fotonů zachycených při excitaci 405 nm převyšovat počet fotonů zachycených při excitaci sondy 440 nm excitačním pulsem. Trend však byl pro tato měření přesně opačný, vyššího počtu detekovaných fotonů bylo dosaženo při excitaci 440 nm (obrázek 38). Proto v tomto případě není možné vycházet ze závislosti intenzity emise při excitaci 405/450 nm na pH, získané při měření pomocí stacionární fluorescence, ale pro další měření pomocí PIE TCSPC bude nutné prozkoumat závislost počtu detekovaných fotonů při excitaci 405/440 nm na pH prostředí. Dalším navrhovaným krokem je tedy připravení roztoků pufrů o známém pH se sondou HPTS a proměření závislosti detekovaných fotonů na hodnotě pH. Poté bude možné určit, jestli tato závislost bude v určitém rozsahu pH vykazovat lineární charakter a bude tedy použitelná pro zjišťování pH hydrogelů nebo jiných vzorků touto metodou. Dalším možným směrem je také studium ovlivňování doby života fluorescence sondy HPTS různým pH prostředí.



Obrázek 38: Závislost počtu detekovaných fotonů na době života fluorescence HPTS při excitaci pulsy o vlnové délce 405 nm (první pík závislosti) a 440 nm (druhý pík závislosti), červená čísla představují počet detekovaných fotonů v tisících, modrá čísla poměr mezi hodnotami detekovaných fotonů

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat pomocí metody stacionární fluorescence vybrané fluorescenční sondy Prodan, HPTS a komplex platiny [2,6-Bis(2-pyridyl)fenyl-C,N,N']chloroplatina(II) v různých prostředích, následně připravit fázově separované hydrogely na bázi interakce polyelektrolyt-tenzid a stanovit stacionární fluorescenční charakteristiky inkorporovaných sond z hydrogelového prostředí a na základě měření odhadnout lokalizace těchto sond v hydrogelové matici a vyhodnotit získané informace o vlastnostech připravených hydrogelů.

Nejprve tedy byl sestaven soubor rozpouštědel s různou polaritou, ve kterých byly sondy rozpuštěny a byly proměřeny jejich základní fluorescenční charakteristiky pomocí metody ustálené fluorescence. Pro komplex platiny, vybraný kvůli jeho výjimečným fluorescenčním vlastnostem, jako je například velmi dlouhá doba života, byla zjištěna pro většinu prostředí velmi nízká intenzita fluorescence a excitační maximum při 380 nm a emisní maximum při 490 nm. Výjimku tvořilo vodné prostředí, kdy byla intenzita fluorescence téměř nulová, což napovídá o možném zhášení. V roztoku tenzidu Septonexu byla opět zjištěna velmi nízká intenzita fluorescence, což značí, že sonda se v tomto případě nezačleňuje do micel, nebo pouze do jejich povrchových struktur, kde je v kontaktu s molekulami vody a dochází ke zhášení. U roztoku tenzidu SDS je naopak patrná výrazně vyšší intenzita, což značí, že se sonda zabudovává do hydrofobních částí micel.

Pro sondu Prodan, reagující na polaritu prostředí, byly sledovány především posuny maxima intenzity fluorescence emisního spektra v závislosti na konkrétním prostředí. Se zvyšující se polaritou rozpouštědla byl sledován výrazný bathochromní posun maxima intenzity emise, pro silně polární vodné prostředí se maximum nacházelo při 521 nm, pro nepolární cyklohexan při 389 nm. Excitační maxima pro všechna rozpouštědla se nacházela v rozmezí přibližně 340–360 nm. Emisní spektra prodanu z roztoku tenzidů ukazují, že se sonda nachází v prostředích o různé polaritě a je tedy zabudována do různých částí tohoto systému.

Charakteristiky sondy HPTS reagující na pH prostředí byly rovněž sledovány ve vybraných rozpouštědlech, ale především byl pro tuto sondu připraven soubor pufrů o hodnotě pH přibližně 4–10, ve kterých byla sledována závislost intenzity fluorescence HPTS při excitaci vlnovými délkami 405 nm a 450 nm, tedy při vlnových délkách odpovídajících protonované a deprotonované formě sondy, na hodnotě pH prostředí. Z naměřených dat byla sestrojena kalibrační křivka této závislosti a bylo zjištěno, že sonda je vhodná pro relativně přesné měření pH v oblasti 5,5–7,5. V prostředí roztoku tenzidu SDS vykazuje emisní spektrum velkou podobnost s emisním spektrem z prostředí vody, sonda je tedy pravděpodobně lokalizována na povrchu micel nebo se do nich nezačleňuje a zůstává ve vodném prostředí. V prostředí tenzidu Septonexu můžeme vidět v emisním spektru dva píky, sonda je tedy lokalizována ve více prostředích, pravděpodobně na povrchu i uvnitř micel, nebo u ní dochází k tvorbě asociátů.

Dalším krokem bylo připravení fázově separovaných hydrogelů s inkorporovanými fluorescenčními sondami. Byly připraveny dva druhy hydrogelů, první na bázi hyaluronanu a Septonexu a druhý na bázi dextransu a SDS. Následně byly změřeny charakteristiky sond z hydrogelového prostředí pomocí ustálené fluorescence. Jako způsob měření bylo zvoleno použití optických kabelů, z nichž jeden přiváděl excitační

záření a druhý snímal fluorescenci vzorku naneseného na podložním skličku. Emisní spektrum komplexu platiny v hyaluronanovém hydrogelu se ukázalo být diametrálně odlišné od spektra v dextranovém hydrogelu. V prvním případě nebyl v emisním spektru pozorován žádný výraznější pík a intenzita emise byla velmi nízká, sonda se nacházela v hydrogelové matici pravděpodobně lokalizována na povrchu micel nebo ve volném vodném prostředí a docházelo nejspíše k zmíněnému zhášení způsobenému polárním vodným prostředím. V případě dextranových hydrogelů je patrný pík přibližně při 480 nm a sonda je lokalizována pravděpodobně v hydrofobní části micel.

Spektrální vlastnosti sondy Prodan z prostředí hydrogelů se tvarem spektra i polohou maxima podobají fluorescenci z roztoků příslušných tenzidů, lze tedy předpokládat, že se sonda nachází lokalizována v různých částech micelárních struktur a s řetězci polyelektrolytů příliš neinteraguje.

Pro sondu HPTS byla provedena měření intenzity emise pro excitační vlnové délky 405 nm a 450 nm a následně bylo využito rovnice vytvořené kalibrační křivky závislosti poměru intenzity emise fluorescence při těchto excitačních vlnových délkách na hodnotě pH prostředí a bylo vypočítáno pH hydrogelů, které pro hyaluronanový hydrogel činilo 5,78 a pro dextranový 5,81.

Pro všechny gely byla rovněž provedena měření ve vysušeném stavu a po následné rehydrataci. U všech hydrogelů byly ve spektrech pozorovány změny související s odpařením polárního vodného prostředí, u Prodanu a HPTS došlo k posunům směrem k modré oblasti souvisejících se snížením polarizace systému. U hyaluronanového hydrogelu s inkorporovaným komplexem platiny došlo po vysušení k výraznému nárůstu intenzity fluorescence, což opět podporuje předpoklad, že tato sonda je zhášená polárním vodným prostředím. Po rehydrataci se charakteristiky všech hydrogelů vrátily do původních hodnot nabobtnaných gelů.

Ze získaných informací o vlastnostech zkoumaných sond a jejich chování v hydrogelovém prostředí bylo usouzeno, že sondy Prodan a HPTS jsou díky svým vlastnostem rovněž vhodné pro použití s dalšími technikami, především s časově rozlišenou fluorescencí a fluorescenční mikroskopií. Následně byla provedena základní měření pomocí fluorescenčního mikroskopu metodami FLIM a PIE TCSPC, které tento předpoklad k dalšímu využití Prodanu a HPTS podporují. Proto další výzkum v oblasti studování vlastností hydrogelů pomocí vybraných fluorescenčních sond by mohl pokračovat právě směrem k využití těchto pokročilejších fluorescenčních technik.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Second edition. Chichester, England: Wiley-VCH Verlag, 2012. ISBN 978-3-527-32837-6.
- [3] GOLDYS, Ewa M. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J., c2009. ISBN 978-047-0083-703.
- [4] DAVID M. JAMESON. *Introduction to fluorescence*. London, 2012. ISBN 14-398-0605-5.
- [5] SAUER, Markus, Johan. HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles*. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [6] MARINI, Alberto, Aurora MUÑOZ-LOSA, Alessandro BIANCARDI a Benedetta MENNUCCI. What is Solvatochromism?. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, 114(51), 17128-17135. DOI: 10.1021/jp1097487. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp1097487>
- [7] MATAGA, Noboru, Yozo KAIFU a Masao KOIZUMI. Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. DOI: 10.1246/bcsj.29.465. ISBN 10.1246/bcsj.29.465. Dostupné také z: <http://www.journal.csj.jp/doi/10.1246/bcsj.29.465>
- [8] OLIVEIRA, Elisabete, Emilia BÉRTOLO, Cristina NÚÑEZ, et al. Green and Red Fluorescent Dyes for Translational Applications in Imaging and Sensing Analytes: A Dual-Color Flag. *ChemistryOpen*. 2018, 7(1), 9-52. DOI: 10.1002/open.201700135. ISSN 21911363. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/open.201700135>
- [9] RAGUŽ, Marija a Jasminka BRNJAS-KRALJEVIĆ. Resolved Fluorescence Emission Spectra of PRODAN in Ethanol/Buffer Solvents. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2005, 45(6), 1636-1640. DOI: 10.1021/ci050166p. ISSN 1549-9596. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci050166p>
- [10] HARIANAWALA, Abizer I a Robin H BOGNER. Sensitivity and selectivity of p-(N-dimethylamino cinnamylidene) malononitrile, 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene (PRODAN) and fluorescein. *Journal of Luminescence*. 1998, 79(2), 97-105. DOI: 10.1016/S0022-2313(98)00034-9. ISSN 00222313. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231398000349>
- [11] ADHIKARY, Ramkrishna, Charles A. BARNES a Jacob W. PETRICH. Solvation Dynamics of the Fluorescent Probe PRODAN in Heterogeneous Environments: Contributions from the Locally Excited and Charge-Transferred States. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, 113(35), 11999-12004. DOI: 10.1021/jp905139n. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp905139n>
- [12] KUMAR, Rajnish, Ramkeval YADAV, Mangesh A. KOLHE, Rajesh S. BHOSALE a Ramanuj NARAYAN. 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) based high fluorescent, pH stimuli waterborne polyurethane coatings. *Polymer*. 2018, 136, 157-165. DOI: 10.1016/j.polymer.2017.12.056. ISSN 00323861. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386117312284>

- [13] AWASTHI, Ankur A. a Prabhat K. SINGH. Excited-State Proton Transfer on the Surface of a Therapeutic Protein, Protamine. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2017, 121(45), 10306-10317. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b07151. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.7b07151>
- [14] ALARCOS, Noemí, Boiko COHEN a Abderrazzak DOUHAL. A slowing down of proton motion from HPTS to water adsorbed on the MCM-41 surface. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016, 18(4), 2658-2671. DOI: 10.1039/C5CP04548G. ISSN 1463-9076. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CP04548G>
- [15] BOTCHWAY, S. W., M. CHARNLEY, J. W. HAYCOCK, A. W. PARKER, D. L. ROCHESTER, J. A. WEINSTEIN a J. A. G. WILLIAMS. Time-resolved and two-photon emission imaging microscopy of live cells with inert platinum complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105(42), 16071-16076. DOI: 10.1073/pnas.0804071105. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804071105>
- [16] MUNJANJA, Basil a Edmond SANGANYADO. UV-Visible Absorption, Fluorescence, and Chemiluminescence Spectroscopy. *Handbook of Food Analysis, Third Edition - Two Volume Set*. CRC Press, 2015, 2015-06-10, , Vol II-575-Vol II-589. DOI: 10.1201/b18668-73. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné také z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b18668-73>
- [17] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [18] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [19] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [20] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [21] WANG, Sui, Zheng ZHANG, Bing CHEN, Jia SHAO a Zhiyong GUO. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018, 135(17), 46143-. DOI: 10.1002/app.46143. ISSN 00218995. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.46143>
- [22] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT. Hydrogel Biomaterials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech, 2011, 2011-08-01. DOI: 10.5772/24856. ISBN 978-953-307-309-5. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>
- [23] OKAY, O. General Properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2009-8-11, , 1-14. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. DOI: 10.1007/978-3-540-75645-3_1. ISBN 978-3-540-75644-6. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75645-3_1
- [24] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech, 2011, 2011-08-01. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5. 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>

- [25] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogel biomaterials: A smart future?. *Biomaterials*. 2007, 28(34), 5185-5192. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005819>
- [26] CALÓ, Enrica a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015, 65, 252-267. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305714004091>
- [27] LIN, Chien-Chi a Andrew T. METTERS. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, 58(12-13), 1379-1408. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.004. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X06001694>
- [28] BAHRAM, Morteza, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. InTech, 2016, 2016-08-24. DOI: 10.5772/64301. ISBN 978-953-51-2509-9. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/an-introduction-to-hydrogels-and-some-recent-applications>
- [29] CARRILLO, Jan-Michael Y. a Andrey V. DOBRYNIN. Polyelectrolytes in Salt Solutions: Molecular Dynamics Simulations. *Macromolecules*. 2011, 44(14), 5798-5816. DOI: 10.1021/ma2007943. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma2007943>
- [30] GARG, Hari G. a Charles A. HALES. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Boston: Elsevier, c2004. ISBN 00-804-4382-6.
- [31] KHABAROV, V. N., P. Ya. BOYKOV a M. A. SEL'YANIN. *Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine*. Chichester, West Sussex, 2015. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [32] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, 29(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [33] LIU, Chao, Min WANG, Junxue AN, Esben THORMANN a Andra DĚDINAITĚ. Hyaluronan and phospholipids in boundary lubrication. *Soft Matter*. 2012, 8(40), 10241-. DOI: 10.1039/c2sm26615f. ISSN 1744-683X. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm26615f>
- [34] CHEN, W. Y. JOHN a GIOVANNI ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999, 7(2), 79-89. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x. ISSN 1067-1927. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x>
- [35] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#III>
- [36] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*. *Biopolymers*. Sciyo, 2010, 2010-09-28. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>

- [37] GAFFNEY, John, Sabine MATOU-NASRI, Marta GRAU-OLIVARES a Mark SLEVIN. Therapeutic applications of hyaluronan. *Mol. BioSyst.* 2010, 6(3), 437-443. DOI: 10.1039/B910552M. ISSN 1742-206X. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B910552M>
- [38] ATIK, M. Dextrans, their use in surgery and medicine, with emphasis on the low molecular weight fractions. *Anesthesiology* [online]. 1966, 27(4), 425 [cit. 2018-04-21]. ISSN 00033022. Dostupné z: <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/article.aspx?articleid=1965986&resultClick=3>
- [39] IOAN, Catalina E., Thomas ABERLE a Walther BURCHARD. Structure Properties of Dextran. 2. Dilute Solution †. *Macromolecules.* 2000, 33(15), 5730-5739. DOI: 10.1021/ma000282n. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma000282n>
- [40] DE, Sourav, Susanta MALIK, Aniruddha GHOSH, Rumpa SAHA a Bidyut SAHA. A review on natural surfactants. *RSC Advances.* 2015, 5(81), 65757-65767. DOI: 10.1039/C5RA11101C. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA11101C>
- [41] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution.* 2nd ed. /. Hoboken, NJ, c2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [42] MOHAMED, Gehad G., M. F. EL-SHAHAT, A. M. AL-SABAGH, M. A. MIGAHED a Tamer Awad ALI. Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. *The Analyst.* 2011, 136(7), 1488-. DOI: 10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [43] Carbethopendecinium bromide. In: *Chem Spider: Search and share chemistry* [online]. [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.141396.html>
- [44] QUIRINO, Joselito P. Sodium dodecyl sulfate removal during electrospray ionization using cyclodextrins as simple sample solution additive for improved mass spectrometric detection of peptides. *Analytica Chimica Acta.* 2018, 1005, 54-60. DOI: 10.1016/j.aca.2017.12.012. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701731423X>
- [45] Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), C12. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28312>
- [46] KOHUTOVÁ, L. Příprava a aplikace fyzikálních hyaluronových gelů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová.
- [47] KOHUTOVÁ, L. Studium fyzikálních gelů s hydrofobními doménami. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 77 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [48] 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.
- [49] SÁTOROVÁ, K. Optimalizace stanovení rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

- [50] Kotouček, J. Charakterizace koloidních částic pomocí deprotonace v excitovaném stavu za použití pokročilých fluorescenčních technik. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 96 s. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [51] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, 391(1-3), 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775711003621>
- [52] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/la502011s>
- [53] KRASNOWSKA, Ewa K., Enrico GRATTON a Tiziana PARASASSI. Prodan as a Membrane Surface Fluorescence Probe: Partitioning between Water and Phospholipid Phases. *Biophysical Journal*. 1998, 74(4), 1984-1993. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77905-6. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349598779056>
- [54] AMALI, Arlin Jose, Nour H. AWWAD, Rohit Kumar RANA a Digambara PATRA. Nanoparticle assembled microcapsules for application as pH and ammonia sensor. *Analytica Chimica Acta*. 2011, 708(1-2), 75-83. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.001. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011013080>
- [55] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, 93(4), 1478-1483. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [56] THALBERG, Kyrre, Jan VAN STAM, Cecilia LINDBLAD, Mats ALMGREN a Bjoern LINDMAN. Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, 95(22), 8975-8982. DOI: 10.1021/j100175a101. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100175a101>
- [57] THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, 95(8), 3370-3376. DOI: 10.1021/j100161a073. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100161a073>
- [58] HOLÍNKOVÁ, P.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Fluorescence study of microviscosity of hyaluronan hydrogels containing hydrophobic nanodomains during fourteen days of ageing. In *NANOCON 2015 Conference Proceedings*. Ostrava: Tanger Ltd., 2015. s. 408-412. ISBN: 978-80-87294-63- 5.
- [59] CHRISTIAN REICHARDT AND THOMAS WELTON. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. 4th, updated and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. ISBN 978-352-7632-220.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

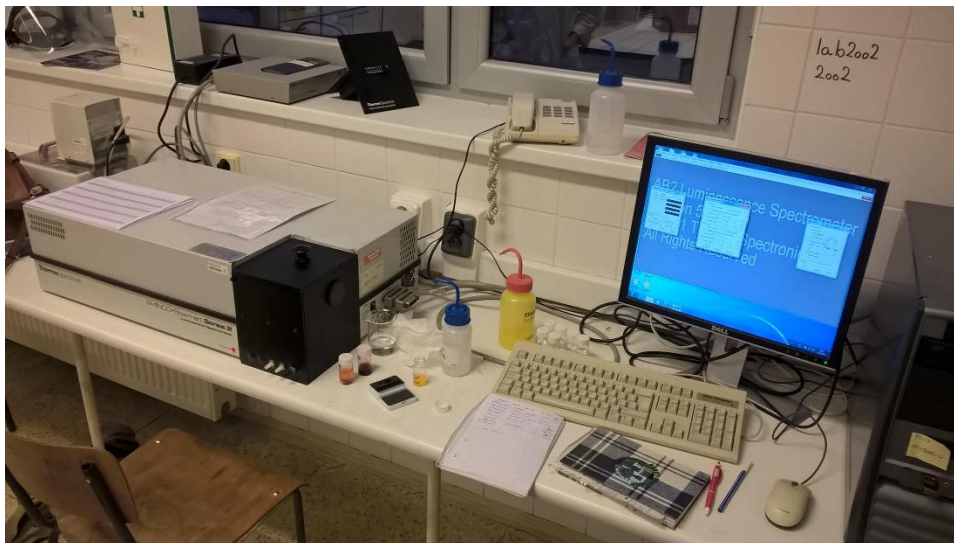
Seznam zkratek

HyA	Hyaluronan
DEAE	Dextran
SDS	Dodecylsulfát sodný
CMC	Kritická micelární koncentrace
CTAB	Cetyltrunethylamonium bromid
P3P	1,3-bis(pyren-1-yl)propan
CPC	Cetylpyridinium chlorid
AO	Akrydinová oranž
PIE	Pulsed Interleaved Excitation
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging

Seznam symbolů

Q	Kvantový výtěžek
Γ	Rychlost zářivého přechodu
k_{nr}	Rychlost nezářivého přechodu
τ	Doba života fluorescence
n	Index lomu
ε	Dielektrická konstanta
μ	Dipólový moment
c	Rychlost světla
h	Planckova konstanta
a	Onsagerův radius
I	Intenzita fluorescence
Δf	Orientační polarizovatelnost

9 PŘÍLOHY



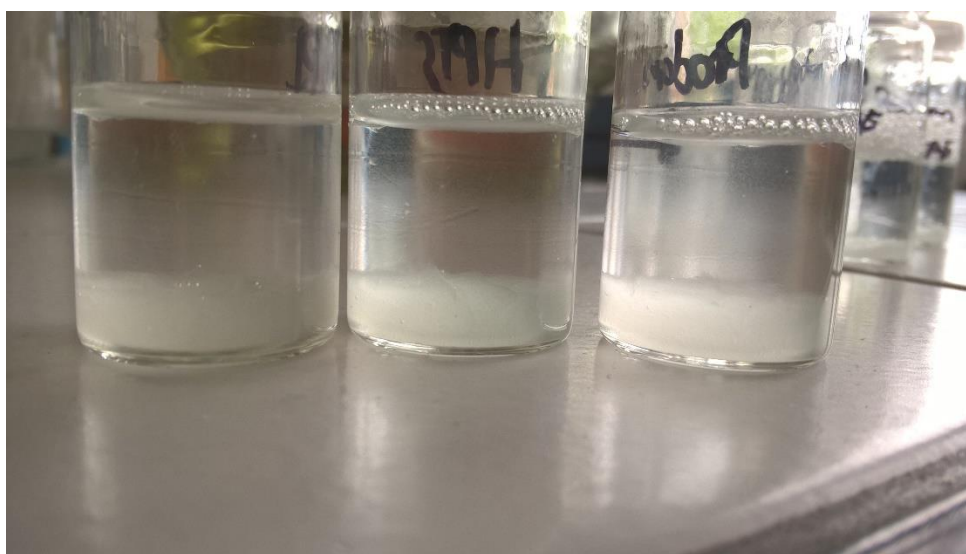
Obrázek 39: Fluorimetr Aminco Bowman Series 2, na kterém byla prováděna měření pro charakterizaci vybraných sond v různých prostředích



Obrázek 40: Fluorimetr Fluorolog používán pro měření fluorescence sond z prostředí hydrogelů, využíváno bylo nástavce s optickými kabely



Obrázek 41: Uspořádání pro měření fluorescence sond z prostředí hydrogelů, do nástavce sloužícího pro odstínění okolního světla jsou přivedeny optické kabely, z nichž jeden přivádí excitační záření a pomocí druhého je snímána emise fluoroforu; vzorek hydrogelu je nanesen na krycí sklíčko, položen na obdélník z plastu neodrážející záření a vložen pod optické kabely



Obrázek 42: Připravené hydrogely na bázi hyaluronanu a Septonexu s inkorporovanými fluorescenčními sondami



Obrázek 43: Hydrogely na bázi dextranu a tenzidu SDS, vlevo nevysušený hydrogel, vpravo hydrogel po 1,5 hodiny sušení



Obrázek 44: Fluorescenční sonda Prodan v prostředích různé polarity, osvětlena pod UV lampou; různě barevná fluorescence způsobena solvatochromním efektem