



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

**STUDIUM MIKROVISKOZITY MEMBRÁNOVÝCH
SYSTÉMŮ NA BÁZI IONTOVÝCH AMFIFILNÍCH PÁRŮ**

STUDY OF MICROVISCOSITY OF MEMBRANE SYSTEMS BASED ON IONIC AMPHIPHILIC PAIRS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Moslerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1514/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Lenka Moslerová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium mikroviskozity membránových systémů na bázi iontových amfifilních párů

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na metody stanovení viskozity v membránách vezikulárních systémů.
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodné techniky pro charakterizaci stanovení viskozity membrány vezikulárního systému na bázi iontového páru CTA–DS proměnným množstvím cholesterolu a změně teploty.
- 3) Zhodnotit získané výsledky z hlediska použitelnosti zvolené metody a vlivu složení a teploty na daný vezikulární systém.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Lenka Moslerová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V rámci této diplomové práce byly z hlediska mikroviskozity zkoumány kataniontové vezikuly tvořené pseudodvouřetězcovým komplexem CTA-DS a pro jejich stabilizaci byl použit dvouřetězcový tenzid DODAC a cholesterol. Vzorčky kataniontových vezikul obsahovaly 23; 43 a 53 mol. % cholesterolu. Kataniontové vezikuly byly připraveny pro vizuální pozorování, následně byla metodou DLS stanovena stabilita a takto připravený systém byl dále zkoumán. Mikroviskozita byla stanovena metodou měření fluorescenční anizotropie. Měření bylo provedeno za využití fluorescenčních sond laurdanu pro studium vnější části membrány a difenylhexatrienu pro studium vnitřní části membrány. Tato metoda byla určena jako vhodná, jelikož odráží stavy membrány. V práci byla dále pro studium mikroviskozity ve dvojvrstvě vezikuly využita sonda 1,3-bispyrenylpropan (P3P) tvořící intramolekulární excimery. Pro využití techniky molekulárních rotorů byla použita sonda dikyanovinyljulolidin (DCVJ). Ukázalo se, že v případě sondy DCVJ je technika molekulárních rotorů prakticky nepoužitelná, a to z toho důvodu, že má sonda při zvoleném teplotním rozsahu nízký kvantový výtěžek. Taktéž při tvorbě excimeru sondy P3P nedochází k očekávaným výsledkům, kataniontové vezikuly tuto tvorbu zřejmě nepodporují, jelikož jsou příliš těsně spjaty. Tento typ sondy je pro zvolený systém použitelný s určitým omezením.

ABSTRACT

In this master 's thesis, cationic vesicles formed by the pseudo-double-chain complex CTA – DS were investigated from the point of view of microviscosity. Samples of cationic vesicles contained 23, 43 and 53 mol. % of cholesterol and the double-chain surfactant DODAC. Cationic vesicles were prepared for visual observation, their stability was determined by DLS and the prepared system was further investigated. Microviscosity was determined from fluorescence anisotropy. To study the outer part of the membrane, laurdan fluorescent probes were used whereas diphenylhexatriene was used for the inner part of the membrane. This method has been proven to be suitable because it reflects the conditions of the membrane. Moreover, a 1,3-bispyrenylpropane probe forming intramolecular excimers was used to study the microviscosity in the vesicle bilayer. The dicyanovinyljulolidine (DCVJ) probe was applied in the case of the molecular rotor technique. It has been shown that in the case of the DCVJ probe, the molecular rotor technique is practically unusable, due to the fact that the probe has a low quantum yield at low temperatures. Also, the excimer formation of P3P probes does not lead to the expected results. The cationic vesicles do not seem to support this formation, as they are too closely related. This type of probe can be used for the selected system with some restrictions.

KLÍČOVÁ SLOVA

Iontový amfifilní pár, kataniontové vezikuly, fluorescence, anizotropie fluorescence, laurdan, difenylhexatrien, molekulární rotory, bispyrenylpropan

KEYWORDS

Ion pair amphiphile, cationic vesicle, fluorescence, fluorescence anisotropy, laurdan, diphenylhexatriene, molecular rotors, bispyrenylpropane

MOSLEROVÁ, Lenka. *Studium mikroviskozity membránových systémů na bázi iontových amfifilních párů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131430>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho čas, odborné rady, důvěru a pomocnou ruku při řešení této diplomové práce. Mé poděkování patří i Ing. Martině Havlíkové, za užitečné rady a připomínky k práci a dohled.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině, přátelům (nejúžšímu kroužku 4 v 1) za jejich lásku, objetí a podporu při celém studiu. A samozřejmě velký dík patří mému manželovi za trpělivost, za to, jakou oporou pro mě je v jakékoli situaci.

OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Povrchově aktivní látky.....	8
2.1.1 Hexadecyltrimethylamonium bromid.....	9
2.1.2 Dodecylsírán sodný.....	9
2.2 Samospořádání tenzidů.....	10
2.3 Vezikuly.....	11
2.3.1 Kataniontové vezikuly.....	12
2.3.2 Stabilizace vezikulárního systému.....	12
2.3.2.1 DODAC.....	13
2.3.2.2 Cholesterol.....	13
2.3.3 Využití kataniontových vezikul.....	13
2.3.4 Interakce s biopolymery.....	14
2.3.4.1 Hyaluronan.....	14
2.4 Fluorescence.....	15
2.4.1 Fluorescenční zákony.....	16
2.4.2 Doba života fluorescence.....	16
2.4.3 Fluorescenční sondy.....	16
2.4.3.1 Difenylhexatrien.....	17
2.4.3.2 Laurdan.....	18
2.5 Mikroviskozita a její stanovení pomocí fluorescenčních sond.....	18
2.5.1 Molekulární rotory.....	20
2.5.1.1 Dikyanovinyljulolidin.....	20
2.5.2 Tvorba intramolekulárního excimeru.....	20
2.5.2.1 Bispyrenylpropan.....	21
2.5.3 Anizotropie fluorescence.....	21
2.6 Dynamický rozptyl světla.....	22
2.6.1 Stanovení velikosti pomocí DLS.....	23
2.7 Elektroforetický rozptyl světla.....	24
2.7.1 Stanovení zeta potenciálu metodou ELS.....	24
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	26
3.1 Studium systému s využitím fluorescenčních sond.....	26

3.2	Příprava, zvýšení fyzikální stability a snížení toxicity kataniontových vezikul ...	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Chemikálie.....	31
4.2	Přístroje	33
4.3	Shrnutí cílů práce a volba pozorovaného systému	34
4.3.1	Příprava vezikulárního systému.....	34
4.3.2	Příprava značených vezikul	35
4.3.3	Příprava systému vezikul s přídavkem hyaluronanu	35
4.3.4	Charakterizace vezikulárních systémů	35
4.3.5	Měření mikroviskozity	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1	Vizuální pozorování	37
5.2	Stabilita připravovaných kataniontových vezikul	38
5.3	Měření mikroviskozity pomocí anizotropie fluorescence	41
5.3.1	Studium za pomoci fluorescenční sondy DPH	41
5.3.2	Studium za pomoci fluorescenční sondy Laurdanu.....	43
5.4	Interakce s biopolymerem hyaluronanem	45
5.4.1	Vizuální pozorování	45
5.4.2	Měření mikroviskozity pomocí anizotropie fluorescence	46
5.5	Měření mikroviskozity pomocí tvorby intermolekulárních excimerů.....	47
5.6	Měření mikroviskozity pomocí molekulárních rotorů	49
6	ZÁVĚR	50
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
8.1	Seznam symbolů.....	59
8.2	Seznam zkratk.....	59

1 ÚVOD

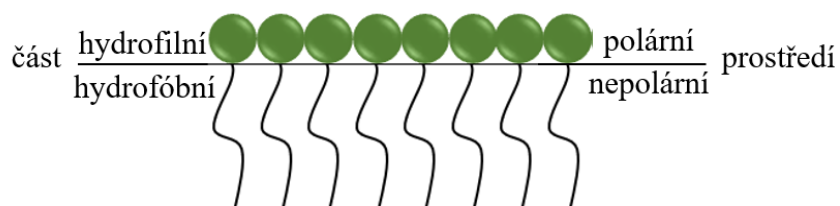
V posledních letech jsou stále více zkoumány lipozomální systémy, nebo systémy jim podobné jako například kataniontové vezikuly, pro cílený transport léčiv. Hlavní rozdíl mezi lipozomy a kataniontovými vezikuly je ve složení. Lipozomy jsou tvořeny fosfolipidy, naproti tomu kataniontové vezikuly jsou složené z opačně nabitých tenzidů, které vytvářejí tzv. iontový amfifilní pár. I přes potenciální využití se kataniontové vezikuly vyznačují nízkou fyzikální stabilitou. K potlačení tohoto nepříznivého jevu se velmi často využívají stabilizační látky jako je například nabitý dvouřetězcový tenzid a cholesterol. Cholesterol je v určitých koncentracích využíván jako stabilizační činidlo zejména při přípravě lipozomů. Má schopnost vyztužit membránu vezikuly a zvýšit rigiditu dvojvrstvy. Vyšší obsah cholesterolu může mít i destabilizační efekt. Vysoký obsah cholesterolu může být totiž příčinou krystalizace uhlovodíkových řetězců, která má za následek již zmíněnou nestabilitu. Stabilizaci u kataniontových vezikul podporuje začlenění nabitého dvouřetězcového tenzidu. Ke stabilizaci dochází z důvodu vzniku náboje na povrchu vezikuly, díky němuž nastává jev zvaný repulze – odpuzování jednotlivých vezikul, a tím je omezena interakce. Nabitá vezikula má navíc schopnost interagovat s opačně nabitými (bio)polymery přes elektrostatické interakce, čímž lze potenciálně zvýšit biokompatibilitu. Biokompatibilita je klíčová zejména pro využití aplikačního potenciálu jakožto nosičů léčiv.

Tato práce se zabývá přípravou kladně nabitých kataniontových vezikul s rozdílným obsahem cholesterolu, sledováním jejich chování při různých teplotách, a okrajově také interakcí s opačně nabitým polymerem (hyaluronanem sodným). Ke stabilizaci vezikul byl využit dvouřetězcový tenzid DODAC a cholesterol, zároveň bylo provedeno posouzení, jaký vliv má přítomnost polymeru na vezikulární systém. Nejdříve bylo provedeno vizuální pozorování, následovala charakterizace pomocí metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Dále byl sledován vliv obsahu cholesterolu na membránu vezikul, a to pomocí fluorescenčních sond a techniky anizotropie. Měření anizotropie bylo provedeno s použitím fluorescenčních sond, laurdanu pro studium vnější části membrány a difenylhexatrienu pro studium vnitřní části membrány. V práci byla dále pro studium mikroviskozity ve dvojvrstvě vezikuly využita sonda 1,3-bispyrenylpropan tvořící intramolekulární excimery. Pro využití techniky molekulárních rotorů byla použita sonda díkyanovinyljulolidin (DCVJ).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Povrchově aktivní látky

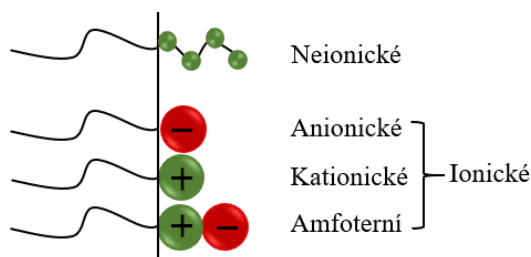
Povrchově aktivní látky (tenzidy) mají schopnost se při nízkých koncentracích hromadit na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii celkové soustavy [1]. Jsou to organické sloučeniny mající ve své struktuře dvě části, *polární* hydrofilní část a *nepolární* hydrofobní část. Proto je můžeme nazývat látkami amfifilními. Polární část, označována jako *hlava*, obsahuje hydrofilní funkční skupiny jako např. $-\text{COOH}$. Nepolární *chvost* je tvořen dlouhým uhlovodíkovým řetězcem [2].



Obrázek 1: Adsorpce tenzidů na mezifázovém rozhraní [2].

Systémy obecně mají snahu mít co nejnižší celkovou energii. Z tohoto důvodu se v prostředí, ve kterém se tenzidy vyskytují, orientují tak, aby zaujímal pro ně co nejvýhodnější uspořádání. Samouspořádání povrchově aktivní látky na rozhraní polárního a nepolárního prostředí vidíme na Obrázku 1. Hydrofilní část tenzidu bude mít tendenci orientovat se k polárnímu prostředí a hydrofobní chvost vykazuje afinitu k nepolárnímu prostředí [3].

Hydrofilní část povrchově aktivní látky může mít kladný nebo záporný náboj nebo nemusí nést náboj vůbec. Podle toho dělíme tenzidy na aniontové, kationtové, amfoterní nebo neiontové. Povrchově aktivní látky se pak dělí podle jejich schopnosti disociovat ve vodném prostředí na látky ionické a neionické. Toto chování je popsáno na Obrázku 2 [4].



Obrázek 2: Rozdělení tenzidů [4].

Pro **ionické tenzidy** je charakteristická schopnost tvořit ionty po rozpuštění ve vodě. Ionty se tvoří tak, že se v místě iontové vazby oddálí nabitá část, oproti původní struktuře za nepřítomnosti rozpouštědla. Kolem každého místa, ve kterém je lokalizován náboj se díky vodě vytvoří solvatační obal. Tato skupina se dále rozděluje na anionické, kationické a amfoterní tenzidy. *Anionické* jsou tenzidy, které jsou základem detergentů užívaných u práškových i kapalných pracích prostředků, mýdel a dalších. Jedná se o skupinu často využívanou v průmyslu. Do této skupiny se řadí např. dodecylsulfát sodný (SDS). Hlavní funkční skupiny jsou karboxylová skupina nebo skupina sulfonová. Mezi *kationické* se řadí sloučeniny s jednou nebo více kladně nabitými funkčními skupinami. Využívají se jako avivážní prostředky, ve vlasové kosmetice nebo jako dezinfekční a antiseptické látky, jež mají

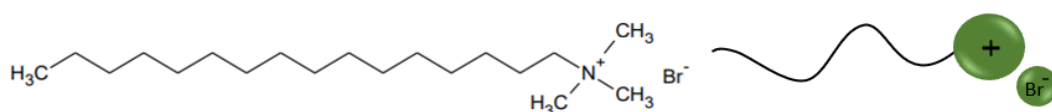
mimo jiné i mikrobicidní efekt. Obsahují kvartérní dusíkový atom nesoucí kladný náboj, jedná se tedy o kvartérní amoniové soli, a to chloridy nebo methosulfáty. Klasickým příkladem této skupiny je triethylhexadecylamoniumbromid nebo například hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB). *Amfoterní tenzidy* ve své struktuře obsahují jak anion, tak kation, což umožňuje kombinaci s kationickými i s anionickými tenzidy. V závislosti na pH se poté chovají jako aniontové v alkalickém prostředí a v kyselém jako kationtové tenzidy. Vyskytují se v šampónech, tekutých mýdlech či v koupelových pěnách. Do této skupiny řadíme například lecitin [4].

Neionické tenzidy se ve vodném roztoku nedisociují a nevytváří tak ionty. Struktura tenzidu proto musí obsahovat hydrofilní části, aby byla sloučenina schopná se ve vodě rozpustit. V textilním průmyslu jsou neionické tenzidy využívány jako lubrikanty a antistatické a apretační prostředky a jedním ze zástupců je například dodecylether tetraethylglykol [5].

2.1.1 Hexadecyltrimethylamonium bromid

Cetrimoniumbromid/hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) je kationový tenzid. Jako hexadecyltrimethylamoniový kation (CTA^+) je účinným antiseptickým činidlem, jeho účinky jsou jak baktericidní, tak fungicidní [6].

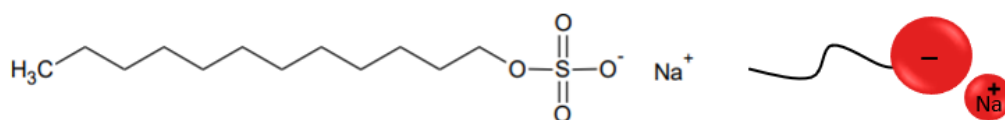
Používá se pro výrobu pufrových roztoků pro extrakci DNA. Široce se používal při syntéze zlatých nanočástic. V běžném životě ho můžeme nalézt v některých kosmetických produktech jako jsou například kondicionéry na vlasy. Stejně jako všechny tenzidy tvoří ve vodných roztocích micely [7].



Obrázek 3: Nalevo lze vidět strukturní vzorec CTAB, napravo je vyobrazeno schéma molekuly, kde hydrofilní část (hlava) s kladným nábojem a daným protiiontem (Br^-) je značena zeleně. Dále je zde patrný tzv. hydrofobní chvost.

2.1.2 Dodecylsírán sodný

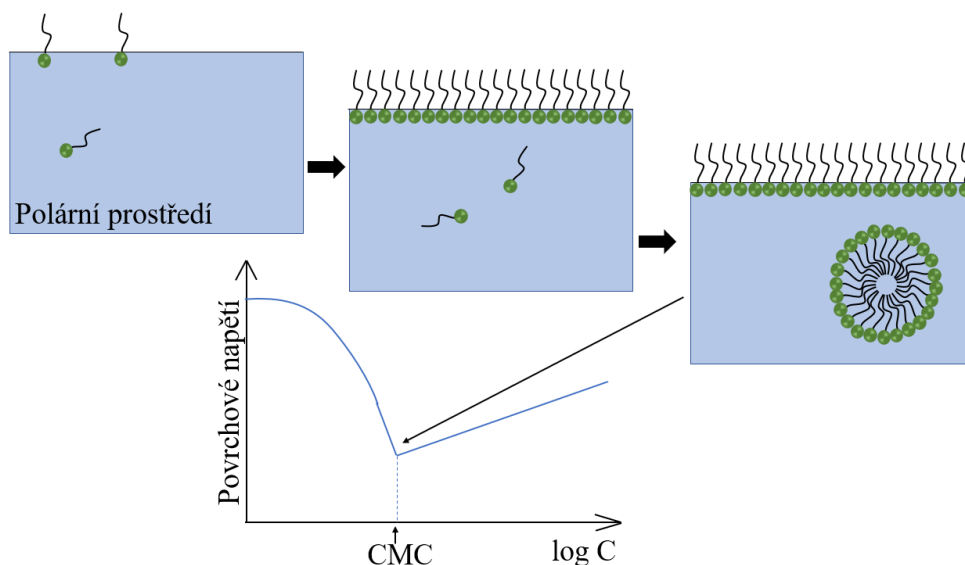
Dodecylsírán sodný (SDS) je povrchově aktivní látka amfifilního charakteru. Hydrofilní povahu má SDS díky sulfátové skupině a za hydrofobicitu je zodpovědný dvanácti uhlíkatý řetězec, kterým je tvořena druhá část molekuly. Běžně se díky svým čistícím vlastnostem používá jako odmašťovač či mycí prostředek. SDS se využívá v biochemických laboratořích při elektroforéze proteinů v metodě PAGE-SDS, kde působí jako denaturační činidlo a zároveň uděluje uniformitu náboje, díky čemuž mohou být proteiny po vložení napětí separovány [8].



Obrázek 4: Nalevo lze vidět strukturní vzorec SDS, napravo je schéma molekuly, kde je hydrofilní část (hlava) se záporným nábojem a daným protiiontem (Na^+) značena červeně. Dále je zde patrný tzv. hydrofobní chvost.

2.2 Samouspořádání tenzidů

Při zvyšující se koncentraci povrchově aktivní látky v roztoku dochází k samouspořádání. Tuto schopnost, mají povrchově aktivní látky ukotvenou ve své struktuře. Vlastnost je podmíněna amfifilní povahou. V případě, že zvyšujeme koncentraci povrchově aktivní látky v daném prostředí, dochází nejprve k tvorbě filmu na mezifázovém rozhraní, pak po překročení určité hraniční koncentrace se začínají molekuly organizovat v micely (Obrázek 5). Tato koncentrace je označována jako kritická micelární koncentrace (CMC). **Kritická micelární koncentrace** je bod, kdy se v roztoku začnou vytvářet micely neboli nejvyšší možná hodnota koncentrace, při které je tenzid v roztoku v molekulové nebo iontové formě. Přidávkem polymeru do roztoku tenzidu, může docházet k agregaci při nižší koncentraci. Po dosažení CMC se změní mnoho fyzikálně-chemických vlastností roztoku, protože dochází ke vzniku micel. Jmenovitě se jedná o změnu molární vodivosti, elektrické vodivosti, osmotického tlaku a povrchového napětí. Na vzhled výsledné micely (válcový tvar, kulový nebo jiný) má vliv koncentrace tenzidu, pH, teplota a iontová síla. Povrch micely je vždy shodný s polaritou daného prostředí, viz Obrázek 5 [5].



Obrázek 5: Průběh tvorby micel [9; 5].

Vliv na prostorové uspořádání má především geometrie povrchově aktivní látky. Právě geometrie molekuly rozhoduje o tom, zda bude docházet k tvorbě micel nebo zda se bude jednat například o vezikuly, případně se budou tvořit další uskupení, viz Tabulka 1. K predikci výsledného uskupení se využívá tzv. kritický sbalovací parametr. **Kritický sbalovací parametr (P)** je bezrozměrnou veličinou, která nám udává, jaká bude převládat orientace tenzidů v daném prostředí. Je dán rovnicí (1):

$$P = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (1)$$

kde a_0 je plocha hydrofilních hlav, které tvoří vnější povrch, v je objem hydrofobní části a l_c je maximální délka nataženého hydrofobního řetězce [10].

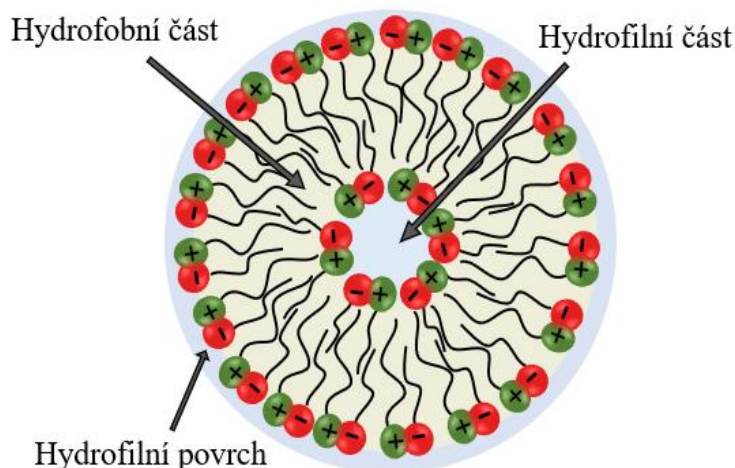
Tabulka 1: Uspořádání tenzidů v prostoru a jim příslušné hodnoty kritického parametru balení 52[11].

Kritický sbalovací parametr	Prostorové uspořádání
$P \leq 0,33$	sférické micely
$0,33 \leq P \leq 0,50$	cyklindrické nebo diskovité micely
$0,50 \leq P \leq 1,00$	vezikuly
$P > 1$	obrácené micely

2.3 Vezikuly

Vezikula zaujímá uskupení kulovitého charakteru a je tvořena dvojitou vrstvou s hydrofobní a hydrofilní doménou. Za objasnění mechanismu regulujícího vezikulární transport v lidských buňkách obdrželi v roce 2013 američtí buněční biologové James E. Rothman a Randy W. Schekman spolu s německým biochemikem Thomasem C. Südhofem Nobelovu cenu za fyziologii nebo lékařství [12].

Vezikuly se tvoří ve vodných roztocích z povrchově aktivních látek, lipidů nebo například blokových kopolymerů. Tvoří je jedna nebo více vrstvená kulovitě zakřivená membrána.



Obrázek 6: Schématické znázornění vezikulárního systému [13].

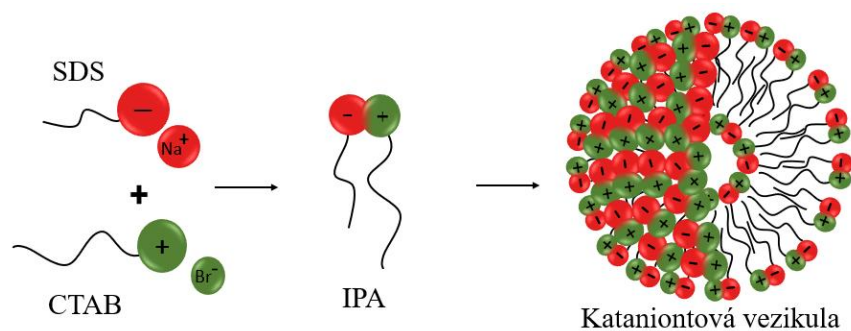
Jedná se o duté sférické systémy, které mají jak hydrofilní, tak hydrofobní část. Jsou tvořeny dvouvrstvou membránou, jejíž struktura je vyobrazena na Obrázku 6. Dvouvrstva vezikuly je tvořena z důvodu neochoty kontaktu hydrofobních řetězců s okolním polárním prostředím, nejčastěji vodným roztokem. Vezikuly mohou být jak unilamelární (jednovrstvé) tak multilamelární (vícevrstvé). Například syntetické i přírodní fosfolipidy vytvářejí vezikuly zvané lipozomy. Vezikulární systémy jsou využitelné jak na poli medicíny jako nosiče léčiv, tak v kosmetickém průmyslu. Výhoda těchto vezikulárních systémů tkví v jejich vyšší enkapsulační kapacitě oproti micelárním systémům a snadnějšímu transportu látek organismem [1].

Stejně tak jako se fosfolipidy, po dosažení určité koncentrace, za vhodných podmínek ve vodném prostředí orientují do vezikulárního uskupení, mohou se duté dvouvrstvé struktury (vezikuly) za vhodných podmínek vytvářet z kladně a záporně nabitého surfaktantu. Schématický náčrt procesu tvorby vezikul je zobrazen na následujícím Obrázku 7 [14].

2.3.1 Kataniontové vezikuly

Kataniontové vezikuly jsou jedním typem vezikulárních systémů, vznikají ze směsi **iontových amfifilních párů** (IPA, z angl. *ion pair amphiphile*). První zmínky o spontánním procesu tvorby vezikul z IPA ve své práci diskutují **Kaler a kolektiv**. Popisují skutečnost, že se vezikuly mohou tvořit samovolně, a to po smísení kationtových a aniontových jednořetězcových povrchově aktivních látek [15].

Proces tvorby kataniontových vezikul je podmíněn smícháním kationtových a anionových povrchově aktivních látek v ekvimolárním množství, pak se díky elektrostatickému působení mezi polárními skupinami vytváří páry. Po precipitaci se tento zbytek po odstranění protiiontů nazývá iontový amfifilní pár (IPA, pseudo dvouřetězcový tenzid). Pár tvoří právě dva opačně nabitě tenzidy. Tento tenzid má poměrně dost objemnou polární hlavu. Díky tomu mají IPA uskupení tendence tvořit ve vodných roztocích vezikuly s dutým jádrem a nedochází k tvorbě micel, jak je schematicky znázorněno na Obrázku 7 [16]. Upřednostnění tvorby vezikul před tvorbou micel nasvědčuje i fakt, že kritický sbalovací parametr takovýchto vezikul je vyšší [17].



Obrázek 7: Schéma vzniku kataniontové vezikuly tvořené záporně nabitým tenzidem SDS (červeně) a kladně nabitým CTAB (zeleně) [18].

Sloučeniny, které se nejčastěji využívají pro tvorbu těchto vezikul jsou alkylamónium alkylsulfáty nebo sulfonáty. Kataniontové vezikuly s dvěma symetrickými alkylovými řetězci, u kterých je počet atomů uhlíku menší nebo roven deseti, jsou téměř nerozpustné ve vodě. Kataniontové vezikuly s kratšími řetězci jsou naopak ve vodě rozpustné [19].

2.3.2 Stabilizace vezikulárního systému

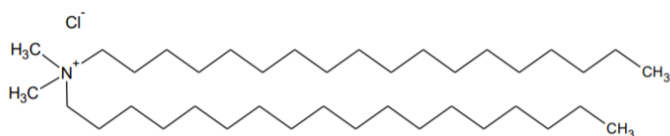
Vezikuly obsahující pouze IPA (bez dalších látek) nevykazují přílišnou fyzikální stabilitu. Dochází zejména k vzájemnému shlukování a agregaci vezikul, což následně způsobuje rozdílné vlastnosti, změnu velikosti vezikul, snížení stability, a hlavně neschopnost tyto vezikuly dlouhodobě skladovat. Řešením je využití různých stabilizačních činidel [20].

Pro zvýšení stability se do kataniontového systému přidává např. nabitý dvouřetězcový tenzid, který membránu zahušťuje. Dodání uniformního náboje vezikulám ve vzorku dochází k jejich elektrostatickému odpuzování, v důsledku čehož se eliminuje agregace. Přidáním nabitého tenzidu se na povrchu vezikuly vytváří vazebná místa, kladně nebo záporně nabitá podle volby dvouřetězcového tenzidu. Tím si zabezpečuje interakci s polyelektrolytem jako například hyaluronanem nebo nukleovými kyselinami. Příkladem takového dvouřetězcového tenzidu může být i dioktadecyldimethylamonium chlorid (DODAC). Další látkou, která zvyšuje stabilitu kataniontových systémů je cholesterol [21].

2.3.2.1 DODAC

Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid (DODAC) je dvouřetězcový kladně nabitý tenzid. Jedná se o kvartérní amoniovou sůl, kterou tvoří dva řetězce o 18 uhlících a dva methylové zbytky. Je to bílá pevná látka mající vločkovitou strukturu. Je součástí například antistatických činidel v kosmetických přípravcích nebo se využívá jako katalyzátor v organických syntézách. V minulosti se přidával také do aviváží, ale kvůli své nízké biodegradabilitě byl jeho výskyt v těchto přípravcích omezen [22].

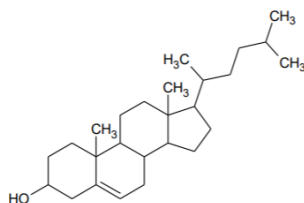
Přítomnost kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu ve dvouvrstvě vezikuly uděluje povrchu kladný náboj, díky kladně nabitě polární hlavě, což vede ke zvýšení elektrostatického odpuzování mezi jednotlivými vezikulami, a tedy k jejich stabilizaci [23].



Obrázek 8: Strukturální vzorec DODAC [24].

2.3.2.2 Cholesterol

Jedná se o steroidní látku, která je přítomna v lidském těle, pomáhá zpracovávat tuky a také je nepostradatelnou součástí buněčných membrán. Strukturu molekuly cholesterolu lze vidět na Obrázku 9. Buněčnou membránu stabilizuje, ale zároveň je nechává do jisté míry volnou, fluidní. Fluidita je nezbytná pro celý metabolismus a fungování buněk [25].



Obrázek 9: Strukturální vzorec cholesterolu [26].

Stabilizační funkce cholesterolu ve vezikule funguje podobně jako v biomembráně. Tím, že se zabuduje do struktury, dochází ke zvětšení vzdálenosti mezi polárními hlavami, které se navzájem odpuzují. Zároveň se sníží tendence protiiontů vázat se na povrchu vezikuly. Přítomnost cholesterolu v membráně vytváří membránu rigidnější a tím ji stabilizuje [23].

2.3.3 Využití kataniontových vezikul

Vezikulární struktury jsou díky své hydrofobní a hydrofilní doméně vhodné pro enkapsulaci jak hydrofilních, tak hydrofobních materiálů což je významné pro nosiče léčiv. V tomto je velký potenciál využití vezikul [20].

Díky tomu, že kataniontové vezikuly nesou kladný náboj mohou interagovat s molekulami DNA, jelikož ta je záporně nabitá. Vytváří tak společně komplex, díky kterému mohou vstupovat do buňky endocytózou. Tento příznivý jev přenosu DNA vezikulami je komplikována vytvářením agregátů mezi jednotlivými vezikulami, což vede ke snížení účinnosti genové transfekce komplexu vezikula–DNA. Tento negativní jev je nadále předmětem výzkumů [17].

Potenciál využití komplexů tenzidů ať už to jako nosičů léčiv nebo DNA přenašečů nemůže být naplno využito. Překážkou je v případě komplexů tenzidů toxicita, nepříznivý vliv tenzidů na buněčnou stěnu živých buněk, kde působí cytotoxicky. Zmírnění těchto negativních vlivů je umožněno začleněním látky pro buňky vlastní, jako například hyaluronanu [27].

2.3.4 Interakce s biopolymery

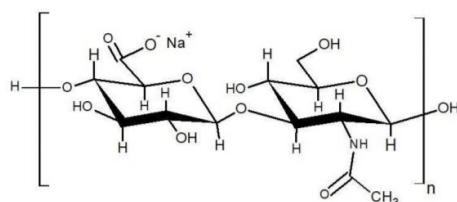
Interakce mezi tenzidy (vezikuly z nich vzniklých) a polymerními látkami je předmětem zájmu mnoha výzkumů. Jednoznačným důvodem je fakt, že jejich kombinací získáváme komplex využitelný v chemickém, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Výsledkem interakce mohou být změny spektroskopických, reologických, mezifázových a dalších fyzikálně-chemických vlastností, což ovlivňuje funkci i použitelnost připravovaného produktu.

Při interakcích polymerů s povrchově aktivními látkami může docházet k adsorpci, reakci mezi molekulami povrchově aktivní látky a řetězcem polymeru. Reakcí mezi polymerem a micely nebo vezikuly povrchově aktivní látky, může docházet i ke vzniku agregačních komplexů [28].

2.3.4.1 Hyaluronan

Hyaluronan je lineární přírodní polysacharid řadící se mezi glykosaminoglykany. Chemická struktura hyaluronanu obsahuje disacharidickou jednotku složenou z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Tyto kyseliny jsou spojeny prostřednictvím β -1,4 a β -1,3 glykosidických vazeb [29].

Při fyziologickém pH, má každá karboxylová skupina záporný náboj, který může být vyrovnán kationty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} . Ve vodném roztoku se kyselina hyaluronová nabije záporně a tvoří sůl, takzvaný hyaluronan (Hya), jehož struktura je znázorněna na Obrázku 10. Jde o silně hydrofilní látku, která je schopna vázat velké množství vody. Molekuly vody se váží na karboxyl a acetamid H-můstky a stabilizují tak sekundární strukturu biopolymeru [30].



Obrázek 10: Struktura disacharidové jednotky hyaluronanu [31].

V lidském těle zastává hyaluronan různou roli podle toho, jaké dosahuje molekulové hmotnosti. Hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností organizuje extracelulární matrix. Nízkomolekulární hyaluronan má funkci informační molekuly a můžeme jej nalézt v poškozené tkáni. Vysokomolekulární hyaluronan v těle značí nepoškozenou, normální tkáň, zatímco nízkomolekulární hyaluronan v těle indukuje zánět nebo poranění tkáně [32].

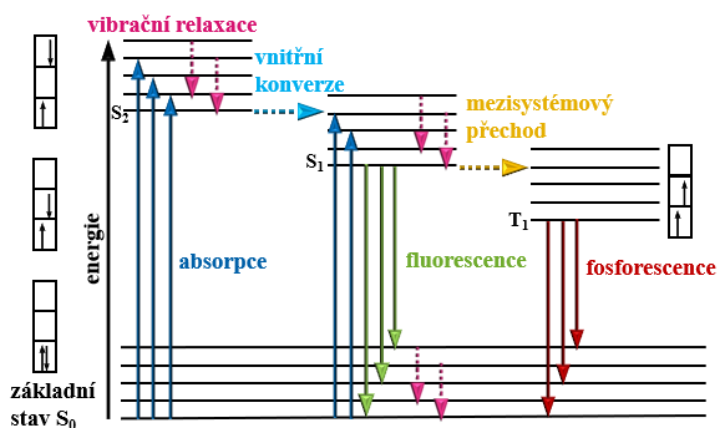
Hyaluronan se už od roku 1950 využívá při operacích očí, jako náhrada očního sklivce. Své využití našel v medicíně díky svým unikátním vlastnostem a faktu, že je pro tělo vlastní. Později se s ním pracovalo v různých oblastech například v dermatologii, ortopedii a při léčbě kardiovaskulárních onemocnění. V klinické medicíně se používá jako diagnostický marker při léčbě rakoviny nebo revmatoidní artritidy. Dále se uplatňuje v oftalmologii a v kosmetickém průmyslu. V aplikované biochemii a enzymologii se využívá jako substrátu pro kvantitativní stanovení enzymu hyaluronidázy [31].

2.4 Fluorescence

Fluorescence se společně s fosforescencí a opožděnou fluorescencí řadí mezi fotoluminiscenční procesy. Jsou to procesy, při kterých dochází vlivem absorpce elektromagnetického záření k excitaci elektronů do energeticky vyšší hladiny (stav S_1) a následuje de-excitace, elektron se vrací na základní hladinu (S_0). Přebytečná energie, která vzniká při přechodu z vyšších na nižší energetické hladiny s sebou nese emisi v ultrafialové a viditelné oblasti. Aby k tomuto jevu – emisi záření (záření, které sledujeme prostřednictvím detektoru) docházelo, musí mu předcházet absorpce záření o vhodné vlnové délce. Valenční elektron dané molekuly nacházející se ve svém singletovém, základním stavu dokáže absorbovat právě takové množství energie (vlnovou délku), která odpovídá velikosti energie, kterou potřebuje elektron, aby se dostal do vyššího energetického stavu. Absorpci energie vidíme graficky znázorněnou na Obrázku 11. Dále zde vidíme způsoby, jakými se daný elektron dokáže dostat zpět do základního stavu S_0 . Děje se tak zářivými a nezářivými přechody. Molekula může část energie vydat nezářivě, nejčastěji předáním tepla rozpouštědлу, ve kterém se nachází (růžově znázorněno na Obrázku 11), sníží tak svůj energetický stav a následně z nejnižší hladiny vyššího energetického stavu dochází k uvolnění energie ve formě světla [33].

Při fluorescenci excitovaná molekula emituje ze singletového stavu, přičemž elektron zaujímající excitovaný orbital má antiparalelní, tedy opačný, spin než elektron v základním stavu. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je spinově povolený. Doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s. Takovýmito molekulám, které při absorpci světla následně vykazují fluorescenci, říkáme fluorofory. Zpravidla se mezi tyto molekuly řadí organické aromatické uhlovodíky a heterocykly [34].

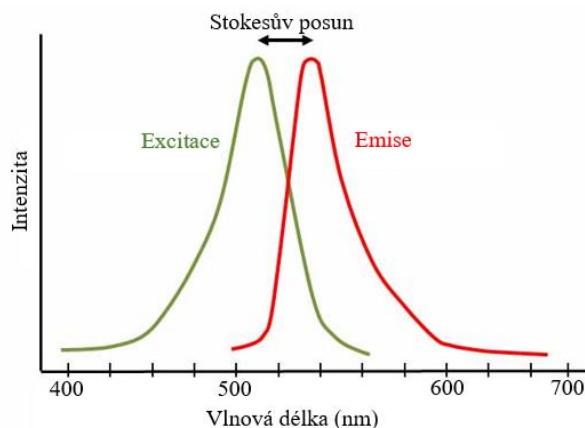
Fosforescence je emise fotonu z tripletového excitovaného stavu, kde elektron v excitovaném orbitalu má paralelní, tedy stejný, spin jako elektron v základním stavu. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je spinově zakázaný. Doba dohasínání u fosforescence je řádově 10^{-3} – 10^0 s. Posledním možným procesem vyzáření energie ve formě světla je **zpožděná fluorescence**. Je to zářivý přechod ze singletového stavu jako u fluorescence, ale vyznačuje se delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Emisní spektrum je totožné s emisním spektrem fluorescence. Z důvodu velkého rozdílu energií mezi stavy S_1 a T_1 se běžně nevyskytuje v uhlovodících s aromatickým kruhem [35].



Obrázek 11: Perrin-Jabloňského diagram. Plnou šipkou jsou znázorněny zářivé přechody a přechody a přerušovanou přechody nezářivé [34].

2.4.1 Fluorescenční zákony

Stokesův zákon nám objasňuje, proč je emisní spektrum fluoroforu posunuto oproti spektru absorpčnímu. Říká, že vhodná vlnová délka emise při luminiscenci je větší nebo takřka stejná oproti vlnové délce excitačního paprsku světla. Energie se z části spotřebuje na vnitřní přechody, což má za následek to, že emisní spektrum je od absorpčního posunuto doprava, k vyšším vlnovým délkám (nižší energii) [34].



Obrázek 12: Stokesův posun a zrcadlová symetrie absorpčního (excitace) a emisního spektra (fluorescence) [35].

Dalším zákonem je **Kashovo pravidlo**, které je přímo spojeno se Stokesovým zákonem. Podle tohoto zákona před samotnou emisí fluorescenčního kvanta dochází k vibračním přechodům a vnitřní konverzi, a to z toho důvodu, aby k excitaci (fluorescenci) docházelo z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu, jak je vidět na Obrázku 11 v Perrin-Jabloňského diagramu [35].

Třetím fluorescenčním zákonem je tzv. **Vavilovo pravidlo**. Podle něj jsou kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu molekul v roztoku nezávislé na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace [34].

2.4.2 Doba života fluorescence

Doba života excitovaného stavu (τ) je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního a s tím spojenou emisí. Obecně je doba života fluorescence kolem 10^{-8} s. Důležité je mít na vědomí, že doba života excitovaného stavu je statistickým údajem. Fluorofory emitují elektromagnetické záření náhodně a doba života je průměrnou hodnotou jednotlivých časových údajů popsaných distribuční křivkou. Protože fluorescence je náhodný jev, většina fluoroforů emituje v jiném čase, než je doba života. Pro výběr vhodného fluoroforu pro dané fluorescenční měření je potřeba znát jeho excitační a emisní spektra, kvantový výtěžek i jeho dobu života [36].

2.4.3 Fluorescenční sondy

Fluorofory jsou části, nebo celé molekuly zodpovědné za jev fluorescence a můžeme je dělit na nevlastní a vlastní. Vlastní neboli vnitřní fluorofory, jsou součástí chemické sloučeniny, které u konkrétní látky vyvolávají fluorescenci. Nevlastní **fluorofory** jsou mnohem využívanější skupinou. Jsou to sloučeniny, které se přidávají k určité látce, která sama o sobě

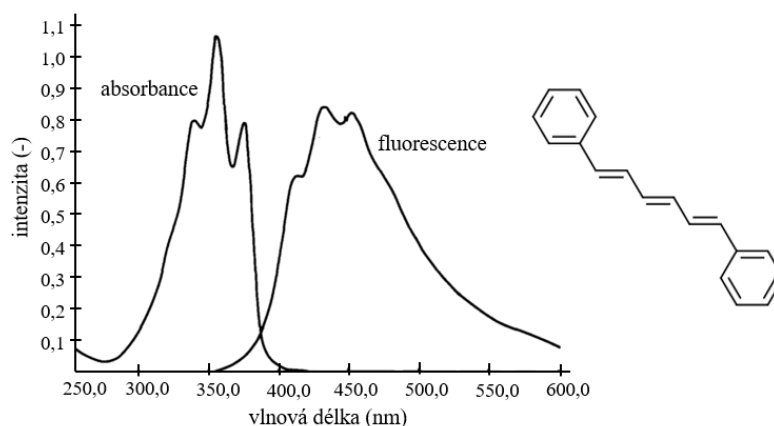
nemá schopnost fluoreskovat. Podle typu vazby, jakou se váží fluorofory k molekule rozlišujeme: kovalentně vázané sondy (fluorescenční značky) a fyzikálně vázané (fluorescenční sondy). Fluorescenční značky se k pozorované látce váží prostřednictvím kovalentní vazby. Obvyklá místa navázání jsou povrchově aktivní látky, fosfolipidy, proteiny a polynukleotidy a další [34].

Fluorescenční sondy se k pozorované látce váží prostřednictvím nekovalentní vazby. Tím, že se spojí sonda a sledovaná látka se obvykle změní fluorescenční vlastnosti použité fluorescenční sloučeniny. Navíc jsou sondy silně závislé na vlastnostech prostředí (okolním pH, polaritě prostředí, viskozitě nebo například přítomnosti látky, která zhasí vyzářovanou fluorescenci). Důležitá je proto správná volba sondy pro daný experiment [35].

2.4.3.1 Difenylhexatrien

1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien je fluorescenční sonda, zkráceně DPH, využívající se pro studium fluidity membrán. Patří mezi nejpoužívanější anizotropní sondy. Řadí se do skupiny hydrofobních sond, prakticky nevykazující fluorescenci ve vodném prostředí. Pokud se ale nachází v prostředí například membrán nebo v jiném lipofilním prostředí vykazuje vysokou intenzitu fluorescence [37].

Molekula sondy má válcový charakter. Polarizace fluorescence je velice citlivá na změnu orientace podélné osy, jelikož podélná osa je rovnoběžná s emisním a absorpčním transmisním momentem. Z předpokladu, že molekula DPH v izotropním prostředí rotuje taktéž izotropně vyplývá, že se zvyšující se naměřenou anizotropií fluorescence DPH klesá fluidita prostředí a roste uspořádanost [38].



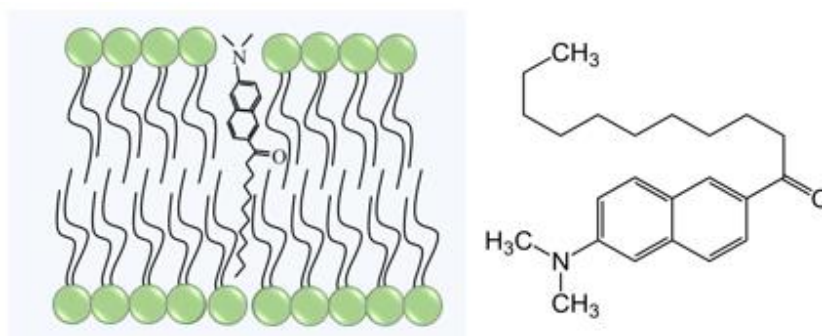
Obrázek 13: Nalevo na obrázku je znázorněno emisní a excitační spektrum difenylhexatrienu v hexanolu, koncentrace DPH $1 \cdot 10^{-6}$; vpravo je vyobrazen strukturní vzorec difenylhexatrienu [39].

Absorpční maximum sondy je 355 nm a emisní maximum 425 nm v prostředí hexanolu. Doba života v membránách je 7,9 ns při 37 °C. Molekulová hmotnost DPH je $232,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Tato sonda je vysoce hydrofobní o fundamentální anizotropii 0,395. Právě z důvodu její lipofilní povahy je často používána ke studiu fosfolipidových nebo obecně lipidických dvojvrstev a membrán. V případě, že se dostane do hydrofobního prostředí, vykazuje vysokou fluorescenci, zatímco nesolubilizovaná sonda ve vodném prostředí neposkytuje značnou fluorescenční odpověď a tím nedochází ke zkreslení vypovídající hodnoty fluorescenční odpovědi v prostředí membrány [38].

2.4.3.2 Laurdan

Laurdan je organická sloučenina, která se používá jako fluorescenční barvivo ve fluorescenční mikroskopii. Používá se ke zkoumání vlastností membrán, charakterizaci fosfolipidových dvojvrstev a buněčných membrán. Jednou z jeho nejdůležitějších charakteristik je jeho citlivost na fázové přechody, jakožto i na další změny ve fluiditě, nebo samotná citlivost pro přestup vody membránami a útvary jim podobnými [40].

Na Obrázku 14 je strukturní vzorec laurdanu. Vzhledem k částečnému rozložení náboje mezi amino a karbonylovými skupinami v molekule má naftalenová část dipólový moment, který po excitaci výrazně ovlivňuje molekulu a způsobuje přeorientování okolních dipólů rozpouštědla, ve kterém se nachází. Z tohoto důvodu je schopen fluorescence a je využitelný na poli elektronové mikroskopie. V silně polárních prostředích vykazuje laurdan emisi posunutou k vyšším vlnovým délkám díky dipolárním relaxačním procesům [41].



Obrázek 14: Napravo je strukturní vzorec laurdanu, nalevo zobrazeno začlenění laurdanu do membrány dle [42] Parasassi a spol.

Díky své struktuře a svým fluorescenčním charakteristikám je laurdan velmi užitečný ve studiích dynamiky lipidových dvojvrstev. Hydrofobní konec umožňuje solubilizaci barviva v lipidové dvojvrstvě, zatímco naftalenová část molekuly zůstává na úrovni glycerolových částí fosfolipidů membrány. To znamená, že fluorescenční část molekuly je umístěna směrem k vodnému prostředí (Obrázek 14), což umožňuje přeuspořádání dipólů rozpouštědla a emisi laurdanu. Uspořádání molekul rozpouštědla v okolí sondy vyžaduje energii. To snižuje energii excitované sondy, což se odráží v červeném posunu v emisním spektru [42].

V dodekanu lze pozorovat maximum emise u 380 nm, v polárním methanolu pak u 490 nm. Ve vodném prostředí ale prakticky nefluoreskuje, vykazuje zde dobu života méně než 100 ps. V organických rozpouštědlech a membránách vykazuje silnou fluorescenci a dobu života zhruba 4–8 ns [43].

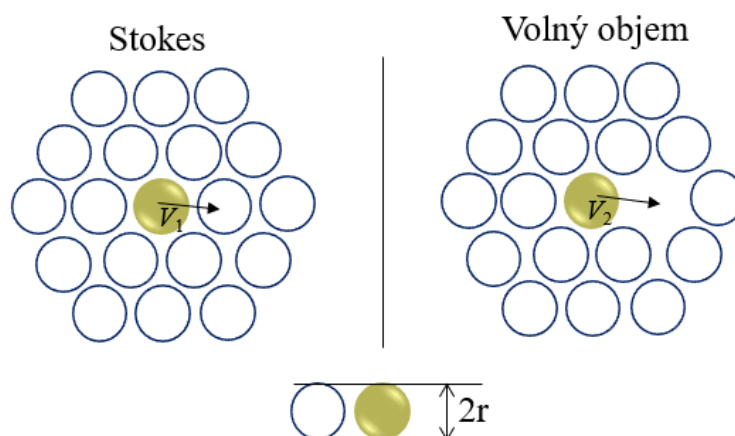
2.5 Mikroviskozita a její stanovení pomocí fluorescenčních sond

U látek tvořící membránové struktury, jako vezikulárních systémů nebo například lipidů se předpokládá, že membrána není tvořená homogenní fází, ale mohou zde být přítomny různé fáze, které mohou dynamicky koexistovat. V případě, obsahuje-li řetězec dvojnou vazbu je výrazně snížena teplota tání dvojvrstvy. Fluidita takovéto membrány je značná, dále se vyznačuje chaotickým uspořádáním hydrofobního jádra dvojvrstvy, označuje se jako fáze **kapalná-neuspořádaná** (z angl. liquid-disorder). Naproti tomu vezikuly tvořené delšími uhlovodíkovými přímými řetězci, mohou být uspořádány těsněji, vyznačují se vyšší teplotou tání

zapříčiněnou silnější hydrofobní interakcí. Je vytvářena kompaktní gelová fáze, mající omezenou fluiditu, která je označována jako **pevná-uspořádaná** (angl. solid-ordered) fáze. U membrán vezikul obsahující steroly jako cholesterol, který se vmezeřuje mezi acylové řetězce v hydrofobní části, dochází ke změnám fluidity. Na jednu stranu cholesterol zabraňuje nadměrné neuspořádanosti jako je tomu u kapalné-neuspořádané a na druhou stranu udržuje fluiditu podobně jako tomu je u pevné-uspořádané. Dochází tak ke vzniku úplně nové fáze nesoucí název **kapalná-uspořádaná** (z angl. liquid-ordered), která je uspořádaná díky gelové fázi, ale přesto přetrvává částečně ve fluidním stavu [44].

Ve fluorescenčních technikách udává viskozitní zátěž na molekulu sledované sondy difúzní koeficient. Ten, ať už to jako rotační nebo translační difúzní koeficient, umožňuje vyhodnocení fluidity mikroprostředí například v oblasti membrán nebo jiné oblasti v mikro měřítku. Ačkoli bylo navrženo velké množství vztahů pro přepočet difúzního koeficientu na viskozitu prostředí neexistuje vztah, který by vyhovoval. Většina z nich platí pouze pro pevné koule makroskopického měřítka, za které fluorescenční sondu považovat nelze, především díky velikosti její molekuly, která bývá stejně velká nebo menší než molekuly tvořící okolní prostředí, které se má pomocí ní charakterizovat. Další problémy vznikají v případě organizovaných soustav, například u vezikulárních systémů, biologických membrán apod., které nejsou izotropní. Z toho vyplývá, že pomocí fluorescenčních sond nejsme schopni získat absolutní hodnotu viskozity, jakožto makroskopického parametru [34].

Jedním z mikroskopických přístupů řešení problému viskozity vyvinuli Gierer a Wirtz [45]. Jejich teorie bere v úvahu konečnou tloušťku vrstvy rozpouštědla a existenci vakancí mezi molekulami (tzv. volný objem). Fluorescenční sonda se totiž v prostředí může pohybovat dvěma různými mechanismy (viz Obrázek 15). Buďto klasickým Stokesovým mechanismem (difúzní proces probíhá s posunem molekul rozpouštědla), nebo Giererovým mechanismem, který popisuje volnou objemovou difúzi, při které se rozpuštěná molekula stěhuje do volných vakancí mezi molekulami rozpouštědla [34].



Obrázek 15: Difúzní translační procesy. Zeleně je znázorněna rozpuštěná molekula, bílé molekuly rozpouštědla, kdy je srovnatelná velikost molekul.

Volba vhodné metody závisí na systému, který má být studován. Například pro studium viskozity zkoumaných vezikulárních systémů se kvůli rušivým vlivům difúze hodí více použití molekulárních rotorů nebo fluoroforu, který vytváří intramolekulární excimer, popřípadě metoda měření anizotropie fluorescence.

2.5.1 Molekulární rotory

Jako molekulární rotory jsou označovány molekuly, u kterých v excitovaném stavu dochází ke změně jejich geometrie. Ta vzniká v důsledku vnitřní rotace specifických skupin, změnou spojenou s přenosem náboje. Rotaci brání prostředí, ve kterém se sonda vyskytuje a projeví se to na kvantovém výtěžku fluorescence, který je přímo úměrný viskozitě prostředí dle následující rovnice:

$$\frac{\Phi_F}{1 - \Phi_F} = a\eta^\kappa, \quad (2)$$

kde a, κ jsou konstanty, Φ_F je kvantový výtěžek fluorescence a η je viskozita. V případě, že je změna teploty příčinou změny viskozity má vztah následující podobu:

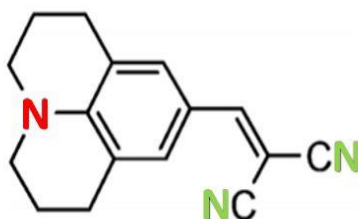
$$\frac{\Phi_F}{1 - \Phi_F} = b(\eta/T)^\kappa, \quad (3)$$

kde b, κ jsou konstanty, Φ_F je kvantový výtěžek fluorescence a η je viskozita a T je teplota.

Ekvivalentní viskozita naměřená metodou molekulárních rotorů bude vždy menší, než je skutečná makroskopická viskozita prostředí. To je podmíněno existencí volného objemu molekul prostředí a také srovnatelnou velikostí rotujícího segmentu sondy s velikostí molekul v okolí [46].

2.5.1.1 Dikyanovinyljulolidin

Dikyanovinyljulolidin (DCVJ) je nejběžnějším z používaných molekulárních rotorů. Přenos intramolekulárního náboje probíhá mezi dusíkem julolidinové skupiny, jako donorem elektronů, a nitrilovou skupinou, viz Obrázek 16. Je-li intramolekulární rotace inhibována vysokou viskozitou mikroprostředí, rovnováha relaxace posouvá směrem k vyšším radiacním relaxačním rychlostem. Jinými slovy, intenzita fluorescence se zvyšuje se zvýšenou viskozitou solventu [46].



Obrázek 16: Strukturní vzorec dikyanovinyljulolidinu, dusík julolidinové skupiny je znázorněn červeně, dusíky nitrilové skupiny zeleně [44].

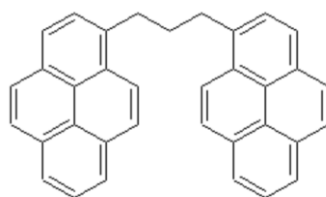
2.5.2 Tvorba intramolekulárního excimeru

Intramolekulární excimery mají dva fluorofory. Molekula je tvořena dvěma identickými fluorofory propojených jednoduchým řetězcem, který je do značné míry pružný. Tvorba tohoto typu excimeru vyžaduje těsné přiblížení obou fluoroforů. Přiblížení je možné v důsledku vnitřní

rotace fluoroforů v průběhu doby života excitovaného stavu. Ve fluidním prostředí je dominantní excimerová emise, se zvyšující se viskozitou prostředí roste emise monomeru [47].

2.5.2.1 Bispyrenylpropan

Intramolekulární excimer je zpravidla tvořen dvěma fluorescenčními skupinami propojenými jednoduchým můstkem, tak je tomu i v případě molekuly sondy 1,3-bis(1-pyrenyl) propanu (P3P), jejíž struktura je vyobrazena na Obrázku 17. Molekula obsahuje dvě pyrenylové skupiny, které mohou tvořit intramolekulární excimer v důsledku konformačních změn, které spojují excitované a neexcitované chromofory. Očekává se, že tento proces bude efektivnější ve více tekutém prostředí, z tohoto důvodu lze pro odhad lokální viskozity v mikroprostředí použít poměr intenzity excimeru k emisním maximům ve fluorescenčních spektrech P3P [48].

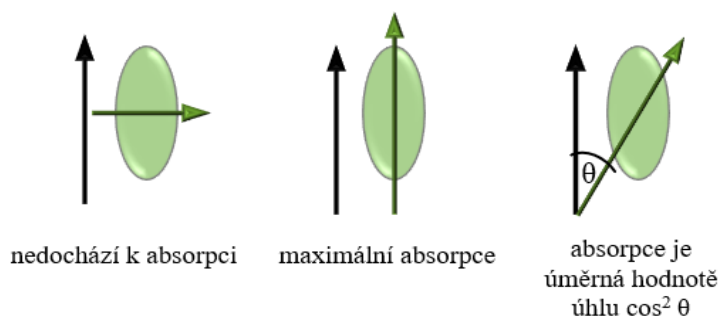


Obrázek 17: Strukturální vzorec bispyrenylpropanu [48].

2.5.3 Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie fluorescence se dá využít jak pro zkoumání chemických látek, tak v oblastech biochemie, fyziky a v neposlední řadě v lékařských výzkumech. V této metodě se provádí kvantitativní analýza interakce mezi fluorescenčně značenými a fluorescenčně neznačenými molekulami. Celé měření je ovlivněno fotoselekcí. Excitace fluoroforu nastává díky působení paprsku polarizovaného světla.

Vezme-li se do úvahy světlo, jako elektromagnetickou vlnu skládající se ze složky elektrické a magnetické, jsou jednotlivé složky na sebe kolmé. Zdroj světla, pokud nejsou použity polarizátory se skládá s elektrické a magnetické složky šířící se ve všech rovinách, směrech. Toto je při měření anizotropie nevyužitelné, proto se používají polarizátory. Polarizátor vybere pouze jednu rovinu, a tak získáváme lineárně polarizované světlo, kdy kmitá elektrická složka v jedné rovině, což je pro měření důležité. Pokud je daný systém fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, molekula a její fluorofory orientované ve stejné rovině, jako elektrický vektor budícího záření, jsou excitovány přednostně, viz Obrázek 18. Nastává jev zvaný **fotoselekce**, popisuje pravděpodobnost absorpce fotonů a jejich následnou excitaci [49].



Obrázek 18: Fotoselekce, černá šipka zobrazuje rovinu polarizovaného světla, zeleně je znázorněn přechodový moment molekuly [34].

Je-li tedy vzorek ozářen polarizovaným světlem, nastává excitace pouze těch molekul mající vhodnou orientaci vzhledem ke zdroji, budícímu paprsku. Orientace fluoroforů ve vzorku tedy ovlivňuje signál. Vhodně orientované fluorofory absorbují, poté depolarizují, to znamená, že během své doby života podléhá molekula fluoroforu rotačnímu pohybu a následuje emise záření. V důsledku toho, že se molekula pootočila emituje fotony k detektoru pod jinou rovinou oproti rovině budícího záření a tento rozdíl přístroj zaznamená. Dochází k pootočení roviny polarizovaného světla s různou pravděpodobností v porovnání s rovinou budícího záření, kterou byla molekula uvedena do excitovaného stavu. Tento jev je závislý na viskozitě prostředí, velikosti molekuly (rotační difuzi) a vlastní rychlosti molekuly. Z toho tedy plyne, že v prostředí nízké viskozity, kde fluoroforům nebrání nic v pohybu, se bude hodnota anizotropie blížit k nule. Naopak u velké molekuly fluoroforu v prostředí vysoké viskozity bude naměřená hodnota nejvyšší [35].

V případech anizotropních prostředí, jakými jsou lipidové dvojvrstvy, tekuté krystaly, nebo membránové systémy, kde je rotačnímu pohybu sondy bráněno, platí **Perrinova rovnice**:

$$\frac{r_0}{r(t)} = 1 + \frac{\tau}{\varphi}, \quad (4)$$

kde r_0 je fundamentální anizotropie, $r(t)$ je steady-state anizotropie, φ je rotační korelační čas (pootočení molekuly o 1 radián $\varphi = \frac{1}{6 \cdot D_y}$).

Hodnota fundamentální anizotropie se dá, pomocí Perrinovy rovnice, využít ke zjištění například rotačního difúzního koeficientu:

$$D_y = \frac{k_B T}{6 \cdot V \eta}, \quad (5)$$

kde V je objem částice, η je viskozita prostředí, k_B je Boltzmannova konstanta a T je absolutní teplota, pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah. V těchto případech neklesá hodnota anizotropie k nule, ale k rovnovážné hodnotě r_∞ .

Je nutné mít na paměti, že rozdíly v hodnotě ustálené anizotropie vyplývající ze změny vnějších podmínek, například teploty, nemusí být jen příčinou změny rychlosti otáčení molekuly sondy, ale také vlivem změny její doby života.

Anizotropie je **aditivní veličina**. Celková anizotropie je dána součtem individuálních anizotropií. Může být do značné míry ovlivněna rozptylem (elastický rozptyl světla), který ovlivňuje rovinu polarizace. Všechny naměřené složky anizotropie r_i přispívají k celkové intenzitě fluorescence jednotlivých frakcí $f_i = I_i/I$, a součtem individuálních anizotropií získáváme celkovou anizotropii:

$$r = \sum_i f_i r_i. \quad (6)$$

V případě, je-li přítomen rozptyl světla, u zakalených vzorků, je v důsledku toho hodnota naměřené anizotropie nabývá vyšších hodnot [34].

2.6 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS, z anglického *dynamic light scattering*) se řadí mezi jednoduché neinvazivní metody, u kterých není potřeba předchozí kalibrace. Tato technika

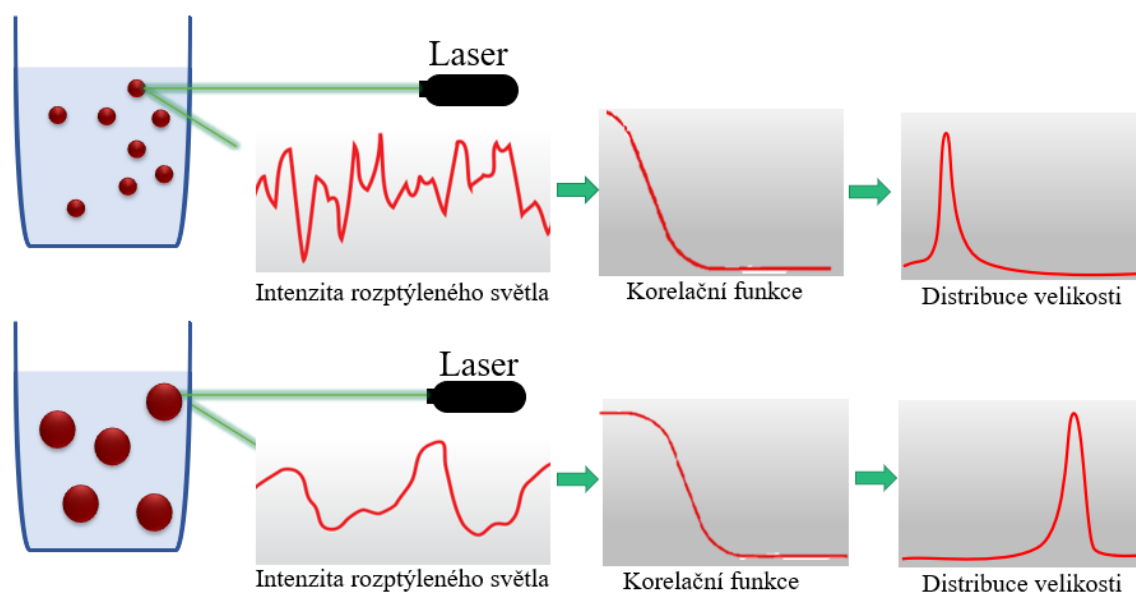
umožňuje určit velikost částic a jejich distribuci. Využívá se pro měření vzorků obsahující micely, polymery, proteiny nebo například nanočástice [50;49].

Při měření jsou částice v neustálém, neuspořádaném tepelném pohybu (Brownův pohyb) a tím dochází ke změně frekvence dopadajícího a odraženého záření, dochází tedy k Dopplerově jevu. Z tohoto důvodu je dalším názvem pro tuto techniku kvazielastický rozptyl světla (QELS) [51].

Měří-li se velikost částic je stanovován tzv. hydrodynamický průměr, respektive hydrodynamický poloměr. Hydrodynamický poloměr je poloměr hypotetické koule, která difunduje se stejnou rychlostí jako měřená částice. V koloidních disperzích jen velmi zřídka existují systémy ve formě rigidní koule, se kterou tato technika počítá, proto je toto měření hypotetické [52].

2.6.1 Stanovení velikosti pomocí DLS

Molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem. Podle toho, jak se částice pohybuje vůči detektoru, frekvence rozptýleného záření se buď zvyšuje, nebo snižuje a tím vzniká fázový rozdíl mezi rozptýlenými vlnami a dochází k interferenci. Platí tedy, že čím rychleji se molekuly pohybují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného záření. Rychlost změny intenzity rozptýleného záření přímo závisí na pohybu molekuly. Pohyb molekuly ovlivňuje teplota (čím je vyšší, tím rychleji se molekuly pohybují), viskozita rozpouštědla (čím viskóznější je rozpouštědlo, tím menší rychlostí se molekuly pohybují) a velikost částic (čím větší jsou částice, tím pomalejší rychlostí se pohybují). Pokud jsou teplota a vlastnosti rozpouštědla konstantní, pak je změna intenzity rozptýleného světla přímo úměrná velikosti molekuly. Tato veličina se nazývá hydrodynamický poloměr. Pokud by se molekuly v roztoku chovaly stacionárně, pak by množství rozptýleného světla bylo konstantní. V polydisperzních systémech se pohybují částice více velikostí, pak výsledná korelační funkce je složitější než u systému monodisperzních. Dolní hranice měřicího rozsahu se pohybuje okolo 0,5 nm a maximum okolo 3 μm , protože větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu [53].



Obrázek 19: Rozdíl mezi fluktuací intenzity signálu u malých a velkých částic, rozdíl v korelačních křivkách a výsledné distribuci [54].

Metoda je založená na měření rychlosti již zmíněného Brownova pohybu. Pro změření této rychlosti je třeba posvítit na částice laserem. Částice rozptylují světlo, které je snímáno pod určitým úhlem. Rozptýlené světlo od měřených částic podléhá interferencím konstruktivním nebo destruktivním. V důsledku náhodného neustálého pohybu částic dochází ke změnám vzdáleností mezi částicemi a tím i k fluktuaci intenzity rozptýleného světla s časem. To je analyzováno autokorelátorem, který vytvoří korelační křivku (Obrázek 19) [54]. Z korelační křivky jsme pak schopni dopočítat hydrodynamický průměr d na základě znalosti teploty při měření T a viskozity rozpouštědla η_0 pomocí **Stokes–Einsteinovy rovnice**:

$$d = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}, \quad (7)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta a D je difúzní koeficient [49].

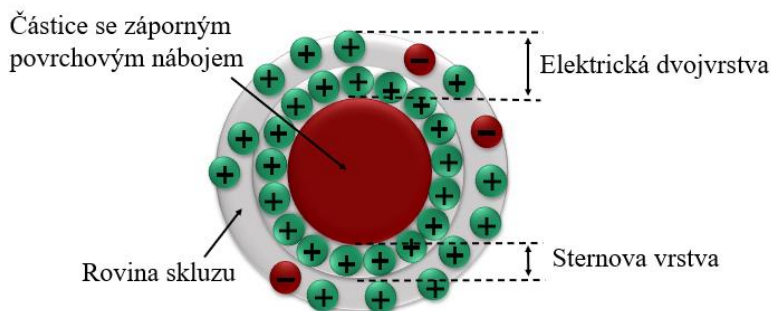
2.7 Elektroforetický rozptyl světla

Na rozdíl od analýzy velikosti částic se metoda elektroforetického rozptylu světla (ELS) používá k charakterizaci povrchového náboje koloidů, částic v kapalném disperzním prostředí velikosti nanometrů až jednotek mikrometrů. Významnou vlastností částic koloidů je, že v porovnání s částicemi většími než zmíněné rozmezí, mají obrovský specifický povrch, v důsledku toho rozhraní částice a kapaliny může silně ovlivnit fyzikální vlastnosti koloidních disperzí např. dispergovatelnost nebo stabilitu [55].

Základním fyzikálním principem elektroforetického rozptylu světla je jev elektroforéza. Při níž dochází k pohybu nabitých částic dispergovaných v prostředí vlivem elektrického pole. ELS je technika pro měření elektroforetické mobility částic koloidních systémů. Výstupem této metody je hodnota elektroforetické pohyblivosti a zeta potenciálu [56].

2.7.1 Stanovení zeta potenciálu metodou ELS

V blízkosti nabitě částice dispergované v prostředí dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy. Vnitřní část této dvojvrstvy je tvořena z iontů mající opačný náboj, než má dispergovaná částice. Tato vrstva je vázána pevně a nazývá se Sternova vrstva. Vnější částí je difúzní vrstva, která obsahuje jak souhlasně, tak opačně nabitě molekuly jako dispergovaná částice. Vnější vrstva je vázána s menší pevností. Složení difúzní vrstvy je závislé na koncentraci, pH nebo například iontové síle [57].



Obrázek 20: Schématický nákres jednotlivých částí elektrické dvojvrstvy [57].

Dochází zde k elektroforéze, tedy tyto nabitě částice se po vložení napětí začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě. Rovinou skluzu je myšlena hypotetická rozhraní mezi pohybující se částicí a vrstvou rozpouštědla. Zeta potenciál je potenciál na této rovině mezi částicí a rozpouštědlem, často je označován jako elektrokinetický potenciál [58].

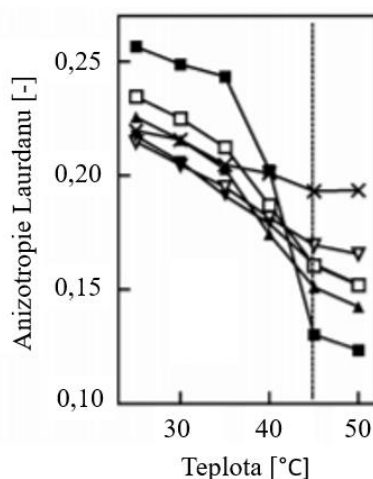
Jednotlivé části elektrické dvojvrstvy a rovinu skluzu sledované částice vidíme na Obrázku 20. Měří-li se zeta potenciál, využíváme měrné cely s elektrodami, kde využíváme elektrického pole. Měřené částice se během elektroforézy pohybují a rozptylují dopadající laser. Díky tomuto udaného pohybu elektrickým polem se mění frekvence původního a rozptýleného záření. Jedná se o tzv. Dopplerův jev. Původní paprsek je rozdělen na dvě části. Jedna je považována za referenci, druhá je soustředěna na vzorek. Při pohybu částic vlivem působení elektrického pole, dojde ke kolísání intenzity rozptýleného světla s frekvencí úměrnou rychlosti částic. Tuto informaci pak přebírá počítač, software Zetasizer Nano, a vytváří frekvenční spektrum, ze kterého lze vypočítat elektroforetickou pohyblivost, a tedy i zeta potenciál. Na základě znalosti zeta potenciálu jsme schopni určit, zda se jedná o stabilní nebo nestabilní disperzi. Pokud se zeta potenciál disperze nachází v rozmezí od -30 mV do 30 mV, tak se jedná o nestabilní disperzi, kdy odpudivé elektrostatické síly nejsou dostatečné a dochází k agregaci částic. Zda se zeta potenciál disperze nachází pod či nad tímto rozmezím tak mluvíme o stabilní disperzi a elektrostatické síly jsou dostatečné pro zabránění agregace [59].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Současný stav řešené problematiky je rozdělen do dvou podkapitol. První kapitolou je **3.1 Studium systému s využitím fluorescenčních sond**, tato kapitola pojednává o studiu zkoumaných kataniontových vezikul nebo systémům jim podobným, jako jsou lipozomy nebo membránové systémy, fluorescenčními technikami. Práce jsou orientovány na využití fluorescenční sondy laurdanu, DPH, DCVJ a P3P. Ve druhé části se kapitola **3.2 Příprava, zvýšení fyzikální stability a snížení toxicity kataniontových vezikul** zabývá samotnou přípravou a vylepšením vlastností připravovaných kataniontových vezikul.

3.1 Studium systému s využitím fluorescenčních sond

Ve své práci popisují studium lipozomálních systémů **Harris a kol.**, studovali membrány tvořené dipalmitoylfosfatidylcholinem za použití fluorescenční sondy *laurdanu*. Předmětem výzkumu bylo zhodnocení použité sondy laurdanu, zda je tato fluorescenční látka schopná reagovat na rozdíly v uspořádání dvojvrstvy a změny fluidity v závislosti na změnách teploty. Pro zhodnocení využili mimo jiné techniku fluorescenční anizotropie. Vezikuly (lipozomy) tvořené dipalmitoylfosfatidylcholinem (DPPC) s různým obsahem cholesterolu (0 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 %). Čistý DPPC má přechod z uspořádané pevné fáze do neuspořádané kapalné fáze při 41,5 °C (stanoveno kalorimetricky) [60]. Vzorky měřeny od 50 do 25 °C s krokem 5 °C. Intenzita fluorescence při 435 nm (excitace 350 nm) byla měřena s excitačními a emisními polarizátory paralelně, poté kolmo. K dosažení teploty přechodu došlo mezi 40 a 45 °C. Fázový přechod z pevné uspořádané fáze do kapalné neuspořádané fáze byl pozorován jako pokles hodnot anizotropie z 0,25 na 0,12. Začlenění různých množství cholesterolu do membrán za účelem vytvoření stabilního systému nezpůsobilo zvýšení teploty přechodu. Naproti tomu cholesterol snížil jednotlivé rozdíly naměřených hodnot anizotropie, lipozomy s vyšším obsahem cholesterolu měly membránu rigidnější, což je patrné na naměřených hodnotách anizotropie, jak je graficky znázorněno na Obrázku 21. Laurdan pro stanovený systém odrážel změny ve fluiditě fosfolipidových membrán [61].



Obrázek 21: Graf závislosti fluorescenční anizotropie laurdanu, měřeno na vzorcích lipozomů s různým obsahem cholesterolu, na změně teploty. Koncentrace cholesterolu: plné čtverce (0 %), čtverce bez výplně (10 %), plné trojúhelníky (15 %), trojúhelníky bez výplně (20 %), plné obrácené trojúhelníky (25 %), obrácené trojúhelníky bez výplně (30 %), křížky (40 %) [61].

Lúcio a kolektiv využili měření anizotropie za pomoci fluorescenční sondy *laurdanu* demonstrovali změny viskozity v prostředí lipidových membrán. Studovali strukturu a polaritu povrchu fosfolipidové dvojvrstvy tvořené DMPG (dimyristoylfosfatidylglycerol). Při interpretaci výsledků fluorescenční anizotropie brali do úvahy přítomnost dvou emisních pásem ve spektru laurdanu. Při vlnové délce 480 nm je naměřená anizotropie z volného excitovaného stavu, při 430 nm je anizotropie měřena ze dvou excitovaných stavů. Interpretaci tedy řeší se zohledněním dvou dob života excitovaného stavu laurdanu, první krátkou nereagující na polaritu a druhou související s přenosem náboje [62].

Lee a spol. ve svém článku diskutují stabilitu kataniontových vezikul, měřením anizotropie za využití hydrofobní sondy *difenyhexatrienu*. Vezikuly připravili ze směsi CTA-DS v kombinaci s různým molárním zlomkem DHDAB (dihexadecyldimethylamonium bromid) přesněji s obsahem 0,1;0,3 a 0,5. Ve vzorcích obsahující 0,1 DHDAB byly vytvořeny extrémně nestabilní vezikuly a nebyla získána spolehlivá data pro vyhodnocení. Průměrnou velikost vytvořené kladně nabitě kataniontové vezikuly stanovili na 90 nm. Také se zvýšením přidavkem DHDAB ($x_{\text{DHDAB}} = 0,5$) bylo oproti vzorkům obsahujícím 0,3 DHDAB pozorován nárůst kladného náboje vezikuly, který byl pozorován měřením zeta potenciálu, který vzrostl z 15mV na 34mV. Také životnost poukazuje na zvýšení dlouhodobé stability vezikulárního systému. U vezikul s obsahem ($x_{\text{DHDAB}} = 0,3$) byla stanovena dlouhodobá stabilita na 3 ± 1 den, s dalším zvýšením obsahu DHDAB ($x_{\text{DHDAB}} = 0,5$) vzrostla dlouhodobá stabilita na 35 ± 14 dní. Za účelem získání informací o balení kataniontových vezikul využili hydrofobní sondu DPH. Pro kataniontové CTA-DS / DHDAB vezikul ve vodě, bylo zjištěno snížení hodnoty anizotropie fluorescence v případě, když byl x_{DHDAB} zvýšen z 0,3 na 0,5 (0,453 na 0,376). Tyto výsledky naznačily fakt, že vezikulární dvojvrstva se stala fluidnější při vysokém x_{DHDAB} , což lze přičíst zvýšené elektrostatické interakci mezi kladně nabitými skupinami v molekule DHDAB [63].

Analýzu mikroviskozity membrány s inkorporovaným léčivem ve své práci provedli **Poojari a spol.** Zvoleným léčivem byl hydrofobní lék (ITZ) a pro studium byla zvolena sonda *diphenylhexatrien*. Pomocí této sondy získali informace o organizaci membrány obsahující jak fluorescenční sondu DPH za přítomnosti ITZ. Výsledky ukázaly, že samotná sonda má zanedbatelný dopad na strukturní vlastnosti lipidové membrány a funguje dobře. Přesto v případě dotace membrány rozměrným léčivem bylo ovlivněno měření anizotropie fluorescence a naměřené hodnoty zkresleny. Výsledky ukázaly, že měření fluorescence anizotropie DPH nemusí předpovědět pořadí, a balení lipidové dvojvrstvy dotované molekulami léčiva, že umístění a orientace DPH mohou být ovlivněny přítomností jiných molekul než lipidů ve dvojvrstvě, zejména velkých, tuhých, amfipatických molekul, které se orientují rovnoběžně s povrchem membrány. Tím pádem, použití DPH v systémech s přísadami vyžaduje opatrnou interpretaci údaje o fluorescenční anizotropii s ohledem na možné účinky přísad na chování DPH [64].

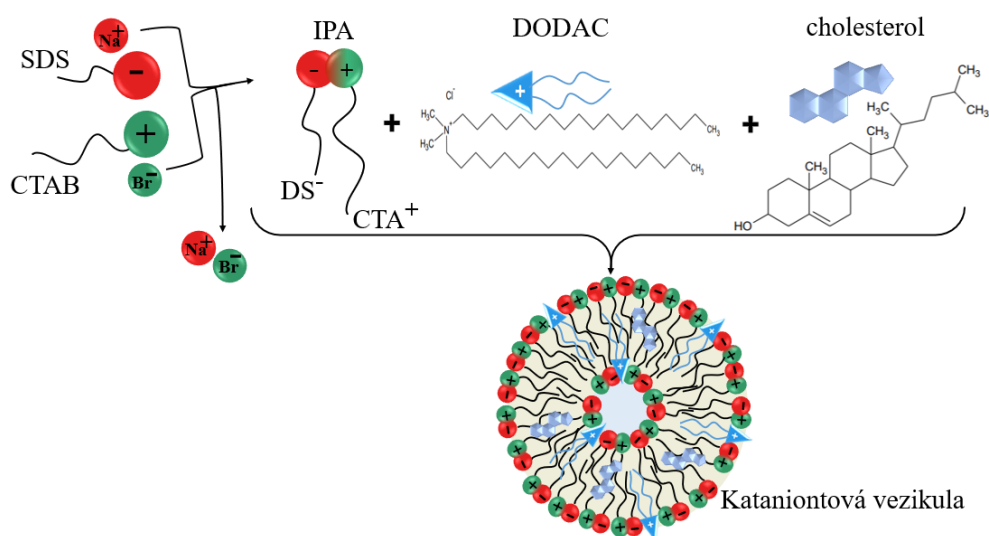
Wen a kol. provedli experimenty na unilamelárních vezikulách vytvořených z di-n-octadecyl-dimethylamonium bromidu (DODAB), di-n-hexadecyl-dimethylamonium bromidu (DHAB), di-n-dodecyl-dimethylamonium bromidu (DDAB) a dalších. Použili fluorescenční sondu P3P o koncentraci 10^{-5} mol·dm⁻³. Využívají sondu P3P pro stanovení sol gel přechodu (změnách ve fluiditě) membrány při změnách teploty. Měření byla provedena na

spektrofluorimetru Spex FluoroMax-2 s excitační vlnovou délkou 346 nm pro P3P. Poměr intenzity monomeru k excimeru IM / IE byl stanoven měřením I1 / IE, kde I1 (376 nm) je první fluorescenční vibrační pás monomeru. V závěru shrnují, že tato sonda kvalitativně odráží rozdíly ve stavech membrány [65].

James A. Levitt a spol. zkoumají fluorescenční anizotropii molekulárních rotorů. Jako molekulární rotor využili ve své práci 9-(2,2-dikyanovinyl)julolidin (DCVJ), jako sondu vhodnou pro stanovení mikroviskozity prostředí kolem fluoroforu [66].

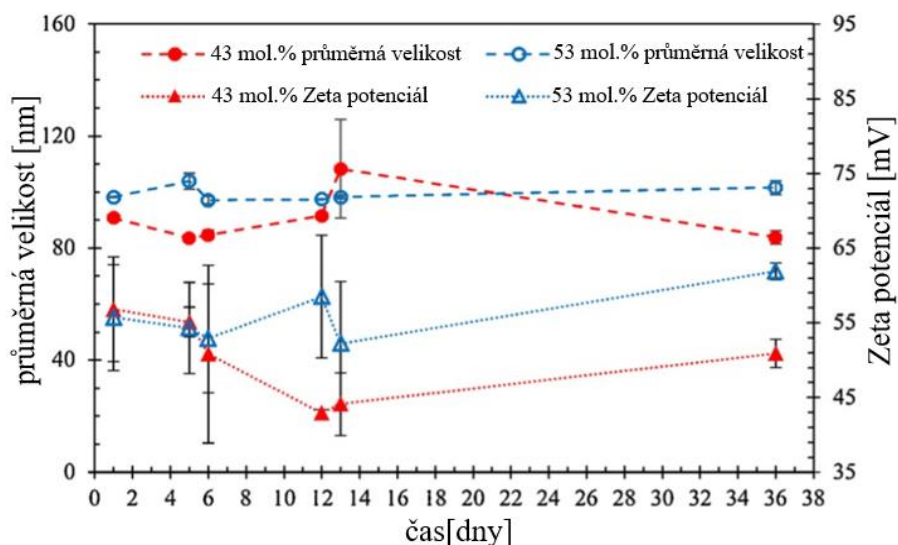
3.2 Příprava, zvýšení fyzikální stability a snížení toxicity kataniontových vezikul

Martina Havlíková a spol. se zabývali tématem kataniontových vezikul stabilizovaných dvouřetězcovým tenzidem a cholesterolem. Ve své práci posuzují vliv měnícího se obsahu cholesterolu na fyzikální krátkodobou i dlouhodobou stabilitu a vlastnosti kataniontových vezikul. Výzkum byl proveden na kataniontových vezikulách sestávajících z IPA a kladně nabitého dvouřetězcového surfaktantu chloridu dioctadecyldimethylamonného (DODAC) v molárním poměru 9:1. Pro tvorbu iontových amfifilních párů využili bromid hexadecyltrimethylamonný (CTAB) společně s opačně nabitým dodecylsulfátem sodným (SDS), schéma přípravy viz Obrázek 22.



Obrázek 22: Schéma přípravy kataniontové vezikuly z IPA obsahující DODAC a cholesterol [67].

Průměrná velikost vezikul byla stanovena za použití metody dynamického rozptylu světla a zeta potenciál byl měřen elektroforetickým rozptylem světla (ELS). Nejvyšší dlouhodobá stabilita byla určena pro vezikuly obsahující 43 a 53 mol. % cholesterolu, vezikuly s tímto obsahem neměly tendence spolu agregovat, srážet se a vytvářet zakalené roztoky, čemuž nasvědčují i výsledky měřeného zeta potenciálu, kde byly naměřeny hodnoty v kladné stabilní oblasti nad 30 mV. Výsledky jsou znázorněny v následujícím grafu na Obrázku 23.



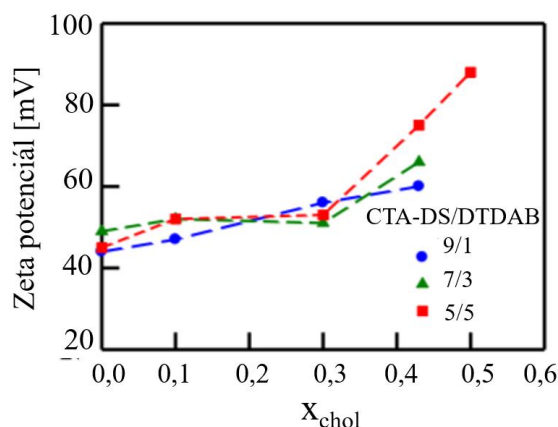
Obrázek 23: Závislost průměrné velikosti a zeta potenciálu v čase pro vzorky obsahující 43 mol.% cholesterolu (červené křivky) a 53 mol.% cholesterolu (modré křivky) [67].

Změna ve fluiditě membrány byla studována fluorescenčně za použití sondy laurdanu (koncentrace ve vzorku $5 \cdot 10^{-7}$ M). Emise laurdanu byla měřena na fluorimetru Edinburgh Instruments za laboratorní teploty díky teplotnímu modulu (Peltier), vzorek byl udržován homogenní díky kontinuálnímu míchání. Přidávky cholesterolu měly za následek zvětšení velikosti vezikul a tím i zvětšení povrchu vezikuly za současného snížení povrchového náboje. V důsledku toho došlo ke snížení počtu interakcí s vodou a zároveň klesla uspořádanost vody v okolí vezikul [67].

Ve své práci se **Chih-Jung Wu a kol.** zaměřují na přípravu kladně nabitých kataniontových vezikul a pokoušeli se o zvýšení jejich fyzikální stability a o zvýšení rigidity membrány. Zkoumaný systém byl tvořen vezikuly CTA-DS (připraveny z roztoků tenzidů CTAB a SDS) s kladně nabitým dvouřetězcovým tenzidem bromidem dialkyldimethylamonným (DXDAB) v různých molárních poměrech od 0,1 do 0,5. Byly použity DXDAB s délkou alkylových řetězců 14 (DTDAB), 16 (DHDAB) a 18 (DODAB) uhlíků. Stabilita kladně nabitých kataniontových vezikul byla následně zkoumána pomocí měření zeta potenciálu, metodou dynamického rozptylu světla. Kladně nabité kataniontové vezikuly, ke kterým byl přidán DXDAB v molárním poměru nižší než 0,3 nevykazovaly přílišnou fyzikální stabilitu. Vzorky s molárním poměrem dvouřetězcového tenzidu, nad 0,3 se jevíly stabilněji, přesto k výraznému posunu hodnoty zeta potenciálu u těchto vzorků nedošlo. Tyto výsledky naznačují, že elektrostatické působení nebylo hlavním faktorem pro zlepšení stability. Předpokladem je, že DXDAB se dvěma symetrickými alkylovými řetězci má významný vliv na balení vezikuly z IPA tvořené CTA-DS. Změnou balení se zlepšila stabilita výsledných vezikul. Se zvyšujícím se obsahem DXDAB může dojít k vytěsnění kladného řetězce CTAB a vytváří se komplex DXDA-DS. Toto má za následek vyčlenění hlavové skupiny a tím ke snížení vzniku defektních struktur v procesu balení. Dalším dosaženým poznatkem je fakt, že s rostoucí délkou řetězce DXDAB dochází ke zvyšování molekulární interakce ve vezikulární dvojvrstvě, čímž je inhibováno rozpouštění kladného CTAB a tím dochází ke zvýšení stability systému. Na druhou stranu rozdíl v délce hydrofobního řetězce ve vezikulách CTA-DS s DODAB by mohl způsobit rozpad vezikul na dvouvrstvé fragmenty, což vedlo k nestabilitě při dlouhodobém skladování.

Proto se jako nejvhodnější dvouřetězcový tenzid ukázal DHDAB, který má stejně dlouhé řetězce jako CTAB a zároveň dostatečně silné molekulární interakce než u DTDAB. Dvouvrstvá struktura katanionických vezikul byla potvrzena enkapsulací hydrofobní fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu měřena fluorescenční depolarizace. Naměřená hodnota fluorescenční anizotropie pro katanionické vezikuly byla 0,25. Hodnoty fluorescenční anizotropie pro vezikuly v kapalném krystalickém stavu a micely jsou obvykle menší než 0,2 a hodnoty pro vezikuly v gelovém stavu jsou vyšší než 0,2. Hodnota fluorescenční anizotropie 0,25 pro směs CTAB-DS/DTDAB značí vytvoření vezikulární struktury [17].

Další práci zaměřenou na zkoumání účinků cholesterolu na zlepšení fyzikální stability katanionových vezikul vypracovali **An-Tsung Kuo a kol.** Své studie provedli na katanionových vezikulách tvořených iontovými amfifilními páry (CTA-DS) v kombinaci s dvouřetězcovým tenzidem DTDAB. Experimentální výsledky ukázaly, že začleněním cholesterolu do vezikul CTA-DS/DTDAB došlo k nárůstu fyzikální stability vezikul. Navýšení stability je přičítáno změnám v balení dvouvrstvy. U vezikul obsahující cholesterol došlo ke zvětšení vzdálenosti mezi nabitými hlavovými skupinami, zároveň se snížila tendence vaznosti protiiontů na povrch vzniklé vezikuly. Dalším příznivým faktorem přítomnosti cholesterolu v membráně byla maximalizace kontaktu mezi sousedními uhlovodíkovými řetězci, čímž se zlepšila mechanická pevnost dvouvrstvy. Výsledky studie vedly ke zjištění, že obsah cholesterolu do 30 mol. % podporoval tvorbu malých vezikul, větší velikost vezikul se tvořila s narůstajícím množstvím. Celkový dopad obsahu cholesterolu 43 mol. % měl i v této studii pozitivní vliv na stabilitu systému tvořeného z katanionových vezikul složených z IPA (CTA – DS) s dvouřetězcovým tenzidem DTDAB v poměru 9:1, stabilita byla stanovena na více než 270 dní [68].



Obrázek 24: Graf závislosti zeta potenciálu na obsahu cholesterolu. Modře je znázorněn poměr CTA – DS : DTDAB; 9:1, zeleně 7:3 a červeně 5:5 [68].

Cytotoxicitu systémů hyaluronan-tenzid studovali na naší fakultě **P. Sauerová, T. Pilgrová, M. Pekař a M. Hubálek Kalbáčová.** Pro studii použili komplexy HA-CTAB a HA-Septonex a testovali jejich cytotoxický efekt na lidské osteoblasty, keratinocyty a fibroblasty. Ke svému výzkumu využili systém s koncentrací tenzidů 3, 6 a 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, koncentrací hyaluronanu 5 a 500 mg/l. Bylo prokázáno, že hyaluronan skutečně snižuje cytotoxicitu obou tenzidů, a to v jakékoli z uvedených kombinací koncentrací [27].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

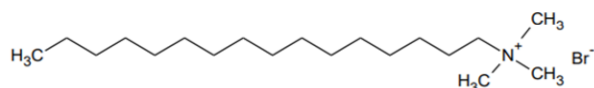
V této kapitole budou představeny použité chemikálie, dále příprava vzorků a metody, které byly použity v rámci řešení diplomové práce.

4.1 Chemikálie

Tenzidy

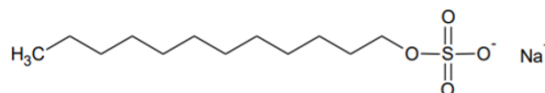
Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB)

CAS: 57-09-0
Sigma Aldrich
čistota: $\geq 98,0 \%$
č. šarže: SLCH0757



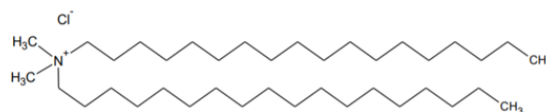
Dodecylsulfát sondý (SDS)

CAS: 151-21-3
Sigma Aldrich
čistota: $\geq 98,5 \%$
č. šarže: SLBT3991



Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid (DODAC)

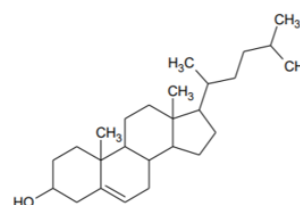
CAS: 107-64-2
Alfa Aesar
čistota: $\geq 97,0 \%$
č. šarže: 10147338



Ostatní

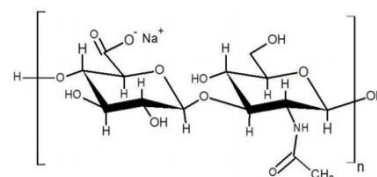
Cholesterol

CAS: 57-88-5
Sigma Aldrich
čistota: $\geq 99,0 \%$
č. šarže: BCBK3087V



Hyaluronan

CAS: 9067-32-7
Contipro Biotech s.r.o.
č. šarže: 213-6481
Mr: 16 kDa



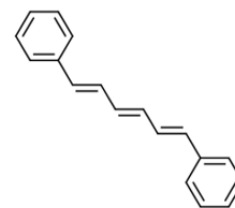
Fluorescenční sondy **1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)**

CAS: 1720-32-7

Fluka

čistota: $\geq 98,0 \%$

č. šarže: 1054132



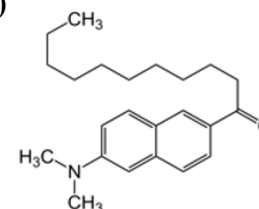
6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaftalen (Laurdan)

CAS: 74515-25-6

Sigma Aldrich

čistota: $\geq 97,0 \%$

č. šarže: BCBP1244V



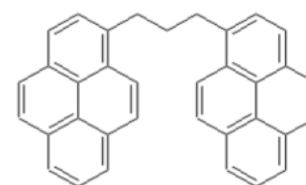
1,3-bis (1-pyrenyl) propan (P3P)

CAS: 61549-24-4

Molecular probes

čistota: $\geq 97,0 \%$

č. šarže: 45B1-2



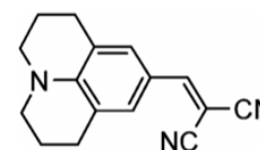
Dikyanovinyljulolidin (DCVJ)

CAS: 58293-56-4

Fluka

čistota: $\geq 97,0 \%$

č. šarže: 405729/1



Rozpouštědla **Chloroform**

CAS: 602-006-00-4

Penta s.r.o.

čistota: $\geq 99,8 \%$

č. šarže: 2107210716

CHCl_3

Aceton

CAS: 67-64-1

Lach-Ner s.r.o.

č. šarže: 606-001-00-8

CH_3COCH_3

Deionizovaná voda

Milipore, Purelab: ELGA

H_2O

4.2 Přístroje

<i>Fluorescenční spektrofotometr FS5</i>	EDINBURGH INSTRUMENTS
<i>Zetasizer nano ZS</i>	Malvern Instruments
<i>Analytické váhy</i>	Denver Instrument, Mdl BC 100
<i>Mikropipety</i>	Finnpipette, Eppendorf Research
<i>Vibrační míchadlo</i>	IKA MS2 Minishaker
<i>Centrifuga</i>	Rotofix 32
<i>Vortex</i>	MS2 Minishaker
<i>Ultrazvukový Sonifikátor</i>	HD 3 200 Bandelin Electronic GmbH & Co. KG

4.3 Shrnutí cílů práce a volba pozorovaného systému

Podle zadání byly vyhledány techniky ke studiu viskozity v oblasti vezikulární dvojvrstvy, membrány. Měření bylo provedeno v teplotním režimu od 15 °C do 65 °C. Pro metodu fluorescenční anizotropie byly použity sondy DPH jako sonda odhalující změny uvnitř membrány vezikuly (hydrofóbní části) a dále sondy Laurdan, která je schopná odrážet změny na povrchu vezikuly. Další možnou metodou pro studium mikroviskozity ve dvojvrstvě vezikuly bylo využití sondy tvořící intramolekulární excimery, v tomto případě byl vybrán bispyrenylpropan (P3P) a pro techniku molekulárních rotorů sonda dikyanovinyljulolionu (DCVJ).

Na základě daného tématu byl zkoumaný vezikulární systém tvořen tenzidy CTAB a SDS vytvářející iontový amfifilní pár. Dále pro stabilizaci vezikulárního systému byl přidán dvouřetězcový tenzid DODAC, přesněji vždy v poměru 9:1, a na základě literatury byly zvoleny tři koncentrace cholesterolu a to 23; 43 a 53 mol. %. Pro takto připravené vezikuly bylo provedeno vizuální pozorování a následně porovnána stabilita vzniklého vezikulárního systému. Velikost vezikulárního systému byla měřena metodou DLS a metodou ELS byl naměřen zeta potenciál, jako ukazatel stability. Nad rámec práce byl vytvořen experiment, kdy byla zkoumána mikroviskozita vezikulární dvojvrstvy s přidavkem biopolymeru hyaluronanu, jakožto polymeru s potenciálem snížit cytotoxické vlastnosti celkového systému.

4.3.1 Příprava vezikulárního systému

Pro přípravu vezikulárního systému tvořeného iontovými amfifilními páry (IPA) byl nejprve vytvořen *zásobní prášek IPA*, ze kterého bylo následně odváženo potřebné množství pro přípravu zásobního vezikulárního systému s požadovaným množstvím cholesterolu. Zásobní prášek byl vytvořen navážením příslušného množství tenzidu CTAB, tak aby výsledná koncentrace roztoku tenzidu byla 20 mM. Navážené množství bylo zalito 1 l deionizované vody. Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok SDS, kdy výsledná koncentrace byla také 20 mM. V dalším kroku byly smíchány zásobní roztoky CTAB a SDS v ekvimolárním poměru, tedy v poměru 1:1, a roztok byl míchán po dobu 24 hodin při 30 °C, aby došlo k úplné precipitaci. Následně byl 10 minut centrifugován při 3500 otáčkách za minutu. Supernatant byl společně se sedimentem filtrován za sníženého tlaku tak, aby byla získána sraženina, která byla následně promyta na filtru, kvůli odstranění protiiontů. Poté byl výtěžek filtrace sušen při teplotě 50 °C.

Pro přípravu vezikul bylo rozpuštěno v chloroformu potřebné množství zásobního prášku IPA, tak aby výsledná koncentrace byla 2 mM. Dále byl připraven roztok DODAC v chloroformu o téže koncentraci. Tyto roztoky byly smíchány v poměru 9:1 a bylo jím zalito předem navážené množství cholesterolu, podle toho, jaká koncentrace cholesterolu byla připravována (23 mol. %; 43 mol. % nebo 63 mol. %). K takto připravenému roztoku byly přidány skleněné kuličky a roztok byl vortexován. Poté došlo k odpaření chloroformové fáze. Po odpaření byl vzniklý film na skleněných kuličkách rehydratován zvoleným objemem deionizované vody (60 ml). Pak proběhla sonifikace ultrazvukovým tyčovým dispergátorem s použitou amplitudou 50 %, tak aby byla vzorku udělena energie 25 kJ, kdy po sonifikaci vznikl čirý/opalescentní vzorek. Pomocí metody DLS byla ověřena správnost přípravy, kdy se vezikuly vzniklé tímto postupem vyznačují velikostí okolo 90 nm. Takovýto vzorek bylo

možné využít pro další experimenty (měření velikosti, zeta potenciálu, pozorování, fluorescenční značení) po naředění na koncentraci 1 mM.



Obrázek 25: Zobrazení vzorku před (vlevo) a po sonifikaci (vpravo), kdy dochází ke vzniku kataniontových vezikul.

4.3.2 Příprava značených vezikul

Pro přípravu zásobního roztoku byly fluorescenční sondy (DPH; Laurdan, DCVJ, P3P) rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle (acetonu), tak aby výsledná koncentrace v zásobním roztoku byla $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z tohoto zásobního roztoku bylo pipetováno požadované množství, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, poté bylo rozpouštědlo odpařeno a byly přidány připravené vezikuly o dané koncentraci. Sonda byla solubilizována do druhého dne a vzorek byl připraven pro měření anizotropie v případě sondy DPH, Laurdanu, a pro měření fluorescence byly použity vzorky obsahující fluorescenční sondy DCVJ a P3P.

4.3.3 Příprava systému vezikul s přidavkem hyaluronanu

Pro studium interakce vezikul s biopolymerem byl na základě rešerše zvolen hyaluronan. Pro experimenty byl vybrán hyaluronan o molekulové hmotnosti 16 kDa. Byla připravena koncentrační řada hyaluronanu o zvolených koncentracích 0,005 g/l; 0,02 g/l; 0,035 g/l; 0,05 g/l; 0,065 g/l a 0,08 g/l a výsledná koncentrace vezikul byla vždy 1 mM. Takto připravené vzorky byly míchány rychlostí 230 otáček za minutu při konstantní teplotě a následovalo vizuální pozorování a měření velikosti a zeta potenciálu. K měření mikroviskozity bylo zapotřebí použít značené vezikuly fluorescenční sondou.

4.3.4 Charakterizace vezikulárních systémů

Při řešení diplomové práce se pro charakterizaci a potvrzení vzniku chtěného vezikulárního systému využívalo měření distribuce velikosti částic a zeta potenciálu na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), který má jako zdroj záření HeNe laser s vlnovou délkou 633 nm.

Distribuci velikosti částic jsme byly schopni určit pomocí dynamického rozptylu světla. Měření probíhalo ve skleněných kyvetách při 25 °C následně při 37 °C a 50 °C, doba kalibrace byla nastavena na 30 vteřin. Poloha v kyvetě, při které laser snímal rozptyl částic ve vzorku, byla nastavena na fixní hodnotu 1,00. Každý vzorek byl proměřen nejméně třikrát a z těchto měření byl proveden průměr. Výsledkem byla naměřená závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic. Střední hodnota velikosti částic byla používána pro vyhodnocování. Tato hodnota byla získána z inflexního bodu korelační křivky. Pro vyhodnocení jsme si mohli dovolit používat střední velikost částic, pouze u vzorků s polydisperzním indexem (PDI) pod hodnotou 0,5.

Zeta potenciál byl určen pomocí metody elektroforetického rozptylu světla, vypočten Smoluchowského modelem pro vodné prostředí. Měření probíhalo při 25 °C pomocí dip cell elektrody, přičemž doba temperace byla 10 vteřin. Zeta potenciál pro každý vzorek byl získán průměrem ze tří měření.

4.3.5 Měření mikroviskozity

Pro měření mikroviskozity připravených vzorků kataniontových vezikul bylo využito měření anizotropie fluorescence s využitím fluorescenčních sond laurdanu a difenylhexatrienu (DPH). Dalším zvoleným přístupem odhalujícím chování mikroviskozity je využití molekulárních rotorů a fluorescenční sondy DCVJ. Poslední využitou sondou je bispyrenylpropan (P3P) tvořící intramolekulární excimer.

Pro měření **anizotropie fluorescence** byl využit fluorimetr FS5 – EDINBURGH INSTRUMENTS. Při měření emisních spekter anizotropie byl nastaven excitační a emisní monochromátor v 90°, šířka štěrbin byla nastavena na 2,5 nm pro vzorky obsahující DPH a 4,0 nm pro vzorky obsahující Laurdan, excitační monochromátor byl pro vzorky obsahující DPH a Laurdan nastaven na vlnovou délku 350 nm. Výsledný sken byl měřen pro DPH v rozsahu od 395 nm do 495 nm s krokem 4 nm. Sken pro Laurdan byl měřen v rozsahu 400 nm do 580 nm, rovněž s krokem 4 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence. Integrační čas byl nastaven na 0,4 s. Emise DPH a laurdanu byla měřena na spektrofluorimetru v rozmezí teplot 15–65 °C s nastavenou přesností $\pm 0,5$ °C díky teplotnímu modulu (Peltier), vzorek byl udržován homogenní díky kontinuálnímu míchání. Všechny teplotní skeny byly provedeny v reverzním režimu, aby bylo zabráněno srážení nestabilních vzorků při nízkých teplotách. Fluidita membrány byla stanovena jako ustálená fluorescenční anizotropie.

Pro měření za využití techniky tvorby **intramolekulárních excimerů** byl využit fluorimetr FS5 – EDINBURGH INSTRUMENTS. Při měření spekter byla nastavena šířka štěrbin na 1,0 nm, pro vzorky obsahující P3P byl nastaven excitační monochromátor na vlnovou délku 300 nm. Měření bylo provedeno bez polarizátorů. Výsledný sken byl měřen v rozsahu od 370 nm do 570 nm s krokem 1 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence. Integrační čas byl nastaven na 0,1 s. Emise byla měřena na spektrofluorimetru v rozmezí teplot 15–65 °C s nastavenou přesností $\pm 0,5$ °C díky teplotnímu modulu (Peltier), vzorek byl udržován homogenní díky kontinuálnímu míchání. Všechny teplotní skeny byly provedeny v reverzním režimu, aby bylo zabráněno srážení nestabilních vzorků při nízkých teplotách. Výsledky byly zaznamenány a jsou diskutovány v části výsledky a diskuze.

Pro měření za využití techniky **molekulárních rotorů** byl využit fluorimetr FS5 – EDINBURGH INSTRUMENTS. Při měření spekter byla nastavena šířka štěrbin na 1,0 nm, pro vzorky obsahující DCVJ byl nastaven excitační monochromátor na vlnovou délku 300 nm. Měření bylo provedeno bez polarizátorů. Výsledný sken byl měřen v rozsahu od 450 nm do 550 nm s krokem 2 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence. Integrační čas byl nastaven na 0,15 s. Emise byla měřena na spektrofluorimetru v rozmezí teplot 15–65 °C s nastavenou přesností $\pm 0,5$ °C díky teplotnímu modulu (Peltier), vzorek byl udržován homogenní díky kontinuálnímu míchání. Všechny teplotní skeny byly provedeny v reverzním režimu, aby bylo zabráněno srážení nestabilních vzorků při nízkých teplotách. Výsledky byly zaznamenány a jsou diskutovány v části výsledky a diskuze.

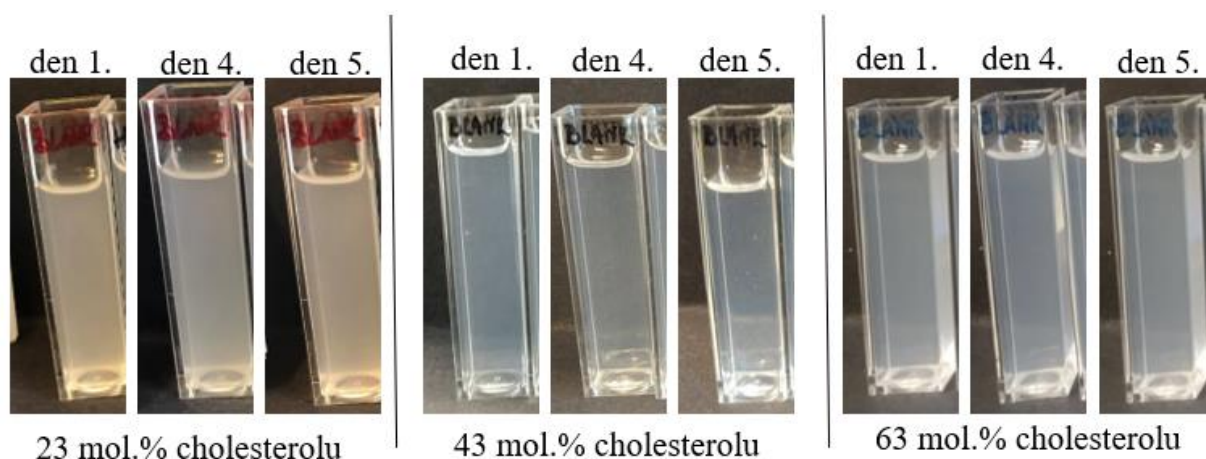
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky jsou rozděleny do jednotlivých podkapitol. První z nich je vizuální pozorování, jelikož nestabilita kataniontových vezikul se projevuje tvorbou okem viditelných částic, sraženiny. Další částí je instrumentální stanovení stability vezikulárního systému, tedy měření zeta potenciálu, stanovení velikosti připravených vezikul a také indexu polydisperzity. Po získání informací o samotných kataniontových vezikulách se pozornost přesouvá k další části tedy samotné charakterizaci mikroviskozity vezikulární dvojvrstvy, a to nejprve metodou fluorescenční anizotropie a poté technikou využívající molekulární rotory, a nakonec tvorbou intramolekulárních excimerů.

5.1 Vizuální pozorování

Ukazatelem stability vzniklého vezikulárního systému je naměřený zeta potenciál nebo měření distribuce velikosti částic. Navíc je nestabilita vezikulárního systému také viditelná na připravených vzorcích, což se projevuje tvorbou sraženin ve vzorku, proto bylo provedeno vizuální pozorování připraveného systému, který byl sledován po dobu 1 týdne. Měření velikosti a zeta potenciálu bylo provedeno pro teploty 25 °C, 37 °C a 50 °C.

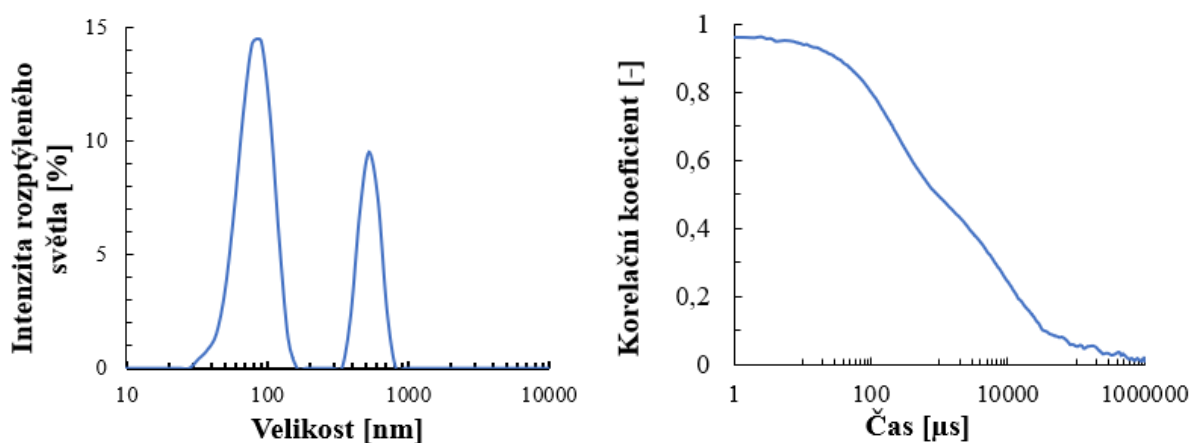
Vizuální pozorování bylo provedeno jako prvotní experiment. Bylo potřeba zajistit, aby připravovaný vezikulární systém byl stabilní, tzn. aby s ním bylo možno pracovat, nesmí být zakalený. Fluorescenční měření je možné provádět pouze u nezakalených vzorků (u zakalených vzorků působí signál z rozptylu rušivě, a dokonce může i převládat nad samotnou emisí fluorescence). Dále například značení fluorescenční sondou vyžaduje časovou stálost, jelikož inkorporace, zavedení sondy do prostředí, bylo prováděno v průběhu 24 hodin. Výsledný vzorek po sonifikaci ultrazvukovou sondou byl opalescentní, jak je vidět na Obrázku 26. Značný zákal byl u vzorků obsahující 23 mol. %, stejně jako u vzorků s 63 mol. % cholesterolu, vzorky obsahující 43 mol. % cholesterolu byly opalescentní. V průběhu pěti dní se v rámci jednoho vzorku vizuální stav neměnil, nevytvářely se zde okem viditelné změny, jako sraženiny nebo viditelnější zákal. Navíc na vzniklou opalescenci nemělo vliv ani teplotní namáhání při měření vzorků.



Obrázek 26: Ukázka vybraných připravovaných vzorků kataniontových vezikul.

5.2 Stabilita připravovaných kataniontových vezikul

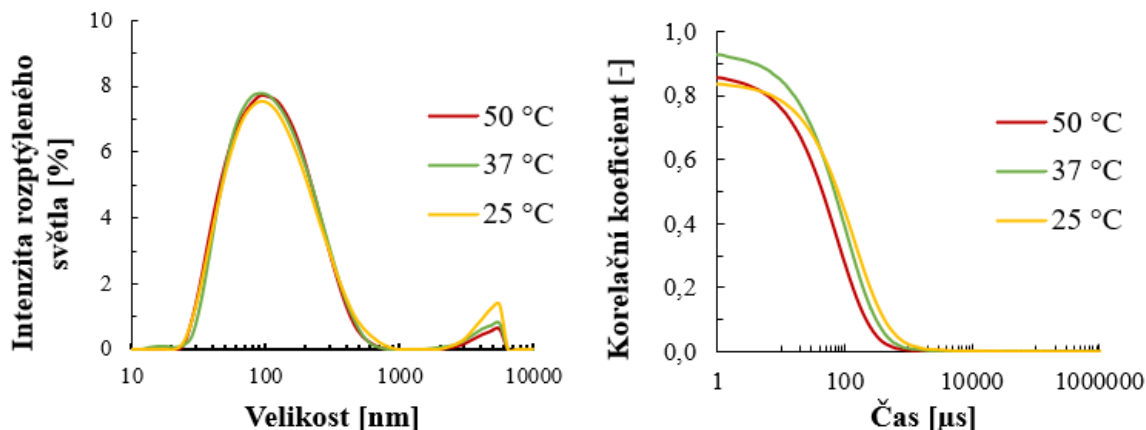
Při měření zeta potenciálu vzorků vezikul obsahujících 23 mol. % cholesterolu byla předpokládaná naměřená hodnota v nestabilní oblasti (−30 mV do 30 mV). Tento připravený systém byl označen jako nestabilní už z vizuálního pozorování. Ovšem naměřené hodnoty zeta potenciálu se zdánlivě vyskytují ve stabilní oblasti. Toto je možné si vysvětlit tak, že připravená vezikula je kataniontová, obsahuje na povrchu kladně nabitě polární hlavy dvouřetězcového tenzidu, naměřený zeta potenciál je tedy navýšen o kladný náboj a naměříme tak hodnoty okolo 35 mV, přestože je systém nestabilní. Tomu nasvědčuje i tvar korelačních křivek, kdy jejich průběh není hladký (Obrázek 27). Vzorky s 23 mol. % cholesterolu vykazovaly vysokou nestabilitu. Tato nestabilita měla za následek vysokou opakující se hodnotu standardní odchylky. Z tohoto důvodu měření nevedlo ke stanovení srovnatelných výsledků distribuce velikosti. Namísto jednoho píku v distribuci odpovídající dané velikosti vezikul se v grafu nachází dva píky, jeden okolo 100 nm, zachycující vezikuly zatím nezagregované a druhý pík u 700 nm vezikuly agregující. Kvůli nestabilitě systému došlo k agregaci, vedoucí k tvorbě polydisperzního systému, na co poukazuje i polydisperzní index, hodnota PDI viz Tabulka 2. Obecně se uvádí jako přijatelná hodnota PDI pro monodisperzní vzorek pod 0,3 [69]. Změna teploty na systém neměla přílišný efekt, systém byl nestabilní už při laboratorní teplotě, zvýšení teploty nemělo významný vliv na naměřené výsledky.



Obrázek 27: Grafické znázornění průměrného výsledku měření DLS pro vzorek kataniontových vezikul s obsahem 23 mol. % cholesterolu při teplotě 25 °C. Napravo je znázorněna korelační křivka, nalevo distribuce velikosti částic.

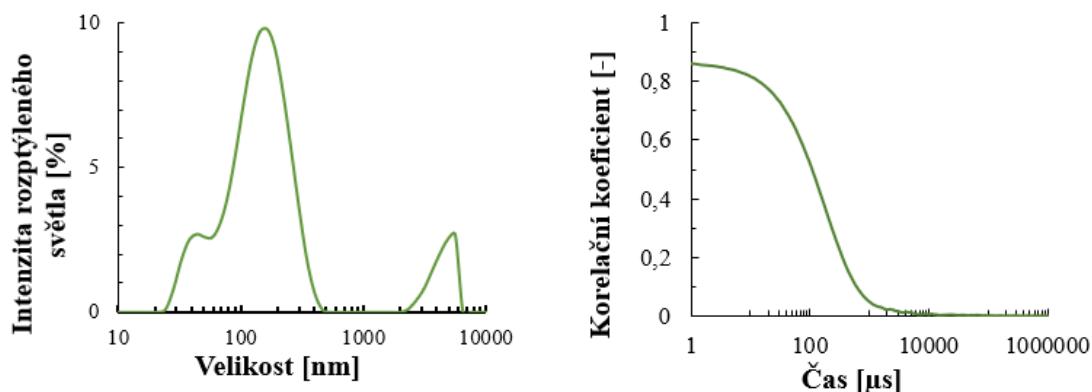
Vezikuly obsahující 43 mol. % cholesterolu se již jevily podle vizuálního pozorování jako stabilní systém. Tyto výsledky podporují i experimenty zaznamenané v rešeršní části, kdy byly právě kataniontové vezikuly obsahující 43 mol. % cholesterolu stanoveny jako krátkodobě i dlouhodobě stabilní. Zeta potenciál těchto vezikul byl posunutý dál do stabilní oblasti, než tomu bylo u vzorků s nižším obsahem cholesterolu, přestože zmíněný kladný náboj byl zde obsažen ve stejné míře. Hodnota zeta potenciálu je kladná z důvodu přítomnosti kladného náboje, její hodnota je vyšší ve srovnání se vzorky obsahující 23 mol. % cholesterolu, což je dáno zvýšenou stabilitou systému. Zeta potenciál měřený při 25 °C byl stanoven na 42 ± 1 mV. S růstem teploty se tato hodnota v rámci chyby měření nemění, z toho vyplývá, že vytvořený systém s takovýmto množstvím cholesterolu je v daném rozmezí teplot stabilní, zeta potenciál

neklesá do nestabilní oblasti. Velikost byla stanovena při 25 °C na 98 ± 4 nm, což je velikost korespondující s velikostí kataniontových vezikul nalezených v člancích (105 ± 8 nm [68]). Stejně jako zeta potenciál i distribuce velikosti je v rámci chyby neměnná. Polydisperzita byla stanovena na hodnotu blízké 0,3 jedná se tedy o monodisperzní vzorek, jak je vidět i na tvaru distribučních křivek.



Obrázek 28: Grafické znázornění měření distribuce velikosti pro vezikuly obsahující 43 mol. % cholesterolu. Distribuce velikosti pro různé teploty je znázorněna vlevo, korelační křivky odpovídající měřeným teplotám vpravo.

Posledním studovaným systémem jsou vezikuly obsahující 63 mol. % cholesterolu. Dle vizuálního pozorování byl tento systém zakalený obdobně jako u 23 mol. %, naměřené hodnoty zeta potenciálu se posunuly do kladné oblasti, to poukazuje na přidavek kladně nabitého tenzidu DODAC. Hodnoty PDI mají vzorky obsahující 63 mol. % cholesterolu vyšší než 0,3 pro daný teplotní rozsah. Výsledky všech měření jsou shrnuty v Tabulce 2. Tyto vzorky se jevily jako zakalené bez ohledu na působení teploty. To poukazuje na fakt, že cholesterol je stabilizační látka pouze v určitých množstvích. S jeho vyšší molární koncentrací podle naměřených výsledků klesá stabilita systému. Zvýšená hladina cholesterolu v membránách může mít za následek její narušení a může membránu poškodit [70]. Oproti vezikulám s 43 mol. % cholesterolu vzrostla velikost na cca 135 ± 1 nm při 25 °C. Tato změna odpovídá tomu, že k vezikulám bylo přidáno více cholesterolu, a to takové množství, které je ještě schopné se dostat do prostředí vnitřní membrány vezikuly. Cholesterol způsobí, že se od sebe polární hlavy více vzdalují, a to má vliv na uspořádání vezikuly. Takováto vezikula se při jejím vzniku není schopna zabalit do tak malého prostoru, a proto došlo k nárůstu její velikosti.



Obrázek 29: Grafické znázornění průměrného výsledku měření DLS pro vzorek kataniontových vezikul s obsahem 63 mol. % cholesterolu při teplotě 25 °C. Napravo je znázorněna korelační křivka, nalevo distribuce velikosti částic.

Podle měřeného zeta potenciálu a velikosti vykazovaly nejvyšší stabilitu vezikuly obsahující 43 mol. % cholesterolu, stejně tak tomu bylo i u vizuálního pozorování. Tyto vezikuly vytvářely opalescentní roztoky a byly vhodné pro měření anizotropie fluorescence. Vezikuly s takovýmto obsahem cholesterolu se jeví jako vhodné i pro případné další experimenty v kombinaci s biopolymery. Vezikuly s nižším (23 mol. %) nebo naopak s vyšším (63 mol. %) obsahem cholesterolu vytvářely spíše zakalené roztoky, čemuž nasvědčují i výsledky zeta potenciálu a velikosti, kdy u 23 mol. % nebyla velikost měřitelná.

Pro všechny připravované vezikuly s obsahem cholesterolu 23; 43 a 63 mol %, nedošlo vlivem teploty ke změně jejich velikosti nebo hodnoty PDI. Výsledky jsou shrnuty v následující Tabulce 2.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty zeta potenciálu metodou ELS a velikosti a polydisperzního indexu metodou DLS.

mol. % cholesterolu	Teplota [°C]	Velikost [nm]	Index polydisperzity (PDI)	zeta potenciál [mV]
23	25	-	0,796 ± 0,193	34,4 ± 0,4
	37	-	0,978 ± 0,031	35,3 ± 1,9
	50	-	0,720 ± 0,224	36,4 ± 0,2
43	25	98 ± 4	0,364 ± 0,033	42,0 ± 0,9
	37	97 ± 1	0,317 ± 0,049	39,3 ± 1,8
	50	93 ± 1	0,279 ± 0,013	39,2 ± 1,1
63	25	135 ± 1	0,375 ± 0,005	50,1 ± 1,5
	37	121 ± 3	0,398 ± 0,048	51,4 ± 1,3
	50	121 ± 1	0,443 ± 0,014	39,8 ± 1,9

5.3 Měření mikroviskozity pomocí anizotropie fluorescence

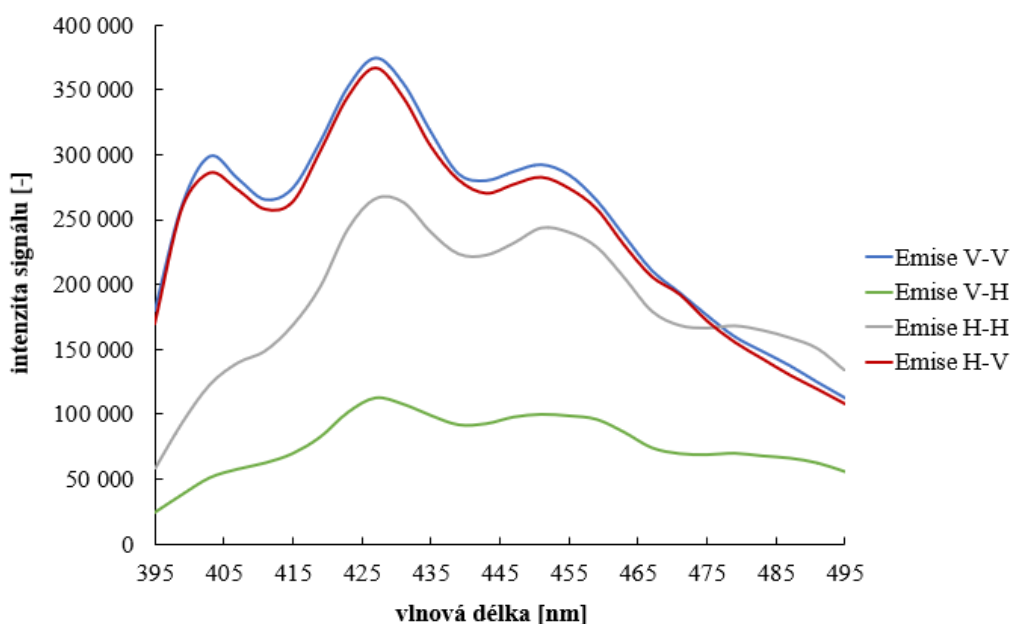
Fluorescenční emisní anizotropie byla stanovena jako rozsah lineární polarizace fluorescenční emise po fotoselekcí z opticky izotropního vzorku. V praktických aplikacích musí být zohledněn G faktor. Do cely přístroje byl vždy vložen měřený vzorek a za pomoci teplotního modulu Peltier byla udržována teplota, homogenita vzorku při změnách teploty byla udržována kontinuálním mícháním. Proměření vzorku probíhalo v reverzním módu, tedy v teplotách od 65 °C do 15 °C a měření bylo prováděno vždy s krokem 5 °C. V každé z těchto teplot byl proveden sken intenzit signálu fluorescence, poté byla anizotropie fluorescence vypočtena podle následující rovnice:

$$r = \frac{G(\lambda_{em}) \cdot I_{VV}(\lambda_{em}) - I_{VH}(\lambda_{em})}{G(\lambda_{em}) \cdot I_{VV}(\lambda_{em}) + 2 \cdot I_{VH}(\lambda_{em})}, \quad (8)$$

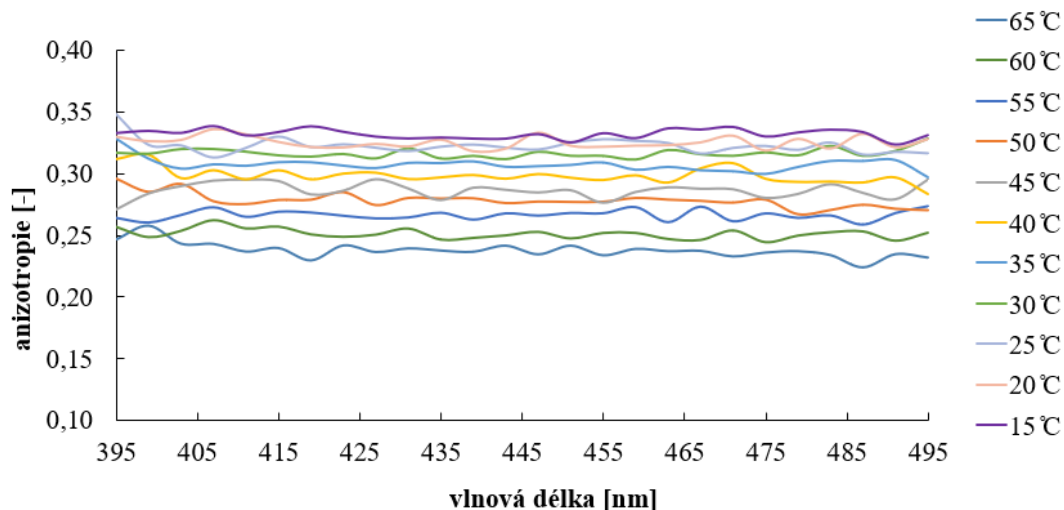
kde G je G-faktor a I_{VV} ; I_{VH} intenzita signálu paralelně a kolmo vzhledem k orientaci paprsku budícího záření.

5.3.1 Studium za pomoci fluorescenční sondy DPH

U této sondy byla sledována změna její hodnoty anizotropie, která je přímo úměrná viskozitě mikroprostředí sondy. Jednoznačnou výhodou je, že se sonda také používá ke studiu účinků přidaného cholesterolu, jelikož se nachází v prostředí lipofilní části membrány, ve stejné oblasti vezikuly jako cholesterol. Díky aditivnímu zákonu anizotropie jsme tedy schopni získat komplexní informace o změnách stavu membrány jako celku. Na následujícím Obrázku 30 je ukázka emisního skenu, takováto data jsou vhodná k dalšímu vyhodnocení. Na tomto měření vzorku nebyl viditelný zákal a vzorek byl pouze opalescentní. Rozptyl by tak na naměřená data neměl mít vliv a data by neměla být nadhodnocena.

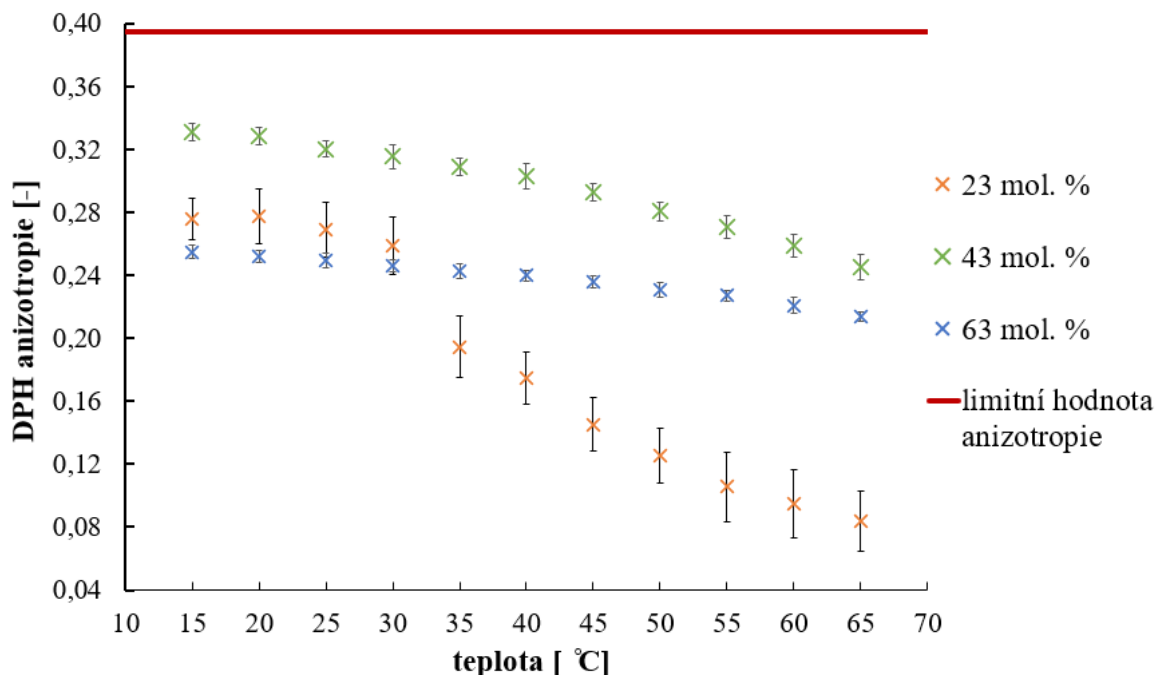


Obrázek 30: Ukázka emisního skenu pro měřený vzorek obsahující kataniontové vezikuly s obsahem cholesterolu 43 mol. % a sondy DPH o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno při 15 °C.



Obrázek 31: Ukázka naměřených hodnot anizotropie pro teploty od 15 °C do 65 °C, pro vzorek obsahující kataniontové vezikuly s 43 mol. % cholesterolu a DPH o koncentraci $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Graf na Obrázku 31 zobrazuje průběh změny hodnot anizotropie v závislosti na vlnové délce. Jednotlivé hodnoty byly vypočteny viz rovnice 7. Jak je v grafu patrné při jakékoli z měřených teplot je průběh křivek monotónní. Hodnoty nepřesahují limitní anizotropii sondy DPH (0,395) [38], což poukazuje na to, že rozptyl nenadhodnocuje naměřená data.



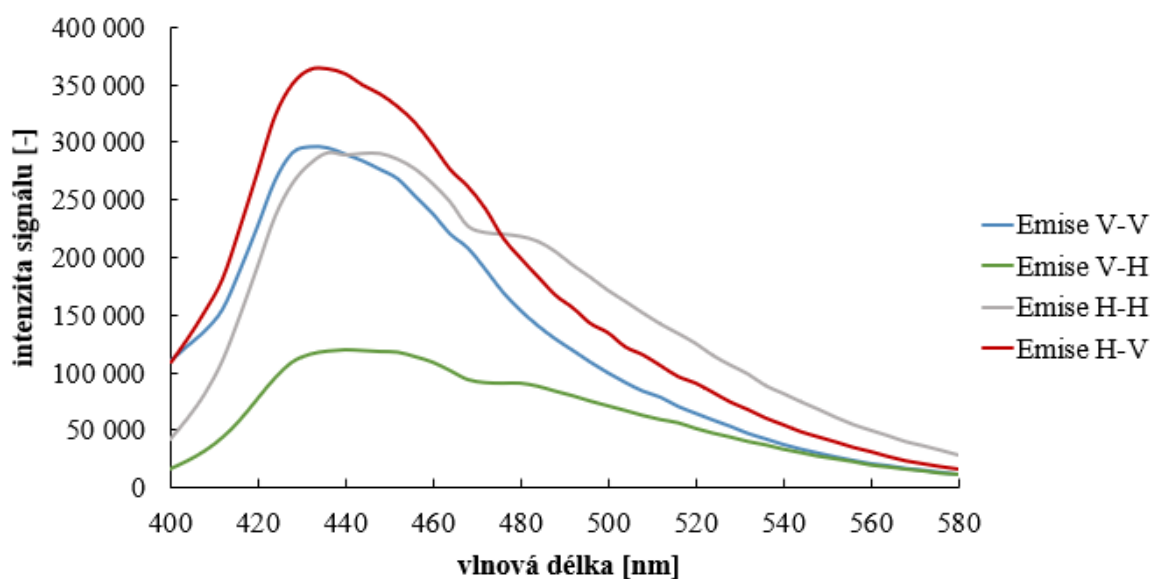
Obrázek 32: Graf závislosti naměřené hodnoty anizotropie na teplotě pro kataniontové vezikuly obsahující 23; 43 a 63 mol. % cholesterolu s použitou sondou DPH o koncentraci $10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$.

U vzorků s 43 mol. % cholesterolu naměřená hodnota anizotropie monotónně klesá s rostoucí teplotou. Rostoucí teplota způsobuje tání membrány, ovlivněním její fluidity se zvyšuje pohyblivost sondy a tím se snižuje naměřená hodnota anizotropie. Jinými slovy fluidita systému je ovlivňována zvyšující se teplotou, což se na naměřené hodnotě anizotropie projevuje

jejím snížením. Je-li zvyšována teplota, zvyšuje se pohyblivost sondy v daném mikroprostředí, ta může svobodněji rotovat, a tedy nedochází k polarizaci v důsledku čehož, klesá hodnota naměřené anizotropie, jak je vidět v grafu na Obrázku 32. Zajímavé je, že zvyšující se procento cholesterolu by mělo tvořit rigidnější membránu vezikuly a byla proto očekávaná naměřená hodnota anizotropie vyšší u vezikul s 63 mol. % cholesterolu, přesto byla naměřená anizotropie u těchto vzorků nižší, oproti vzorkům s 43 mol. % cholesterolu. V případě vzorků obsahující 63 mol. % cholesterolu, je zde cholesterolu už takové množství (molárně je zde více cholesterolu než samotných IPA tvořících vezikuly), že dochází k lipidickým raftům. A v důsledku tohoto jevu může být sonda DPH z prostředí membrány vytlačena. Proto jak vidíme v grafu na Obrázku 32 v daném rozsahu nedochází ke změnám naměřených hodnot. Extrémní množství cholesterolu (jak 23, tak 63 mol. %) nemá na kataniontové vezikuly příznivý dopad. Jak bylo potvrzeno u vzorků obsahující 23 mol. % cholesterolu, kdy se naměřené hodnoty anizotropie pohybují pod hodnotami, které byly naměřeny u 43 mol. % s viditelným propadem. U těchto naměřených dat je navíc patrná i největší směrodatná odchylka. Tyto data budou navíc nejspíše nadhodnocena, jelikož právě u vzorků obsahující 23 mol. % cholesterolu se vyskytoval značný zákal (příčina rozptylu).

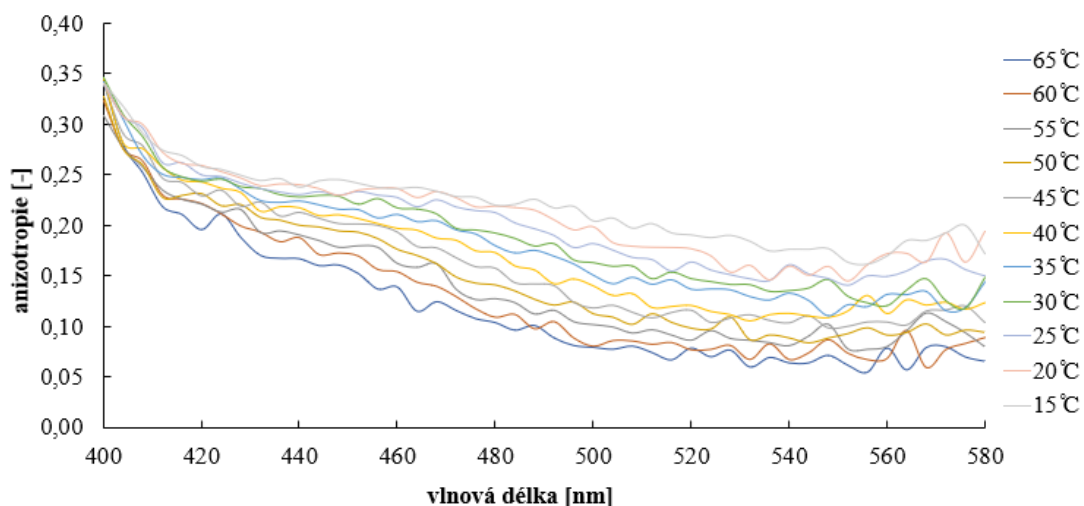
5.3.2 Studium za pomoci fluorescenční sondy Laurdanu

Tato sonda byla vybrána pro studium vnější části membrány. Na následujícím Obrázku 33 je v grafu záznam emisního spektra laurdanu.



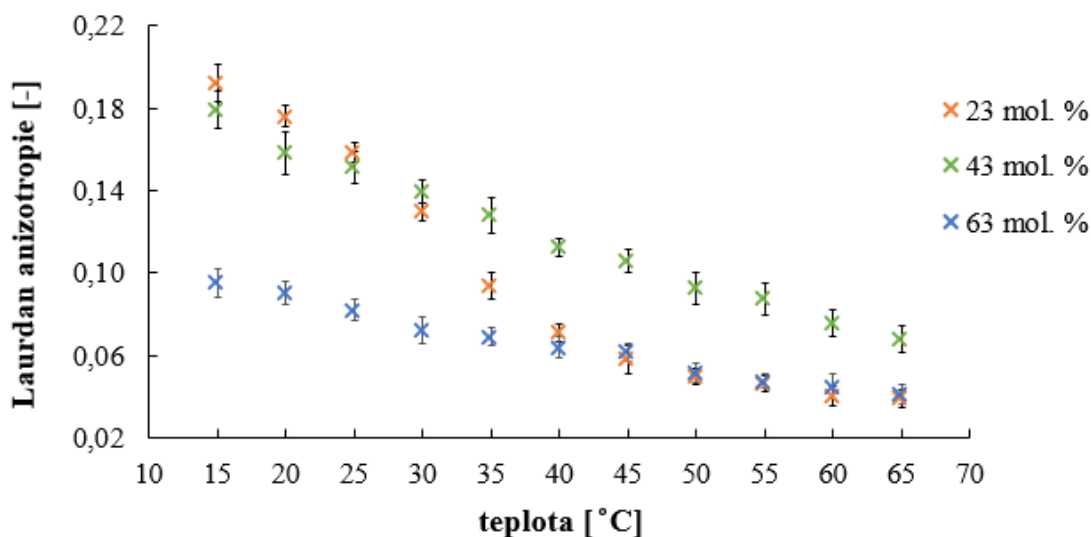
Obrázek 33: Ukázka emisního skenu pro měřený vzorek obsahující kataniontové vezikuly s obsahem cholesterolu 43 mol. % a sondy Laurdanu o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno při 15 °C.

U laurdanu se k vyhodnocení využívají dvě oblasti – modrá pro vlnové délky od 420 do 460 nm, anebo červená oblast od 520 do 550 nm. Důvodem je přítomnost několika různě relaxovaných fluoroforů. Pro vyhodnocení dat anizotropie byla využita červená oblast tedy od 520 do 550 nm, jelikož v tomto rozmezí byla data zatížena menší chybou měření. Naměřené hodnoty jsou nižší z důvodu relaxovaného stavu fluoroforu, toto se děje z důvodu hydratace membrány.



Obrázek 34: Ukázka naměřených hodnot anizotropie pro teplotní rozpětí od 15 °C do 65 °C, pro vzorek obsahující kataniontové vezikuly s 43 mol. % cholesterolu a Laurdan o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Naměřené hodnoty anizotropie Laurdanu vykazují podobnosti se sondou DPH v jejich závislostech na teplotě (Obrázek 35). Přesto jsou naměřené hodnoty poníženy oproti předešlým výsledkům měřené anizotropie pro sondu DPH. Je to dáno tím, že hodnota anizotropie pro sondu Laurdan je vzata ze spektrální oblasti, kdy dochází k relaxaci rozpouštědla, červená oblast. Laurdan má v této spektrální oblasti v bezprostřední blízkosti volně se pohybující molekuly rozpouštědla, což vede k ponížení naměřené hodnoty anizotropie. Se zvyšující se teplotou, pak anizotropie Laurdanu obdobně jako u DPH klesá. U stabilních vezikul s obsahem 43 mol. % je s růstem teploty viditelná klesající tendence. To odráží zvyšování fluidity membrány vezikuly. Extrémní množství cholesterolu (jak 23, tak 63 mol. %) nemá, stejně jako u předešlé sondy, na kataniontové vezikuly příznivý dopad. Jak je vidět u vzorků s 23 mol. % cholesterolu je opět viditelný propad.



Obrázek 35: Graf závislosti naměřené hodnoty anizotropie na teplotě pro kataniontové vezikuly obsahující 23;43 a 63 mol. % cholesterolu s použitou sondou Laurdan o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnoty anizotropie Laurdanu vyhodnoceny pro červenou vlnovou oblast (od 520 do 550 nm).

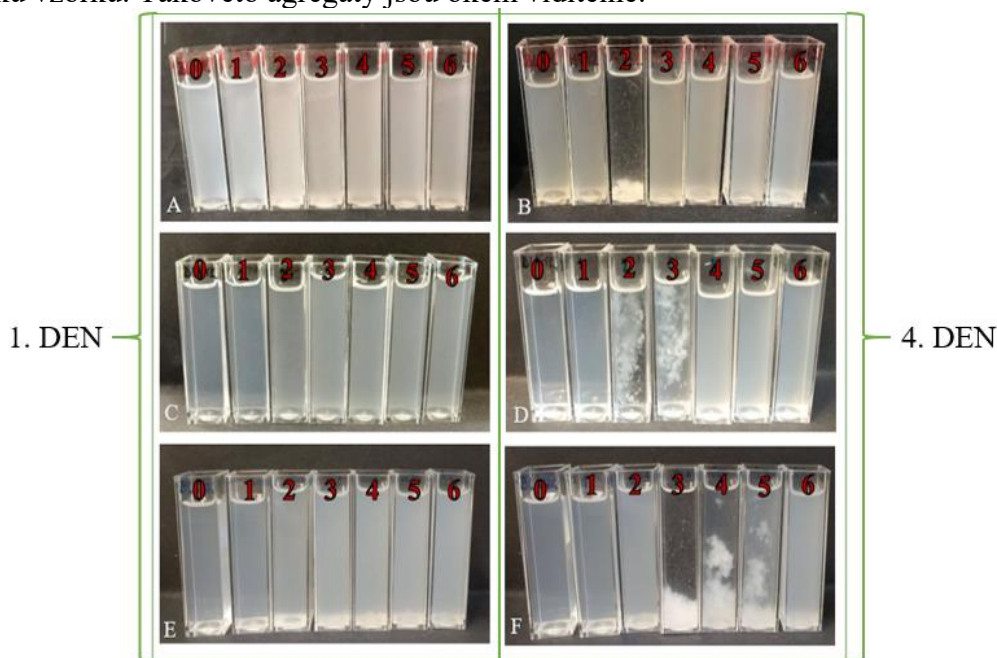
5.4 Interakce s biopolymerem hyaluronanem

Tento experiment byl proveden jako pilotní průzkum toho, jak se bude interakce biopolymeru hyaluronanu projevovat na fluiditě vezikulárního systému za použití techniky anizotropie fluorescence. Nejprve bylo provedeno vizuální pozorování pro zvolenou řadu koncentrací hyaluronanu o molekulové hmotnosti 16 kDa. Experimenty byly časově omezeny, jelikož samotný hyaluronan v roztoku po deseti dnech degraduje. (Jak uvádí ve své studii Simulescu a spol., kdy po desátém dni začíná degradace nejstabilnějšího sledovaného vzorku hyaluronanu [71].)

5.4.1 Vizuální pozorování

Podle vizuálního pozorování interakce nenastala ihned po smíchání kataniontových vezikul s hyaluronanem, ale jak je vidět na Obrázku 32 vizuálně byly změny jasné po 4. dnu. V případě vzorků obsahující vezikuly s 23 mol. % cholesterolu (Obrázek 36 A; B) v interakci s hyaluronanem bylo patrné pouhým okem zakalení a agregace zvláště u vzorků 2; 3 a 4. Opalescentní roztok byl vytvořen u vzorků obsahující vezikuly 43 mol. % cholesterolu s hyaluronanem, kdy došlo opět po čtvrtém dnu k vysrážení u těchto koncentrací. V případě vzorků s nejvyšším obsahem cholesterolu (63 mol. %) došlo k posunu. Vysrážené koncentrace byly vzorky 3; 4 a 5.

Vysrážení určitých koncentrací může být způsobeno vazbou kataniontových vezikul na přidaný hyaluronan. Vazba je umožněna díky kladnému náboji na vezikule a záporně nabitému řetězci hyaluronanu, na základě elektrostatického přitahování. V případě, jestliže došlo k interakci kataniontové vezikuly, pokud se nachází v dostatečné blízkosti od záporně nabitého polymeru, dochází k agregaci. Vzniklé komplexy jsou velikostně větší a začínají sedimentovat v roztoku vzorku. Takoveto agregáty jsou okem viditelné.

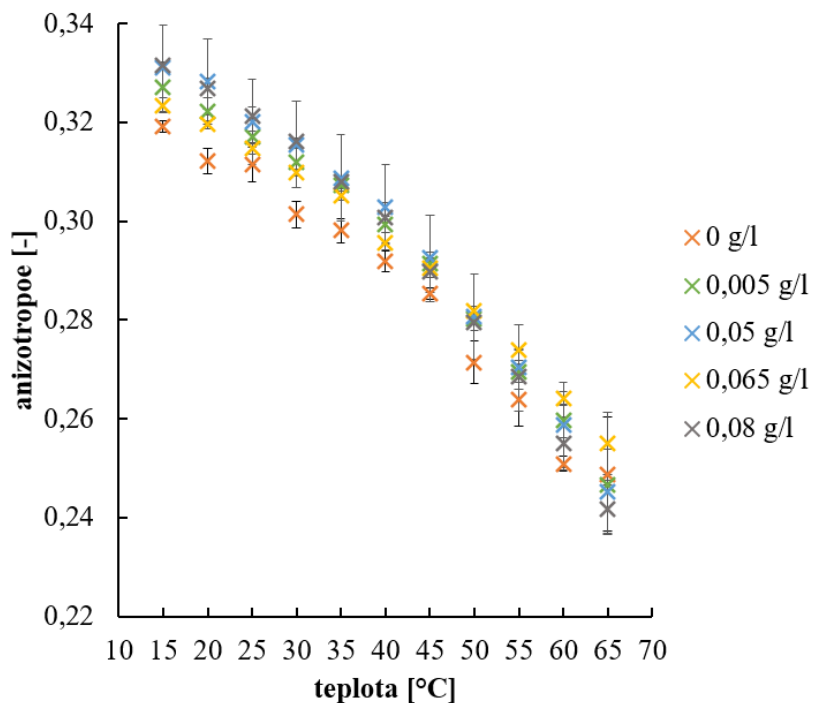


Obrázek 36: Vizuální pozorování interakce hyaluronan/kataniontové vezikuly pro vymezení stabilní oblasti. Koncentrace hyaluronanu 0 g/l; 0,005 g/l; 0,02 g/l; 0,035 g/l; 0,05 g/l; 0,065 g/l a 0,08 g/l (vzorky 0 až 6). Obrázky A, B s vezikulami obsahující 23 mol. % cholesterolu; C a D 43 mol. % cholesterolu a E a F obsahující 63 mol. % cholesterolu.

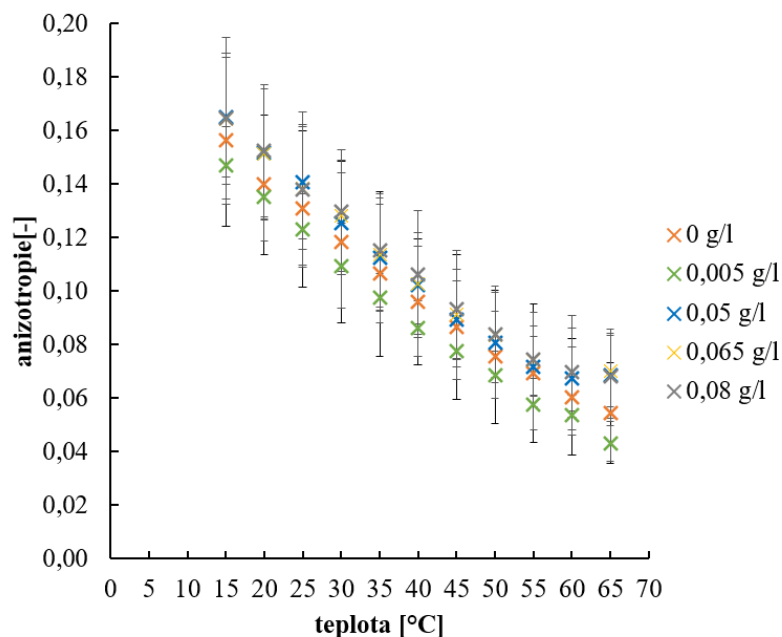
5.4.2 Měření mikroviskozity pomocí anizotropie fluorescence

Vizuálním pozorováním byla vyznačena stabilní oblast pro daný systém vezikula/hyaluronan a byla vymezena oblast pro měření anizotropie fluorescence s využitím fluorescenčních sond. Měření bylo provedeno pouze s vezikuly obsahujícími 43 mol. % cholesterolu, ostatní vzorky obsahující jiné procento cholesterolu se při delší přípravě, kdy bylo potřeba solubilizovat sondu, srážely a nebyly vhodné pro měření anizotropie. Připravené vzorky obsahovaly vždy cholesterol (43 mol. %) a dále hyaluronan o molekulové hmotnosti 16 kDa o koncentraci 0 g/l (vzorek 0), 0,005 g/l (vzorek 1) 0,05 g/l (vzorek 4), 0,065 g/l (vzorek 5) a 0,08 g/l (vzorek 6).

Výsledná data měření anizotropie jsou zobrazena viz Obrázek 37 a Obrázek 38. Pro vyhodnocení naměřených hodnot laurdanu byla využita červená oblast 520–550 nm, kde byla emise fluorescenčního signálu stabilní a bez poklesů, a měření v této oblasti zaznamenává hodnoty s nižší hodnotou anizotropie, to však bylo zatíženo nejmenší chybou. Z naměřených dat nejdou usuzovat rozdíly mezi samotnými připravenými vezikuly (bez přídavku hyaluronanu, vzorek 0) a ostatními vzorky. Možným vysvětlením je tedy to, že samotné navázání vezikul na biopolymer nijak mikroprostředí membrány a jejího blízkého okolí neovlivňuje. Dalším z možných vysvětlení toho, že v naměřených hodnotách nevidíme rozdíly, je fakt, že jsme vybírali pouze vzorky ze stabilní oblasti a je tedy možné, že interakce, která by odrážela změny v mikroprostředí je pouze v oblasti tvorby agregátů (vzorky 2 a 3). Tyto však nejsou vhodné pro měření anizotropie fluorescence z důvodu obsahu rozptylujících částic. Interakce hyaluronanu s kataniontovými vezikulárními systémy za těchto stanovených podmínek se zvolenými sondami buďto neodráží změny v mikroprostředí, nebo k žádným změnám ve fluiditě membrány v přítomnosti hyaluronanu nedochází.



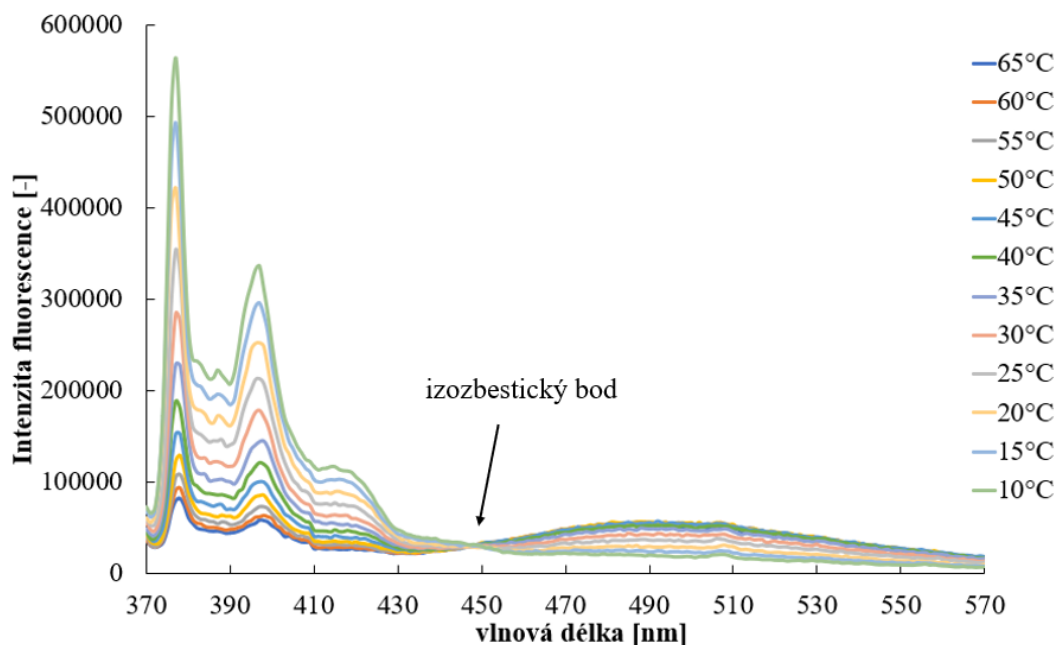
Obrázek 37: Naměřené hodnoty anizotropie pro vybrané vzorky (vezikula/hyaluronan, koncentrace hyaluronanu viz legenda) s fluorescenční sondou DPH o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obrázek 38: Naměřené hodnoty anizotropie pro vybrané vzorky (vezikula/hyaluronan, koncentrace hyaluronanu viz legenda) s fluorescenční sondou Laurdanu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pro červenou oblast.

5.5 Měření mikroviskozity pomocí tvorby intermolekulárních excimerů

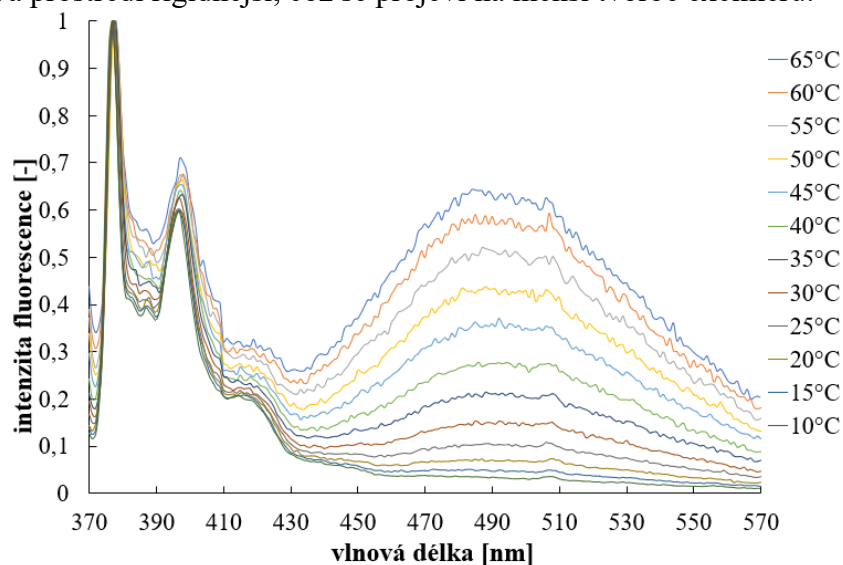
K experimentům byla využita sonda P3P, jako sonda tvořící intermolekulární excimer. Měření bylo provedeno se vzorky kationtových vezikul obsahujících 43 mol. % cholesterolu, jakožto vzorků s nejvyšší stabilitou. Naměřené spektrum je na následujícím Obrázku 39.



Obrázek 39: Fluorescenční spektrum sondy P3P o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí kationtových vezikul obsahující 43 mol. % cholesterolu. Měřeno pro teplotní rozpětí od 10 do 65° C.

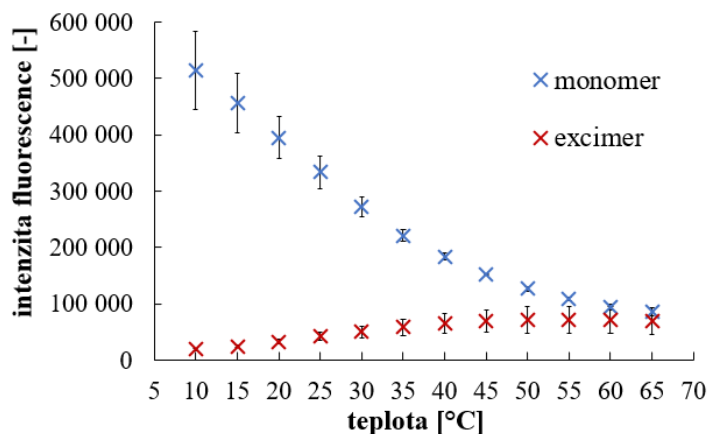
Ve spektru na Obrázku 39 jde jasně vidět izozbestický bod, kde se protínají jednotlivá spektra. Tento bod rozděluje oblast od 370 do 450 nm, kde se nachází sonda ve svém monomeru, od oblasti od 450 do 570 nm kdy dochází k tvorbě excimeru. Tvorba excimeru je ztrátová, jak je vidět na poklesu intenzity signálu v grafu na Obrázku 39.

Na následujícím grafu (Obrázek 40) je normalizované fluorescenční spektrum. Jak je z grafu patrné největší zastoupení excimeru je při 65 °C, sonda má při této teplotě největší volnost pohybu, tudíž se vyskytuje v nejvíce fluidním prostředí. S klesající teplotou se, jak se dalo očekávat, stává prostředí rigidnější, což se projeví na menší tvorbě excimeru.



Obrázek 40: Normalizované fluorescenční spektrum sondy P3P o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí kataniontových vezikul obsahující 43 mol. % cholesterolu. Měřeno pro teplotní rozpětí od 10 do 65 °C.

Intenzita excimeru na následujícím Obrázku 41 je zobrazena červeně a roste se zvyšující se teplotou. Hodnoty při vyšších teplotách se přibližují intenzitám monomeru. Intenzita excimeru by měla být několikanásobně vyšší, dominantnější, oproti intenzitě monomeru, ale dosahuje relativně nízkých hodnot. Tato sonda je proto zřejmě vhodnější pro fluidnější systémy, než je náš zvolený (kataniontové vezikuly tvořené CTA – DS). Za předpokladu fluidnějšího složení, menšího obsahu cholesterolu, však není studovaný systém stabilní. Další nevýhoda této fluorescenční sondy spočívá v dostupnosti, jelikož v současnosti není komerčně dostupná.

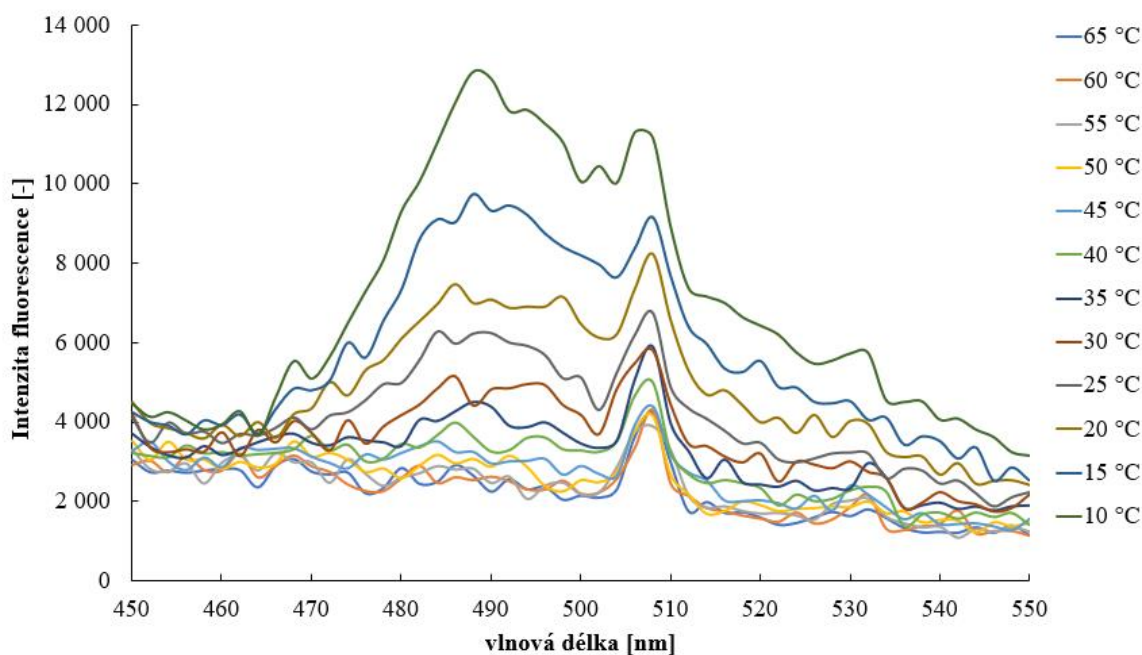


Obrázek 41: Graf závislosti intenzity fluorescece na teplotě, zobrazující intenzitu signálu monomeru a excimeru pro každou z teplot.

5.6 Měření mikroviskozity pomocí molekulárních rotorů

Poslední technikou, která měla odrážet mikrovizkozitní změny je využití sondy DCVJ a molekulárních rotorů. Jak je ale z následujícího grafu (Obrázek 42) vidět, nastává zde hned několik problémů. Jasně viditelný je pík u 505–510 nm. Tento pík je způsobený rozptylem. Přesto, že toto měření bylo prováděno na nejstabilnějším vzorku obsahující kataniontové vezikuly s obsahem cholesterolu 43 mol. % a tento vzorek se jevil jako opalescentní, při intenzitě měřeného signálu je zde rozptylový pík patrný, což omezuje použitelnost dat této části spektra. Dalším problémem je samotná intenzita signálu, která je v blízkosti meze detekce přístroje, tedy spadá skoro do šumu.

Problém byl totiž s nastavením samotného experimentu, kdy se kvůli zákalu vzorku nedala použít excitační vlnová délka, která by ležela v maximu absorpce. Výsledný měřený signál i přesto, že vzorek obsahoval dostatečné množství použité sondy molekulárního rotoru nebyl dobrý. Jednou z příčin může být to, že dané prostředí není dostatečně viskózní. Jak je vidět v grafu na Obrázku 42 ani při 10 °C, kdy je prostředí nejrigidnější není signál značný. To je zřejmě způsobeno tím, že se sonda kvůli cholesterolu, kterou membrána obsahuje, nedokáže dostat do oblasti membrány. Proto v rotaci molekulárního rotoru nic nebrání a měřený signál je v oblasti blízké šumu. Tento problém by mělo vyřešit měření časově rozlišené fluorescence, která v čase prováděné práce nebyla k dispozici. K samotnému hodnocení dat tak zůstává pouze úzký použitelný pás v oblasti od 476 do 500 nm.



Obrázek 42: Fluorescenční spektrum měřené sondy DCVJ o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí kataniontových vezikul obsahující 43 mol. % cholesterolu. Měřeno pro teplotní rozpětí od 10 do 65 °C.

6 ZÁVĚR

V rešeršní části diplomové práce byly podle zadání vybrány techniky pro charakterizaci stanovení viskozity membrány vezikulárního systému. Zkoumaným objektem byly kataniontové vezikuly tvořené iontovými páry CTA-DS, kdy bylo na základě rešerše určeno množství cholesterolu na 23, 43 a 63 mol. %. Další stabilizační látkou byl dvouřetězcový tenzid DODAC. Pro takto připravené vezikuly bylo provedeno vizuální pozorování a následně byla stanovena stabilita vzniklého vezikulárního systému. Byla měřena velikost metodou DLS a metodou ELS byl naměřen zeta potenciál, jako ukazatel stability. Měření mikroviskozity probíhalo v teplotním režimu od 15 °C do 65 °C. Pro hodnocení viskozity byly vybrány tři metody, technika měření anizotropie fluorescence, u které byly použity dvě fluorescenční sondy. První sondou byl difenylhexatrien, (DPH), jako sonda odrážející změny uvnitř membrány vezikuly a druhou použitou sondou byl laurdan, který je schopen odrážet změny na povrchu vezikuly. Další zvolenou metodou pro studium viskozity ve dvojrvtvě vezikuly bylo využití sondy tvořící intramolekulární excimery. V tomto případě byl vybrán bispyrenylpropan (P3P) a pro techniku molekulárních rotorů sonda dikyanovinyljulolionu (DCVJ). Nad rámec práce byl vytvořen experiment, kdy byla zkoumána mikroviskozita vezikulární dvojrvtvy s přídavkem biopolymeru hyaluronanu, jakožto polymeru s potenciálem snížit cytotoxické vlastnosti celkového systému.

Výsledný vzorek kataniontových vezikul po sonifikaci ultrazvukovou sondou byl opalescentní. Značný zákal byl u vzorků obsahující 23 mol. %, stejně jako u vzorků s 63 mol. % cholesterolu, což ovlivnilo měření fluorescenční anizotropie. Vzorky obsahující 43 mol. % cholesterolu byly opalescentní. V průběhu pěti dní se vizuální stav neměnil, nevytvářely se zde okem viditelné změny, jako sraženiny nebo viditelnější zákal. Navíc na vzniklou opalescenci nemělo vliv ani teplotní namáhání při měření vzorků. Jako nejvíce stabilní se, už dle vizuálního pozorování, jevíly vzorky obsahující 43 mol. % cholesterolu. Toto potvrzuje i instrumentální posouzení stability, kdy velikost připravených vezikul byla stanovena při 25 °C na 98 ± 4 nm, což je velikost korespondující s velikostí kataniontových vezikul nalezených v člancích (105 ± 8 nm [68]). Zeta potenciál měřený při 25 °C byl stanoven na 42 ± 1 mV. S růstem teploty se tato hodnota v rámci chyby měření nemění, z toho vyplývá, že vytvořený systém s takovýmto množstvím cholesterolu je v daném rozmezí teplot stabilní, zeta potenciál neklesl do nestabilní oblasti. Vezikuly s nižším (23 mol. %) nebo naopak s vyšším (63 mol. %) obsahem cholesterolu vytvářely spíše zakalené roztoky, čemuž nasvědčují i výsledky zeta potenciálu a velikosti, kdy u 63 mol. % byla velikost stanovena na 135 ± 1 nm při 25 °C, a pro obsah 23 mol. % nebyla velikost měřitelná.

Naměřené hodnoty anizotropie laurdanu vykazují podobnosti se sondou DPH v jejich závislostech na teplotě. Přesto jsou naměřené hodnoty sondy laurdanu poníženy oproti výsledkům měřené anizotropie pro sondu DPH. Toto je způsobeno tím, že hodnota anizotropie pro sondu laurdan je vzata ze spektrální oblasti, kdy dochází k relaxaci rozpouštědla, červené oblasti. Laurdan má v této spektrální oblasti v bezprostřední blízkosti volně se pohybující molekuly rozpouštědla, což vede k ponížení naměřené hodnoty anizotropie. Se zvyšující se teplotou, pak anizotropie laurdanu obdobně jako u DPH klesá. Tato metoda, ať už při použití sondy DPH nebo laurdanu, je vhodná pro zvolený systém a u stabilních vzorků (kataniontové

vezikuly s obsahem cholesterolu 43 mol. %) odráží změny, které se dějí s membránou vlivem teploty.

Pro zbylé dvě metody byly použity pouze kataniontové vezikuly obsahující 43 mol. % cholesterolu, jelikož tyto vzorky byly opalescentní, nebyly zakalené, a také byly z připravovaných vzorků nejstabilnější. Pro fluorescenční sondu byla měřena spektra pro jednotlivé vzorky se změnou teploty, postupně od 10 do 65 °C. Z hlediska zhodnocení použitelnosti sondy P3P pro zvolený systém je jeho aplikace omezená, to zejména z důvodu jeho komerční dostupnosti. Dále nízký výtěžek signálu u vzniklého excimeru nasvědčuje tomu, že samotné prostředí vůči velké molekule P3P i při vysoké teplotě není dostatečně fluidní. Podle dosažených výsledků je sonda P3P vhodná pro více fluidní prostředí, což je problém pro zadaný systém, který by byl za takovýchto podmínek nestabilní.

Poslední použitou metodou je využití molekulárních rotorů za použití fluorescenční sondy DCVJ. Tato technika byla zhodnocena jako nevhodná pro zvolený systém kataniontových vezikul tvořené iontovým amfifilním párem s obsahem cholesterolu. Tato sonda zřejmě špatně reaguje na přítomnost cholesterolu v membráně, a z toho důvodu má malou intenzitu fluorescence. Navíc byla kvůli přítomnému rozptylu k hodnocení naměřených dat využitelná pouze malá část spektra.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008. ISBN 80-708-0422-X.
- [2] FARN, Richard J. *Chemistry and technology of surfactants*. 1. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2006. ISBN 978-14051-2696-0.
- [3] EVANS a D. Fennell a Håkan WENNERSTRÖM. *The colloidal domain: Where physics, chemistry, biology, and technology meet*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999. ISBN 978-0-471-24247-5.
- [4] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chem. Listy* 93, 1999, s. 421-427.
- [5] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [6] LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259), 680-685. DOI: 10.1038/227680a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/227680a0>.
- [7] CLARKE, J. D. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009, 2009(3), pdb.prot5177-pdb.prot5177. DOI: 10.1101/pdb.prot5177. ISSN 1559-6095. Dostupné také z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5177>.
- [8] MARRAKCHI, S. a H.I. MAIBACH. Sodium Lauryl Sulfate-Induced Irritation in the Human Face: Regional and Age-Related Differences. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006, 19(3), 177-180. DOI: 10.1159/000093112. ISSN 1660-5527. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/93112>.
- [9] Figure 3. Surface tension and surfactant concentration. Science and Education Publishing From Scientific Research to Knowledge [online]. [cit. 2020-09-16]. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/wjce/4/2/2/figure/3>.
- [10] TAH, Bidisha, Prabir PAL, Mrityunjoy MAHATO a G. B. TALAPATRA. Aggregation Behavior of SDS/CTAB Catanionic Surfactant Mixture in Aqueous Solution and at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011, 115(26), 8493-8499. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp202578s.
- [11] TROUTIER, Anne-Lise, Laurent VÉRON, Thierry DELAIR, Christian PICHOT a Catherine LADAVIÈRE. New Insights into Self-Organization of a Model Lipid Mixture and Quantification of Its Adsorption on Spherical Polymer Particles †. *Langmuir*. 2005, 21(22), 9901-9910. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la050796l.
- [12] RAY, Krishanu. From fission to fusion: A perspective on the research that won the Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2013. *Journal of Biosciences*. 2014, 39(1), 3-11. DOI: 10.1007/s12038-014-9416-1. ISSN 0250-5991. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-014-9416-1>
- [13] MARQUES, E.F, O REGEV, A KHAN a B LINDMAN. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2003, 100-102, 83-104. DOI:

- 10.1016/S0001-8686(02)00068-4. ISSN 00018686. Dostupné také
z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868602000684>.
- [14] *Drugs*. 1993, 45(1). ISSN 0012-6667. Dostupné také
z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-199345010-00003>.
- [15] KALER, Eric W., A. Kamalakara MURTHY, Beatriz E. RODRIGUEZ a Joseph A. N. ZASADZINSKI. Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed
- [16] TONDRE, Christian a Céline CAILLET. Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from a literature analysis. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2001, 93(1-3), 115-134. DOI: 10.1016/S0001-8686(00)00081-6. ISSN 00018686. Dostupné také
z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868600000816>.
- [17] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 2014, 292(3), 589-597. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-013-3104-9.
- [18] Chien, C. L., Yeh, S. J., Yang, Y. M., Chang, C. H., & Maa, J. R. (2002). Formation and encapsulation of catanionic vesicles. *J. Chin. Colloid Interface Soc*, 24, 31-45.
- [19] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir*. 2005, 21(14), 6179-6184. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la047207g
- [20] BRAMER, Tobias, Noel DEW a Katarina EDSMAN. Pharmaceutical applications for catanionic mixtures. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007, 59(10), 1319-1334. DOI: 10.1211/jpp.59.10.0001. ISSN 00223573. Dostupné také
z: <http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.59.10.0001>.
- [21] LEE, Chen-Hsuan, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhancing physical stability of positively charged catanionic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid and Polymer Science*. 2014, 292(10), 2519-2527. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-014-3285-x.
- [22] Dimethyldioctadecylammonium chloride [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2020-09-17]. Dostupné
z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/40167?lang=en&ion=CZ>.
- [23] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science*. 2018, 67(6), 727-735. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess18008.
- [24] Dimethyldioctadecylammonium chloride [online]. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [cit. 2020-09-17]. Dostupné
z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-chloride>.
- [25] SIMONS, K. How Cells Handle Cholesterol. *Science*. 2000, 290(5497), 1721-1726. DOI: 10.1126/science.290.5497.1721. Dostupné také
z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.290.5497.1721>.

- [26] Cholesterol [online]. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>.
- [27] SAUEROVÁ, Pavla, Tereza PILGROVÁ, Miloslav PEKAŘ a Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ. Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 103(1), 1276-1284. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.173.
- [28] *SURFACTANT SCIENCE AND TECHNOLOGY*. THIRD EDITION. Canada: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006. ISBN 13 978-0-471-68024-6.
- [29] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chemical Reviews*. 1998, 98(8), 2663-2684. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr941199z.
- [30] FALLACARA, Arianna, et al. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* [online]. 2018, 10(7) [cit. 2019-01-21]. DOI: 10.3390/polym10070701. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/7/701>.
- [31] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, 64(13), 1591-1596. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-007-7032-z.
- [32] QHATTAL, Hussaini Syed Sha a Xinli LIU. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Molecular Pharmaceutics*. 2011, 8(4), 1233-1246. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp2000428.
- [33] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [34] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 387 s. ISBN 35-272-9919-X.
- [35] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [36] FÍŠAR, Zdeněk. Principy fluorescenční spektroskopie. [online]. [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
- [37] LITMAN, Burton J. a Y. BARENHOLZ. [91] Fluorescent probe: Diphenylhexatriene. *Biomembranes - Part H: Visual Pigments and Purple Membranes - I*. Elsevier, 1982, 1982, 81(1), 678-685. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121819811. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(82)81093-8.
- [38] Other Nonpolar and Amphiphilic Probes, section 13.5: DPH and DPH Derivatives. *Life technologies* [online]. [cit. 2021-03-02]. Dostupné z WWW: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Lipids-and-Membranes/Other-Nonpolar-and-Amphiphilic-Probes.html#head2>
- [39] LENTZ, Barry R. Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1989, 50(3-4), 171-190. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(89)90049-2.

- [40] BAGATOLLI, Luis A. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006, 1758(10), 1541-1556. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.05.019. ISSN 00052736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273606002033>.
- [41] BAGATOLLI, Luis A, Bruno MAGGIO, Felipe AGUILAR, Carlos P SOTOMAYOR a Gerardo D FIDELIO. Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1997, 1325(1), 80-90. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(96)00246-5.
- [42] PARASASSI, Tiziana, Ewa K. KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence*. 1998, 8(4), 365-373. DOI: 10.1023/A:1020528716621. ISSN 10530509. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020528716621>.
- [43] PERIASAMY, Nagarajan a Roland WINTER. The effects of temperature, pressure and peptide incorporation on ternary model raft mixtures—A Laurdan fluorescence spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2006, 1764(3), 398-404. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2005.10.013.
- [44] BROWN, D. A.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 1998, 14.1: 111-136.
- [45] GIERER, A. a K. WIRTZ. Molekulare Theorie der Mikroreibung. *Zeitschrift für Naturforschung A*. 1953, 8(9), 532-538. ISSN 1865-7109. Dostupné z: doi:10.1515/zna-1953-0903.
- [46] HAIDEKKER, Mark A. a Emmanuel A. THEODORAKIS. Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Org. Biomol. Chem*. 2007, 5(11), 1669-1678. ISSN 1477-0520. Dostupné z: doi:10.1039/B618415D.
- [47] CHANDROSS, Edwin A.; DEMPSTER, Carol J. Intramolecular excimer formation and fluorescence quenching in dinaphthylalkanes. *Journal of the American Chemical Society*, 1970, 92.12: 3586-3593.
- [48] ZACHARIASSE, Klaas A., Gert DUVENECK a Reinhard BUSSE. Intramolecular excimer formation with 1,3-di(1-pyrenyl)propane. Decay parameters and influence of viscosity. *Journal of the American Chemical Society*. 1984, 106(4), 1045-1051. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00316a038
- [49] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2009 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>.
- [50] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016, 235, 337-351. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

- [51] Dynamic Light Scattering. LS Instruments AG [online]. Fribourg: LS Instruments AG, b.r. [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>.
- [52] HAWE, Andrea, Wendy L. HULSE, Wim JISKOOT a Robert T. FORBES. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates. *Pharmaceutical Research*. 2011, 28(9), 2302-2310. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-011-0460-3.
- [53] JACKSON, Kevin. Dynamický rozptyl světla - co, jak, proč?. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2007, XVII, č. 1, s. 12–14. ISSN 1210-7409.
- [54] Dynamic Light Scattering: Theory. LS Instruments AG [online]. LS Instruments AG, b.r. [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamiclight-scattering-dls/dynamic-light-scattering-theory/>.
- [55] XU, Renliang. *Particle characterization: light scattering methods*. 13. Dordrecht: Kluwer, 2000. Particle technology series. ISBN 14-020-0357-9.
- [56] Electrophoretic Light Scattering (ELS). In: Malvern [online]. United Kingdom: Copyright, 2021 [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: https://www.malvern.com/en/products/technology/electrophoretic-lightscattering/?gclid=Cj0KCQiAgZTRBRDmARIsAJvVWAuZkhhuJTUHiEQR_tJmdcSfSujK8Vx0_sbo52bFwtDfOaz9hCx7oNqQaAhKLEALw_wcB
- [57] MONTES RUIZ-CABELLO, F. Javier, Gregor TREFALT, Plinio MARONI a Michal BORKOVEC. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Physical Review E*. 2014, 90(1), s. 12301. ISSN 1539-3755. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevE.90.012301.
- [58] PECORA, Robert, BROWN, Wyn, ed. Dynamic light scattering: the method and some applications.: Monographs on the physics and chemistry of materials. 1. Clarendon Press: Oxford [England];, 1993. ISBN 978-0-19-853942-1.
- [59] Zetasizer Nano ZS90. Malvern Panalytical [online]. Velká Británie: Malvern Panalytical Ltd, 2015 [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetazerrange/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>.
- [60] CAFFREY, Martin a Jacqueline HOGAN. LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1992, 61(1), 1-109. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(92)90002-7.
- [61] HARRIS, Faith M, Katrina B BEST a John D BELL. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2002, 1565(1), 123-128. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(02)00514-X.

- [62] LÚCIO, Aline D., Cíntia C. VEQUI-SUPLICY, Roberto M. FERNANDEZ a M. Teresa LAMY. Laurdan Spectrum Decomposition as a Tool for the Analysis of Surface Bilayer Structure and Polarity: a Study with DMPG, Peptides and Cholesterol. *Journal of Fluorescence*. 2010, 20(2), 473-482. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-009-0569-5.
- [63] LEE, Jung a Chien-Hsiang CHANG. DNA association-enhanced physical stability of cationic vesicles composed of ion pair amphiphile with double-chain cationic surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 121, 171-177. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.005.
- [64] POOJARI, Chetan, Natalia WILKOSZ, Rafael B. LIRA, Rumiana DIMOVA, Piotr JURKIEWICZ, Rafał PETKA, Mariusz KEPCZYNSKI a Tomasz RÓG. Behavior of the DPH fluorescence probe in membranes perturbed by drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019, 223. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.104784.
- [65] WEN, S., M. HELMSTEDT a H. KNOLL. Microenvironmental differences and changes in bilayers of unilamellar vesicles probed by spectroscopic and kinetic parameters. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, 278(2), 488-496. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2004.06.033.
- [66] LEVITT, James A., Pei-Hua CHUNG, Marina K. KUIMOVA, Gokhan YAHIOGLU, Yan WANG, Junle QU a Klaus SUHLING. Fluorescence Anisotropy of Molecular Rotors. *ChemPhysChem*. 2011, 12(3), 662-672. ISSN 1439-4235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201000782.
- [67] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of cationic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020, 607. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526.
- [68] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2018, 92(10), 29-35. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013.
- [69] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAIEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018, 10(2), 57. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- [70] PAPAHDJOPOULOS, Demetrios, Marke COWDEN a Harold KIMELBERG. Role of cholesterol in membranes effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1973, 330(1), 8-26. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2736(73)90280-0.

- [71] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 137, 664-668. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.101.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

8.1 Seznam symbolů

<i>Symbol</i>	<i>Název veličiny</i>
P	Kritický sbalovací parametr
a_0	Plocha hydrofilních hlav
v	Objem hydrofobní části
l_c	Maximální délka nataženého hydrofobního řetězce
τ	Doba života excitovaného stavu
Φ_F	Kvantový výtěžek fluorescence
η	Viskozita
r_0	Fundamentální anizotropie/ limitní anizotropie
r	Steady-stane anizotropie
φ	Rotační korelační čas
k_B	Boltzmanova konstanta
T	Absolutní teplota

8.2 Seznam zkratk

<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
DODAC	Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid
CTAB	Cetrimoniumbromid/hexadecyltrimethylamonium bromid
SDS	Dodecylsírán sodný
CMC	Kritická micelární koncentrace
IPA	Iontový amfifilní pár
DPH	Difenylhexatrien
DCVJ	Dikyanovinyljulolidin
P3P	Bispyrenylpropan
DLS	Dynamický rozptyl světla
ELS	Elektroforetický rozptyl světla
DPPC	Dipalmitoylfosfatidylcholin
DMPG	Dimyristoylfosfatidylglycerol
DHDAB	Dihexadecyldimethylamonium bromid
DODAB	di-n-octadecyl-dimethylamonium bromid
DHAB	di-n-hexadecyl-dimethylamonium bromid
DDAB	di-n-dodecyl-dimethylamonium bromid