



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

REZONANČNÍ PŘENOS ENERGIE VE STUDIU
INTERAKCE POLYMERŮ A VEZIKUL
RESONANCE ENERGY TRANSFER IN THE STUDY OF POLYMER-VESICLE INTERACTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Zuzana Jízdná

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1758/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Zuzana Jízdná**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Rezonanční přenos energie ve studiu interakce polymerů a vezikul

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na téma rezonančního přenosu energie a jeho stanovení, přípravy vezikulárních systémů a roztoků polymerů.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodnou kombinaci fluoroforů pro stanovení interakce mezi vybraným polymerem a vhodným vezikulárním systémem.
- 3) Provést základní ověřovací experimenty s vybranými koloidními systémy.
- 4) Zhodnotit dosažené výsledky z hlediska využitelnosti této metodiky pro studium interakce mezi polymery a vezikulami.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Zuzana Jízdná
studentka

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

prof. Ing. Míloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
Děkan

ABSTRAKT

Předkládaná bakalářská práce se zabývala přípravou kataniontových vezikulárních systémů, které byly tvořeny tenzidy CTAB a SDS, pro studium jejich vzájemné interakce s polymerem hyaluronanem pomocí měření Försterova rezonančního přenosu energie. Nejprve byly připraveny koncentrační řady vezikulárních systémů s fluorofory. Použitými fluorofory byly DPH, perylen a fluorescein. Poté byla měřena doba života fluorescence vybraných fluoroforů, metodou TCSPC. Následně byly měřeny charakteristiky připravených vezikulárních systémů metodami DLS a ESL. Pro finální měření interakce vezikuly s polymerem byl na základě všech provedených měření zvolen vezikulární roztok, který obsahoval DPH o koncentraci $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l a hyaluronan. Byly testovány dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu (300 a 900 kDa) o hmotnostních koncentracích 1, 5, 10, 50 a 100 mg/l. Měřením bylo potvrzeno, že dochází k jejich vzájemné interakci a tento systém by tedy mohl nalézt uplatnění v medicínském odvětví.

ABSTRACT

The presented bachelor's thesis dealt with the subject of preparation of cationic vesicular systems, formed by the CTAB and SDS surfactants, in order to study their mutual interaction with the hyaluronan polymer using Förster resonance energy transfer measurements. First, concentration series of vesicular systems with fluorophores were prepared. DPH, perylene and fluorescein were used as fluorophores. Afterwards, the fluorescence lifetime of selected fluorophores was measured by the TCSPC method. Then, the characteristics of the prepared vesicular systems were measured using the DLS and ESL methods. For the final measurement of the interaction between the vesicle and the polymer, a vesiculation solution was chosen based on all the measurements carried out, which contained DPH with a concentration of $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l and hyaluronan. Two molecular weights of hyaluronan (300 and 900 kDa) were tested at mass concentrations of 1, 5, 10, 50 and 100 mg/l. The measurement confirmed their mutual interaction, thus this system could find application in the medical sector.

KLÍČOVÁ SLOVA

časově rozlišená fluorescence, FRET, hyaluronan, kataniontové vezikuly

KEY WORDS

Time resolved fluorescence, FRET, hyaluronan, cationic vesicles

JÍZDNÁ, Zuzana. *Rezonanční přenos energie ve studiu interakce polymerů a vezikul* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148062>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce a možnosti pracovat na zajímavém a aktuálním tématu. Dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Ivaně Málkové za čas se mnou strávený, trpělivost, za cenné rady a připomínky.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Fluorescence.....	8
2.1.1	Doba života a kvantový výtěžek fluorescence.....	9
2.2	Měření fluorescence	10
2.2.1	Časově korelované čítání jednotlivých fotonů TCSPC	10
2.3	Försterův rezonanční přenos energie FRET.....	11
2.4	Fluorofory	13
2.4.1	Fluorescein.....	14
2.4.2	Perylen	14
2.4.3	DPH	15
2.5	Tenzidy.....	15
2.5.1	CTAB.....	17
2.5.2	SDS	17
2.5.3	DODAC	18
2.6	Kataniontové vezikuly IPAs	18
2.6.1	Cholesterol.....	19
2.7	Charakterizace vezikulárních systémů.....	20
2.7.1	DLS.....	20
2.7.2	ELS	21
2.7.3	Značení vezikul.....	22
2.8	Interakce vezikul s polymery	22
2.8.1	Hyaluronan	22
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	23
3.1	Studium kataniontových vezikulárních systémů.....	23
3.2	Studium vlivu přídavku cholesterolu na stabilitu kataniontových vezikul	24
3.3	Studium interakce kataniontových vezikul s hyaluronanem.....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Chemikálie	26
4.2	Přístroje	26
4.3	Příprava prášku IPA	27
4.4	Příprava vezikulárních systémů	27
4.5	Příprava koncentrační řady vezikul s DPH a perylenem	28

4.6	Příprava koncentrační řady fluoresceinu.....	28
4.7	Příprava značených vezikulárních systémů s polymerem.....	28
4.8	Charakterizace vezikulárních systémů.....	29
4.9	Měření excitace a emise fluoroforů.....	29
4.10	Měření FRET pomocí TCSPC	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1	Optimalizace fluoroforů	30
5.1.1	Perylen	30
5.1.2	DPH	33
5.2	Interakce vezikul s hyaluronanem.....	37
5.3	Porovnání interakce vezikul s fluoresceinem a značeným hyaluronanem.....	41
6	ZÁVĚR	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49
8.1	Seznam použitých symbolů	49
8.2	Seznam použitých zkratk.....	50
9	PŘÍLOHY	51

1 ÚVOD

Výzkum v oblasti nových forem a způsobů podávání léčiv je stále vysoce aktuální. Nejen kvůli neustálému nárůstu případů rezistence vůči léčivům, ale také díky stále se rozvíjejícím technologiím umožňujícím výrobu inovativních lékových forem a nosičů pro cílenou distribuci léčiva. Pomocí nejmodernějších technologií se objevují nové a lepší látky, které lze použít jako nosiče léčiva a zajistit tak efektivnější distribuci léčiva v organismu nebo jeho řízené uvolňování. Mezi aktuální témata, která je potřeba v souvislosti s podáváním léčiv studovat, patří nejen samotný způsob podávání léčiv, ale také konstrukce systému pro jejich podávání [1].

V současnosti se ve farmaceutickém průmyslu jako nejvhodnější pomocné systémy pro podávání léčiv do lidského organismu jeví vezikulární systémy tvořené fosfolipidovou dvojrůstvou. Jejich použití je však omezené nedostatečnou schopností doposud známých metod k jejich správnému oddělení od léčiva na žádaném místě účinku. Jako vhodná alternativa se nabízejí iontové vezikuly [2].

Možná alternativa, která bude nabízet lepší fyzikálně-chemické vlastnosti než fosfolipidové vezikuly, je vyvinout vezikulární systém z povrchově aktivních látek, které jsou schopné vytvořit struktury podobné membránovým vezikulám. Jednou z možností jsou neiontové povrchově aktivní látky, které nalézají své uplatnění v kosmetickém průmyslu, ale jako systémy pro podání léčiv funkčně selhávají, a to především kvůli nedostatečné stabilitě, častým agregacím a předčasnému úniku léčiva ze systému. Proto se současný výzkum více zaměřuje na vezikuly iontové, které prokazují větší stabilitu [3].

Kataniontové vezikuly jsou oproti fosfolipidovým vezikulám vhodnější nejen díky své stabilitě, ale také lepší cenové dostupnosti. Jejich příprava je snadná a nenáročná na dobu přípravy. Kataniontové vezikulární systémy rovněž mohou nalézat lepší uplatnění v oblastech genové terapie než doposud používané membránové vezikuly, protože tvoří komplexy s DNA, které lze aplikovat při doručování genů. Výzkum kataniontových vezikul se proto zaměřuje na jejich stabilitu, účinnost enkapsulace, propustnost membrány a schopnost uvolňování léčiva [4].

Pro přípravu iontových vezikulárních systémů je možné vybírat z celé řady povrchově aktivních látek a jejich různých vzájemných kombinací. Při výběru vhodných povrchově aktivních látek je důležité, aby nevykazovaly vysokou toxicitu a byly biokompatibilní pro lidský organismus. Způsob, jak snížit toxicitu a zvýšit stabilitu systému, je obalení vezikuly vhodným polymerem, který bude biologicky odbouratelný.

Nezbytným předpokladem pro podání léčiv kataniontovými vezikulami s polymerem je vzájemná interakce vezikuly a polymeru. Tuto interakci lze dokázat měřením rezonančního přenosu energie. Rezonanční přenos energie můžeme měřit pomocí fluorescenčních metod. Nabízejí se dvě metody, metoda ustálené fluorescence a časově rozlišené fluorescence. Obě metody nalézají významné uplatnění v membránové biofyzice, avšak metoda časově rozlišené fluorescence je méně ovlivněná dalšími faktory (rozptyl světla, efekt vnitřního filtru). Tato metoda je stále častěji používaná také díky rostoucí dostupnosti, ke které přispívá vývoj levnějších pulzních zdrojů světla [5].

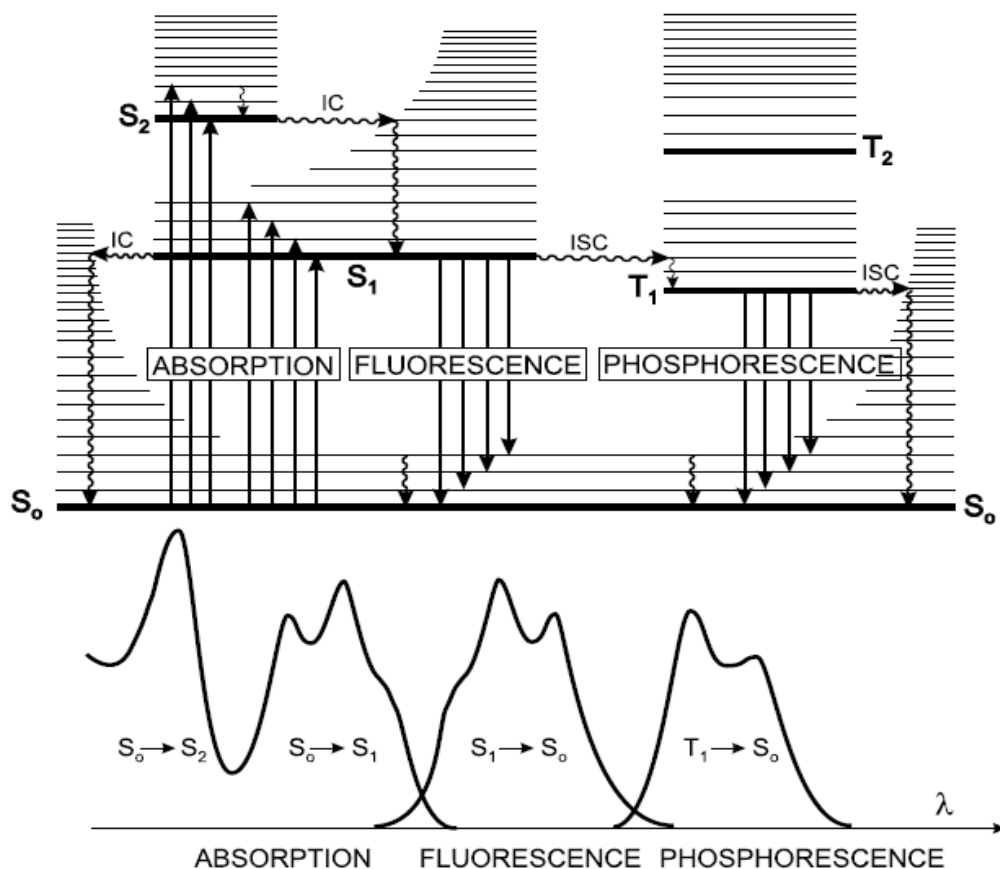
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

Fluorescence patří mezi luminiscenční jevy, které jsou charakterizované schopností některých látek vydávat za určitých podmínek viditelné nebo neviditelné záření. Luminiscenční záření je vždy vyvoláno dodáním nějaké energie, např. vzniklé chemickou reakcí (chemiluminiscence), působením elektrického pole (elektroluminiscence) či dopadem elektromagnetického záření (fotoluminiscence) [6].

K fluorescenci dochází v důsledku absorpce dopadajícího elektromagnetického záření o určité vlnové délce (excitační vlnová délka) molekulou látky, která se excituje a při návratu z excitovaného do základního stavu zpětně emituje záření o jiné vlnové délce (emisní vlnová délka) [6].

Pro jednoduchou vizualizaci absorpce a emise světelné energie slouží **Perrin-Jabloňského diagram** (Obrázek 1), který znázorňuje absorpci fotonů, vnitřní konverzi (IC), fluorescenci, mezisystémové přechody (ISC), fosforescenci a jednotlivé elektronové a vibrační stavy molekul. Elektronové stavy molekul lze obecně rozdělit na singletové (S, elektrony jsou spinově párované) a tripletové stavy (T, jedna sada elektronů je nepárová). S_0 označuje nejnižší energetickou hladinu. Molekula může být excitována do vyšších singletových stavů (S_1 , S_2) absorpcí fotonu. Z excitovaného singletového stavu může molekula ztrácet energii vnitřní konverzí, po které následuje vibrační relaxace [7].



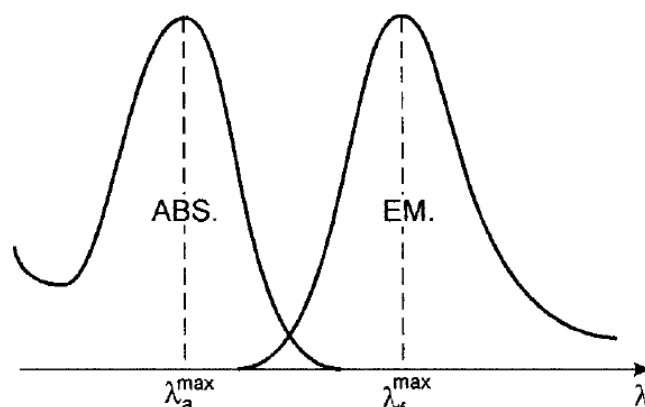
Obrázek 1: Perrin-Jabloňského diagram a znázornění vlnové délky pro jednotlivé jevy [8]

Vysvětlivky: *absorption* – absorpce; *fluorescence* – fluorescence; *phosphorescence* – fosforescence

Kashovo pravidlo říká, že k emisi dochází ze stavu, který je energeticky nejbližší základnímu stavu. Molekula nacházející se ve svém základním singletovém stavu (S_0), může být po absorpci fotonu excitována na hladinu s vyšší energií, v závislosti na energii absorbovaného fotonu. Důsledkem vnitřní konverze a relaxace dochází k emisi z nejnižšího excitovaného stavu S_1 [9].

Část energie primárního absorbovaného záření je tedy deaktivována tzv. nezářivými přechody (Obrázek 1) a emitované sekundární fluorescenční záření má proto nižší hodnotu energie. Jestliže pro tutéž látku spektrálně rozložíme jak absorbované primární záření, tak emitované sekundární záření, získáme absorpční a emisní spektra, která jsou téměř zrcadlově opačnými tvary, které se liší pouze tím, že fluorescenční (emisní) leží v oblasti vyšších vlnových délek než spektrum absorpční. Obě spektra se zpravidla částečně překrývají.

Stokesův posun (Obrázek 2) popisuje vzdálenost mezi maximem absorpčního spektra a maximem emisního spektra [8].



Obrázek 2: Stokesův posun [8]

2.1.1 Doba života a kvantový výtěžek fluorescence

Doba života fluorescence a kvantový výtěžek jsou důležité vlastnosti fluoroforu, udávají důležitá selekční kritéria v jednomolekulární fluorescenční spektroskopii [8].

Doba života fluorescence označuje průměrnou dobu, kterou molekula stráví ve svém excitovaném stavu (singletovém stavu S_1) než dojde k emisi a vrátí se do základního stavu. Při fluorescenci vzbuzené záření trvá přibližně 10^{-8} s. Doba nezářivých procesů fluorescence je popsána rychlostní konstantou k_{nr} a zářivé přechody jsou popsány pomocí rychlostní konstanty Γ . Doba života fluorescence lze vypočítat pomocí rovnice [10]:

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

Fluorescenční kvantový výtěžek je poměr fotonů, které byly molekulou emitovány k počtu fotonů, které byly absorbovány. Nejvyšší kvantové výtěžky se mohou blížit k jedné, nebudou však nikdy vyšší než jedna kvůli ztrátám, které znázorňuje Stokesův posun. Kvantový výtěžek je popsán rovnicí [10]:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (2)$$

2.2 Měření fluorescence

Velmi důležitými analytickými přístupy v analytické a fyzikální chemii jsou metody ustálené fluorescence (ang. Steady-state) a časově rozlišené fluorescence (ang. Time resolved).

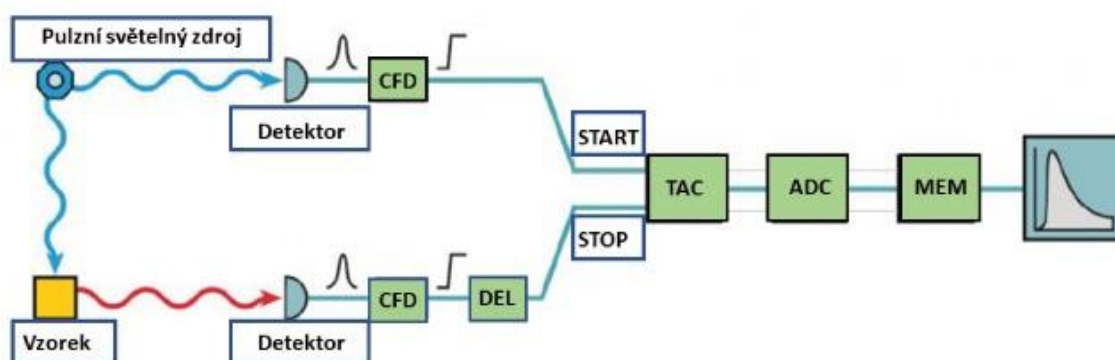
Pomocí **ustálené fluorescence** můžeme sledovat dlouhodobou průměrnou fluorescenci vzorku po jeho ozáření UV, viditelným nebo blízkým IČ světlem. Světelným zdrojem je poskytován konstantní tok fotonů. Jsou zaznamenávána excitační a emisní spektra, ze kterých lze zjistit jejich maxima. Spektra zobrazují závislost intenzity emise nebo absorbance na vlnové délce. Měří-li se při nízkých koncentracích, měřená intenzita je závislá na molárním absorpčním koeficientu fluoroforu. Měření spektra může být citlivé na vlivy prostředí (např. polarita, pH, viskozita). Měření fluorescence v ustáleném stavu tedy umožňuje detekci změn intenzity fluorescence konkrétního fluoroforu při změně podmínek prostředí [11].

Časově rozlišená fluorescence monitoruje fluorescenci vzorku jako funkci času po excitaci světelným pulzem. Tato analytická technika se používá při studiu v systémech časově rozlišeného fluorescenčního přenosu energie. Poskytuje pohled na dynamiku excitovaného stavu. Měření je založeno na detekci poklesu intenzity nebo na zpožděné detekci emise. Jsou dvě metody, pomocí kterých je možné časově rozlišenou fluorescenci změřit. Jedná se o pulzní fluorimetrii a fázově modulační fluorimetrii [11].

2.2.1 Časově korelované čítání jednotlivých fotonů TCSPC

TCSPC (ang. Time-Correlated Single Photon Counting) je jedna z nejcitlivějších metod pro stanovení doby života fluorescence. Metoda je založena na detekci emitovaných fotonů po excitaci molekuly. Využívá se pulzní světelný zdroj (laser, LED). Produkce světelného pulzu představuje dobu, od které je zahájeno snímání signálu. Registrace prvního vyzářeného fotonu pro detektor znamená zastavení přijímání signálu. Po excitaci je zaznamenán pouze jeden foton. Elektrický signál z detektoru je pak upraven pomocí diskriminátoru konstantní frakce CFD (ang. constant fraction discriminator). Signál je pomocí převodníku převeden z časového údaje na amplitudu. Převodník od startovacího signálu začne generovat napětí, které lineárně roste s časem. Po zaregistrování emitovaného fotonu se napětí generovat přestane. Výstupní signál TAC (ang. time-to-Amplitude Converter) je pomocí ADC převodníku zpracován a uložen. Výstup z měření je histogram, který je výsledkem zaznamenávání opakujícího se procesu excitace molekuly a emise fotonu. Na základě vysokého počtu měření je v histogramu zaznamenáno dohasínání fluorescence molekuly.

Schéma měření je zobrazeno na obrázku 3 [12, 13].



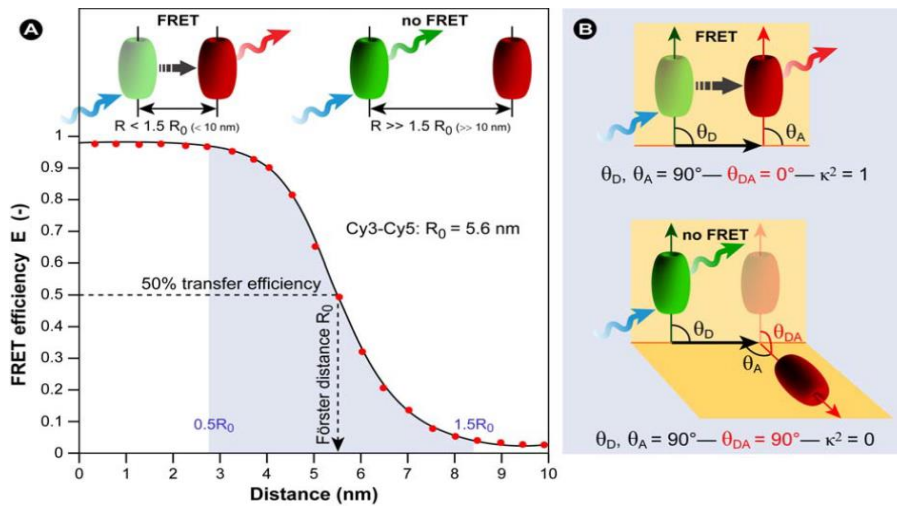
Obrázek 3: schéma fluorimetru pro TCSPC [13]

2.3 Försterův rezonanční přenos energie FRET

K přenosu emisní energie může docházet zářivými nebo nezářivými mechanismy. Při zářivém přenosu elektronové energie mezi molekulou donoru a akceptoru dochází k výměně fotonu, zatímco při nezářivém přenosu energie k výměně fotonu nedochází. Pokud se v blízkosti donoru vyskytuje vhodný akceptor, může dojít k přenosu energie excitovaného stavu donoru přímo na akceptor, který následně emituje energii původně absorbovanou donorem, aniž by došlo k vyzáření fotonu. V tomto případě se jedná o nezářivý přenos elektronové energie. Nezářivým přechodem je tedy absorbována energie pouze molekulami donoru a emitována pouze molekulami akceptoru [14].

Försterův rezonanční přenos energie (ang. Förster resonance energy transfer, FRET) je typ nezářivého přenosu energie, který se využívá ke sledování molekulárních interakcí. Svůj název metoda nese podle Theodora Förstera, který v roce 1946 poprvé popsal rezonanční přenos energie. Rezonanční přenos energie je fyzikální proces, při kterém dochází k přenosu energie z donorového fluorochromu v excitovaném stavu na akceptorový chromofor v základním stavu, a to prostřednictvím slabé interakce dipól-dipól. Podmínkou úspěšného rezonančního přenosu energie je dostatečná blízkost donoru a akceptoru, jedná se o vzdálenost 1–10 nm. Tuto podmínku splňují například fluorofory Cy3 a Cy5 (Obrázek 4 (A)). Podmínka tak blízké vzdálenosti mezi donorem a akceptorem ztěžuje sledování interakcí mezi velkými proteiny či studium multiproteinových komplexů. Další podmínkou je vhodná relativní orientace emisního dipólového momentu donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru.

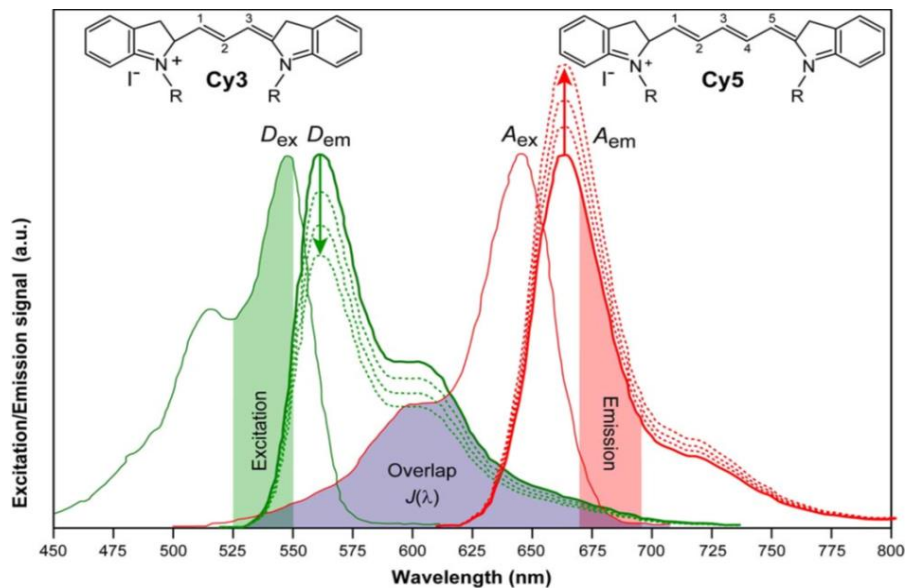
Ideální orientace pro co nejvyšší efektivitu FRET je paralelní orientace donoru a akceptoru (Obrázek 4 (B)) [15].



Obrázek 4: Zobrazení dostatečné blízkosti donoru a akceptoru pro úspěšný rezonanční přenos energie pro Cy3 a Cy5 (A); vhodná relativní orientace emisního dipólového momentu donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru (B) [15]

Vysvětlivky: FRET efficiency – FRET účinnost; distance – vzdálenost

Musí být splněna také podmínka spektrálního překryvu emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru (Obrázek 5). Vzhledem k této podmínce je nutno počítat s ovlivněním signálu FRET emisí donoru do akceptorového kanálu a dále excitací akceptorových molekul při vlnové délce excitace donoru – tzv. spektrální prosakování (ang. spectral bleed-through). Dále je nutno provést korekce FRET signálu v akceptorovém kanálu vzhledem k externímu signálu a signálu přístroje (přístrojový šum, fluorescence pozadí, ...) [16].



Obrázek 5: spektrální překryv emisního spektra donoru (Cy3) s absorpčním spektrem akceptoru (Cy5) [15]

Vysvětlivky: excitation – excitace; emission – emise; overlap – spektrální překryv; wavelength – vlnová délka

K vytvoření FRET-párů (páry donor-akceptor) se využívají fluorescenční proteiny (FP), organická fluorescenční barviva, cheláty s lanthanoidy a anorganické polovodivé kvantové tečky [15].

Účinnost FRET je definována jako šestá mocnina vzdálenosti mezi molekulou donoru a akceptoru (r) [17]

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (3)$$

R_0 je charakteristická vzdálenost, kde je účinnost FRET 50 % (Obrázek 4 (A)). Pro vzdálenosti menší, než R_0 je účinnost FRET blízka jedné, zatímco pro vzdálenosti větší, než R_0 je účinnost blízka nule. Hodnota R_0 může být vypočtena pomocí rovnice s parametry: κ^2 (úhel mezi dipóly), Q_D (donorový kvantový výtěžek), N_A (Avogadrova konstanta), n (index lomu světla) a $J(\lambda)$ (integrál spektrálního překryvu mezi donorem v základním stavu a akceptorem v excitovaném stavu) [17]

$$R_0 = \left[\frac{20,7}{128\pi^5 \cdot N_A} \cdot \frac{\kappa^2 \cdot Q_d}{n^4} \cdot J(\lambda) \right]^{1/6} \quad (4)$$

Účinnost může být také vypočítána na základě měření TCSPC, které nám poskytne informaci o době života donoru (τ_d) a době života donoru po přidání akceptoru (τ_{da}) [18]

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (5)$$

Na základě již zmíněných proměnných může být vypočtena rychlost přenosu energie [18]

$$k_{et} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (6)$$

2.3.1.1 Využití FRET

Techniky založené na FRET jsou využívány při studiu řady biologických procesů jako např. interakce protein-protein, která je využívána při přenosu signálu, u konformačních změn proteinů, při aktivaci/inhibici enzymů, v signalizaci prostřednictvím vápenatých kationtů, k charakterizaci genové exprese či studiu nukleových kyselin. Některé z těchto aplikací využívají k vizualizaci mikroskopické techniky, jiné jsou prováděny *in vitro*. Techniky FRET založené na geneticky modifikovaných fluorescenčních proteinech měly zásadní význam v určení struktury (rozdělení do buněčných kompartmentů) a funkční organizace buňky a dále k sledování pohybu proteinů uvnitř buňky [19].

2.4 Fluorofory

Fluorofory, někdy označované jako fluorochromy, jsou látky schopné absorbovat a následně emitovat světelnou energii specifické vlnové délky. Fluorofory absorbují viditelné světlo, jehož zdrojem může být například xenonová výbojka nebo laser. Každá molekula má charakteristickou excitační vlnovou délku. Po absorpci energie se elektron dostane na vyšší energetickou úroveň a dosáhne tak excitovaného stavu. Následuje uvolnění energie ve formě fotonů a dochází k fluorescenci. Množství uvolněné energie určí vlnovou délku fotonů a barvu

pozorované fluorescence. Energie uvolněná během fluorescence bude mít většinou delší vlnovou délku, než byla potřebná pro excitaci [20].

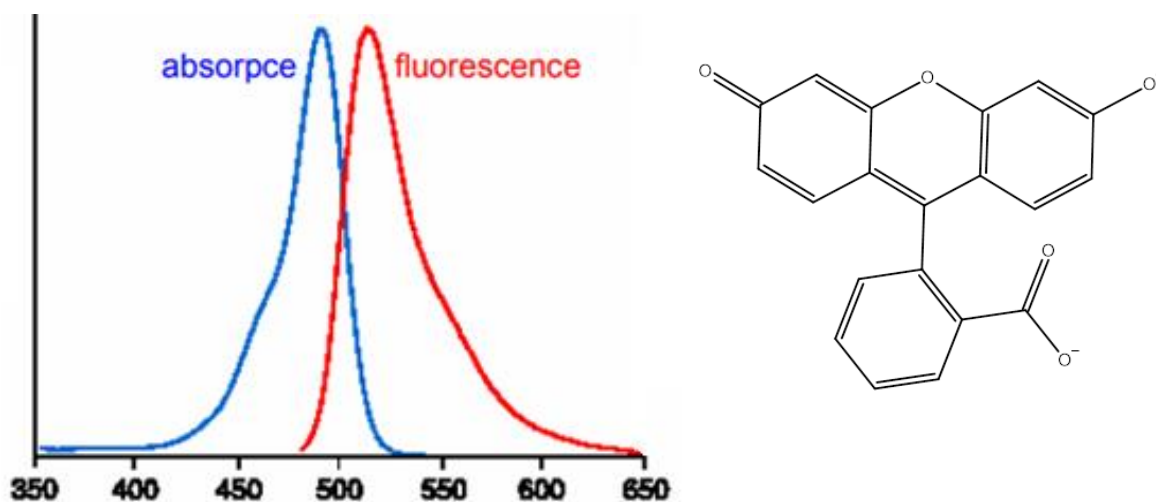
Obecně můžeme fluorofory rozdělit na vnitřní (vlastní) a vnější (nevlastní). Vnitřními fluorofory jsou látky s vlastní fluorescencí, zatím co nevlastními fluorofory jsou látky přidávané ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. Nevlastní fluorofory se dále podle typu vazby dělí na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Fluorescenční značky se na studované biomolekuly váží kovalentně, fluorescenční sondy se naopak na biomolekuly vážou prostřednictvím vazby nekovalentní [21].

2.4.1 Fluorescein

Fluorescein, systematickým názvem 3',6'-dihydroxyspiro[2-benzofuran-3,9'-xanthen] -1-on, je nevlastní fluorofor, který se elektrostaticky váže na kladné povrchy. Jedná se o molekulu citlivou na pH. Na obrázku 6 je znázorněno jeho absorpční a emisní spektrum při hodnotě pH 9 [21].

Jedná se o chemickou látku na bázi xantenu, která má velmi dobré fotofyzikální vlastnosti, mezi které se řadí vysoký absorpční koeficient, vysoký kvantový výtěžek fluorescence, vysoká fotostabilita a relativně dlouhé vlnové délky emisního spektra. Pro své vlastnosti patří fluorescein mezi významné fluorescenční značky v oblastech biochemie a medicíny [22].

Fluorescein je pevná organická látka červené barvy a je rozpustný ve vodě. Jeho absorpční maximum je 494 nm a emisní maximum je 521 nm. Disodná sůl fluoresceinu vykazuje intenzivní zelenožlutou fluorescenci [23].



Obrázek 6: absorpční a emisní spektrum fluoresceinu [21], struktura fluoresceinu jako dianionu [22]

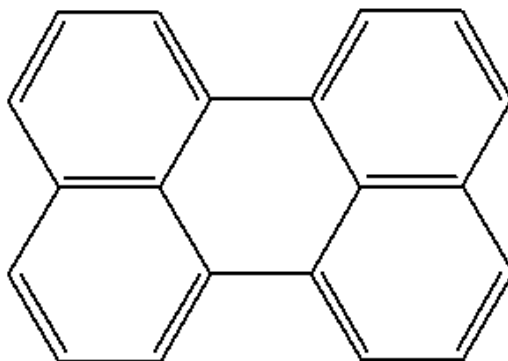
2.4.2 Perylen

Perylen je fluorofor, který se váže ke vzorku pomocí nekovalentní vazby, jedná se tedy o fluorescenční sondu. Mezi jeho využívané fotofyzikální vlastnosti patří vysoký kvantový výtěžek fluorescence, dlouhá životnost excitovaného singletového stavu a schopnost tvořit excimery [24].

Perylen patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky, jejichž deriváty vykazují vysoké emisní záření. Nalézají uplatnění v oblasti molekulární elektroniky a bývají součástí zařízení,

které vyzařují světlo. Polycyklické aromatické uhlovodíky vznikají při nedokonalém spalování aromatických látek (např. uhlí, ropy nebo plynu) [25].

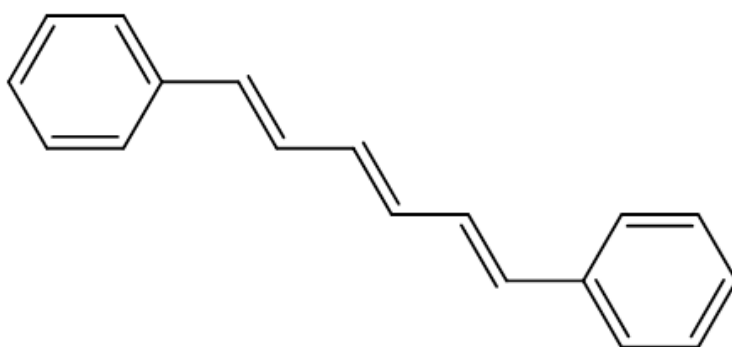
Perylen se vyskytuje ve formě světle žlutých krystalků. Je nerozpustný ve vodě a je lépe rozpustný v rozpouštědlech, které mají menší polaritu než voda jako cyklohexan, toluen, ethanol nebo aceton. Absorpční maximum perylenu v acetonu je 434 nm. Struktura perylenu je zobrazena na obrázku 7 [26].



Obrázek 7: struktura perylenu [27]

2.4.3 DPH

DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) je fluorescenční sonda. Jedná se o lineární uhlovodík se třemi dvojnými vazbami a dvěma fenylovými skupinami. DPH ve vodném prostředí nevykazuje fluorescenční vlastnosti. V nepolárních rozpouštědlech má vysoký kvantový výtěžek. Na základě těchto vlastností je využíván pro studium biomembrán a lipidů. Při vysokých koncentracích dochází k samozhášení. Absorpční maximum DPH v methanolu je 350 nm a emisní maximum je 452 nm. Struktura DPH je zobrazena na obrázku 8 [28].

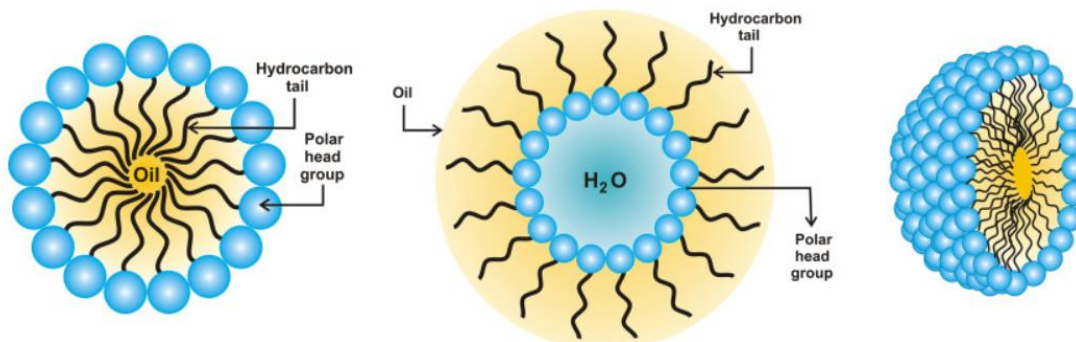


Obrázek 8: struktura DPH [21]

2.5 Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky (PAL), které mají amfifilní strukturu. Skládají se z polární a nepolární části. Polární část je hydrofilní a vykazuje proto afinitu k vodě a polárním rozpouštědlům. Nepolární část je hydrofobní nebo lipofilní a vykazuje afinitu k nepolárním rozpouštědlům. Amfifilní molekuly mají díky své dvojí afinitě tendenci se v prostředí orientovat tak, aby byla polární skupina orientována do vodného prostředí a nepolární mimo vodné prostředí. Amfifilní molekuly tedy migrují na fázové rozhraní (Obrázek 9). Ve velmi

zředěných vodných roztocích tenzidy existují jako monomery, ale po překročení kritické micelární koncentrace, **CMC** (ang. critical micelle concentration), dochází ke spontánní asociaci jednotlivých monomerů do různých typů agregátů (micel). Hodnota CMC je tedy důležitým parametrem charakterizujícím každou PAL [29].



Obrázek 9: struktura micely a chování v polárním a nepolárním rozpouštědle [29]

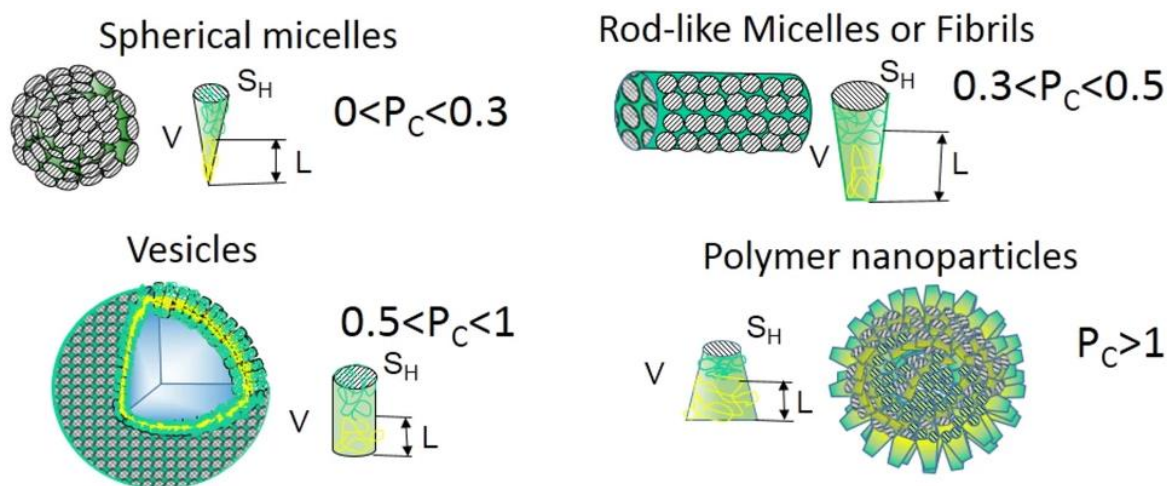
Vysvětlivky: *hydrocarbon tail* – uhlovodíkový chvost; *polar head group* – polární hlavička; *oil* – olej

Spontánní agregací vznikají micely různé morfologie (sférické, tyčinkovité a diskovité, lamelární nebo vezikulární). Samoskládání povrchově aktivních látek je řízeno hydrofobními a elektrostatickými interakcemi. Parametrem, který určuje, do jaké povrchové geometrie se tenzidy zformují, je tzv. kritický pakovací parametr, **CPP** (ang. critical packing parameter), definován vzorcem:

$$P_c = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (7)$$

kde v je objem hydrofobní části, l_c je délka hydrofobní části tenzidu a a_0 je plocha hydrofilní části [30].

Hodnoty P_c a struktury jim odpovídající jsou zobrazeny na obrázku 10.



Obrázek 10: uspořádání tenzidů podle hodnoty CPP [30]

Vysvětlivky: *spherical micelles* – sférické micely; *rod-like micelles or fibrils* – tyčinkovité micely nebo fibrily; *vesicles* – vezikuly; *polymer nanoparticles* – polymerní nanočástice

Agregáty PAL vykazují specifické a užitečné fyzikálně-chemické vlastnosti, například reologické a biologické vlastnosti [31].

Podle charakteru můžeme tenzidy rozdělit na neiontové a iontové, jejichž molekuly nesou určitý náboj a mohou tedy ve vodě disociovat a tvořit ionty. Iontové tenzidy můžeme dále dělit na aniontové, kationtové a amfoterní [31].

Aniontové tenzidy většinou obsahují sulfátovou nebo karboxylovou skupinu, jejich hlavní využití je v práškových nebo kapalných pracích prostředcích využívaných v domácnosti [32].

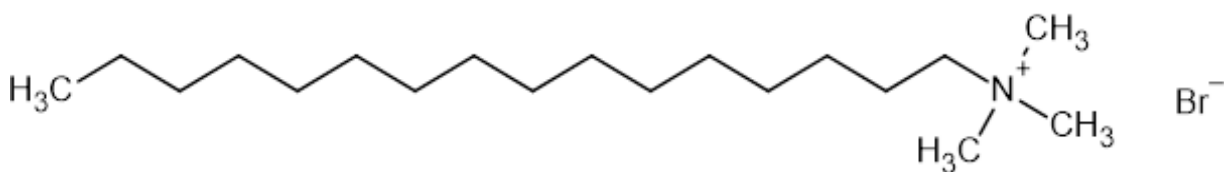
Kationtové tenzidy obsahují jako svou hydrofilní část kvartérní amoniový iont. Kationtové povrchově aktivní látky jsou pro své bakteriostatické účinky využívány jako dezinfekční prostředky, dále se využívají jako antistatická činidla a pro změkčování textilu [32].

Amfoterní tenzidy obsahují ve své struktuře jak kladně, tak záporně nabitý iont. Jedná se o syntetické látky jako jsou betainy nebo sulfobetainy. Z přírodních látek se mezi amfoterní povrchově aktivní látky řadí aminokyseliny a fosfolipidy [31].

Neiontové tenzidy netvoří ve vodě ionty, jejich hydrofilní chování způsobuje polymerovaný glykoether nebo jednotka glukózy. Jsou syntetizovány přidavkem ethylenoxidu nebo propylenoxidu k alkylnolům, mastným alkoholům, mastným kyselinám nebo amidům mastných kyselin. Hlavní využití našli jako detergenty, smáčedla, emulgátory a dispergátory [32].

2.5.1 CTAB

Cetyltrimethylamonium (CTAB), strukturním názvem hexadecyltrimethylamonium bromid, je kvartérní amoniový kladně nabitý tenzid. Ve vodném prostředí disociuje za vzniku kationtu a menšího neaktivního aniontu. Kladně nabitá část dává tenzidu CTAB jeho povrchově aktivní vlastnosti. Jedná se o významné antiseptikum. Má baktericidní účinky proti grampozitivním bakteriím, ve vysokých koncentracích pak i proti některým gramnegativním. Strukturní vzorec CTAB je zobrazen na obrázku 11 [33].

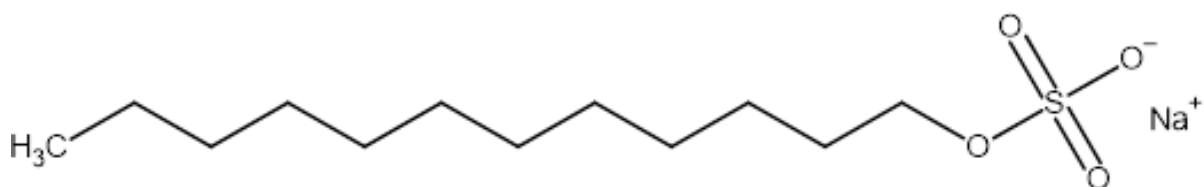


Obrázek 11: struktura CTAB [33]

2.5.2 SDS

Dodecylsírán sodný (SDS), nazýván také Laurylsulfát sodný, je organická sulfátová sůl. Ve vodě disociuje na ionty a snadno se vysráží v přítomnosti draselných solí. SDS nalézá uplatnění v chemickém průmyslu i jako přídavek do čistících a kosmetických produktů. Používá se k čištění nukleových kyselin, dokáže narušit živočišnou tkáň a inhibovat enzym RNázu a DNázu. Nalézá uplatnění v elektroforetických metodách využívaných v biochemii (SDS PAGE).

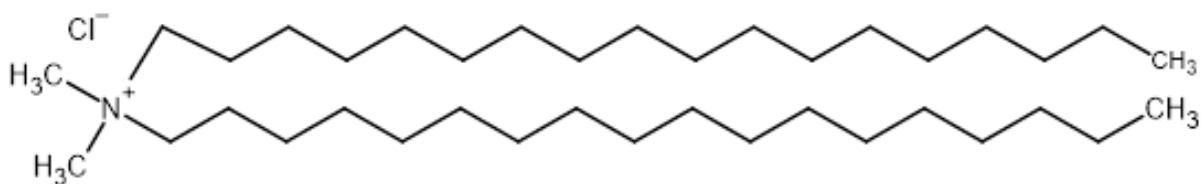
Strukturní vzorec SDS je znázorněn na obrázku 12 [34].



Obrázek 12: struktura SDS [35]

2.5.3 DODAC

Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid (DODAC)/dimethyldioctadecylamonium chlorid (DDAC) je kvartérní amoniový tenzid, který má kladný náboj. Ve vodě disociuje za vzniku kladného iontu, který lze využít pro udělení kladného náboje vezikulárním systémům. Lze jej využít jako změkčovač tkanin, dezinfekční prostředek, kondicionér či do přípravků pro úpravu vlasů. Strukturní vzorec DODAC je znázorněn na obrázku 13 [36].



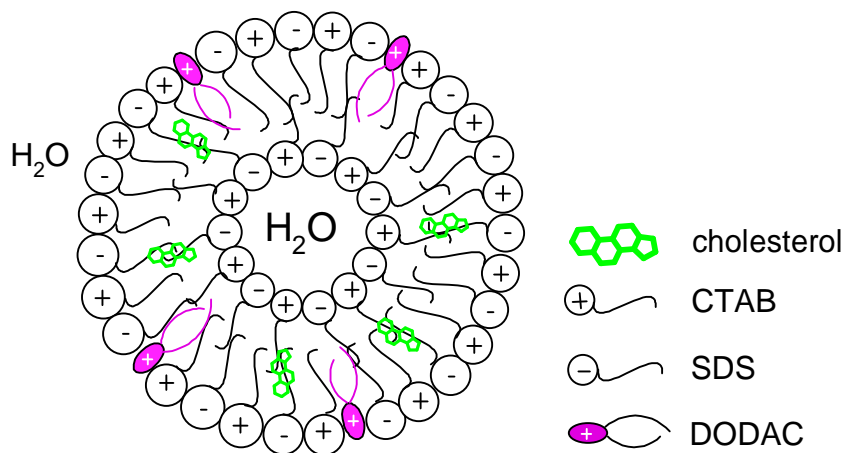
Obrázek 13: struktura DODAC [36]

2.6 Kataniontové vezikuly IPAs

Kataniontové vezikuly, IPAs (Ion pair amphiphiles), vznikají směsí kationtových a aniontových povrchově aktivních látek. Tenzidy často vytvářejí dvouvrstvé struktury, které lze využít pro studium (jako modelové membrány) nebo jako nanonosiče léčiv a genů [37].

Základní strukturu kataniontových vezikul tvoří nejčastěji směs kladně a záporně nabitých jednořetězcových povrchově aktivních látek v ekvimolárním poměru. Výsledná směs má tedy nulový náboj. Do směsi je vhodné přidat dvouřetězcový tenzid, který má náboj, aby se různě nabitě vezikuly od sebe odpuzovaly a nedocházelo k jejich agregaci. Pro zvýšení stability vezikulárních systémů, je možné do směsi přidat stabilizační prvek, například cholesterol [38].

Konkrétním příkladem kataniontové vezikuly je vezikula tvořená jednořetězcovým kladně nabitým tenzidem CTAB, jednořetězcovým záporně nabitým tenzidem SDS, dvouřetězcovým kladně nabitým tenzidem DODAC a cholesterolem. Struktura tenzidu je znázorněna na obrázku 14 [39].

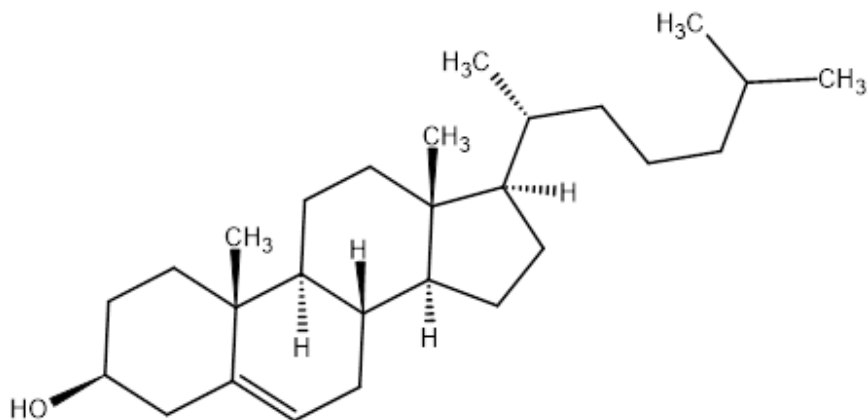


Obrázek 14: struktura stabilizované IPAs vezikuly ve vodném prostředí [39]

2.6.1 Cholesterol

Cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol) je steroidní látka přítomná ve všech živočišných tkáních. Jedná se o prekurzor žlučových kyselin, vitamínu D a steroidních hormonů. Cholesterol je také významnou složkou struktury dvojvrstev biologických membrán. Ovlivňuje vlastnosti membrány několika způsoby. Mění fluiditu, stlačitelnost, tloušťku, průnik vody a vnitřní zakřivení lipidových dvojvrstev. Je transportován v krevní plazmě všech živočichů [40].

Cholesterol se používá při přípravě nosičů pro podávání léčiv a různých terapeutických látek, jako jsou protinádorové látky, antimalarika a antivirotika. Pro tento účel je vhodný díky své přítomnosti v buněčných membránách a široké distribuci v těle. Struktura cholesterolu je znázorněna na obrázku 15 [41].



Obrázek 15: struktura cholesterolu [40]

2.7 Charakterizace vezikulárních systémů

Pro charakterizaci připravených vezikul, nebo pro studium jejich interakcí s jinými látkami, se používá několik analytických přístupů, které se mohou vzájemně doplňovat. Hlavními charakteristikami vezikul jsou velikost, lamelarita, chemické složení (kvalitativní i kvantitativní), enkapsulační kapacita, stabilita a fázové chování [42].

Velikost vezikul je možné určit metodami založenými na rozptylu světla. K určení lamelarity liposomů je možné použít například nukleární magnetickou resonanci doplněnou transmisí elektronovou mikroskopií. Chemické složení liposomů lze stanovit celou řadou kolorimetrických spektrofotometrických metod, separace a následná kvantifikace jednotlivých složek může být provedena pomocí metod chromatografických. Pro určení enkapsulační kapacity je nejprve nutné do vezikuly uzavřít vhodný hydrofilní marker (například fluorescenční barvivo). Podle povahy enkapsulovaného markeru se pro následnou kvantifikaci používají metody spektrofotometrické, fluorescenční nebo elektrochemické. Stabilita částic se stanovuje pomocí elektroforetického rozptylu světla. Ke studiu fázového chování vezikul se používá nukleární magnetická resonance nebo elektronová spinová resonance [42].

2.7.1 DLS

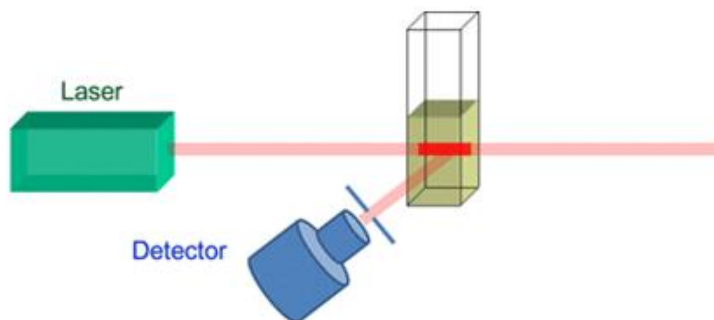
Významnou a nejčastěji využívanou technikou pro stanovení velikosti vezikul a jejich distribuci ve vzorku je dynamický rozptyl světla, DLS (ang. Dynamic light scattering), který má vysokou citlivost a minimální požadavky na objem vzorku [43].

Měření dynamického rozptylu světla je založeno na Brownově pohybu rozptýlených částic v kapalině, kde se pohybují náhodně všemi směry a různou rychlostí, která je dána jejich velikostí. Menší částice se v rozpouštědle pohybují rychleji, a proto bude intenzita rozptýleného světla v čase na malé částici dosahovat výrazně vyšší fluktuace, než by tomu bylo v případě velkých částic [43].

Schéma přístroje DLS je znázorněno na obrázku 16. Laser svítí na vzorek, který je umístěn v kyvetě. Dopadající laserové světlo se rozptýlí o částice ve vzorku do všech směrů. Rozptýlené světlo se detekuje pod určitým úhlem v průběhu času a tento signál se používá k určení difúzního koeficientu a velikosti částic pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

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

kde D je difúzní koeficient, k_B je Boltzmanova konstanta, T je teplota, η je dynamická viskozita a R_H je hydrodynamický poloměr [44].



Obrázek 16: Schéma přístroje pro měření DLS [44]
Vysvětlivky: detector – detektor

2.7.2 ELS

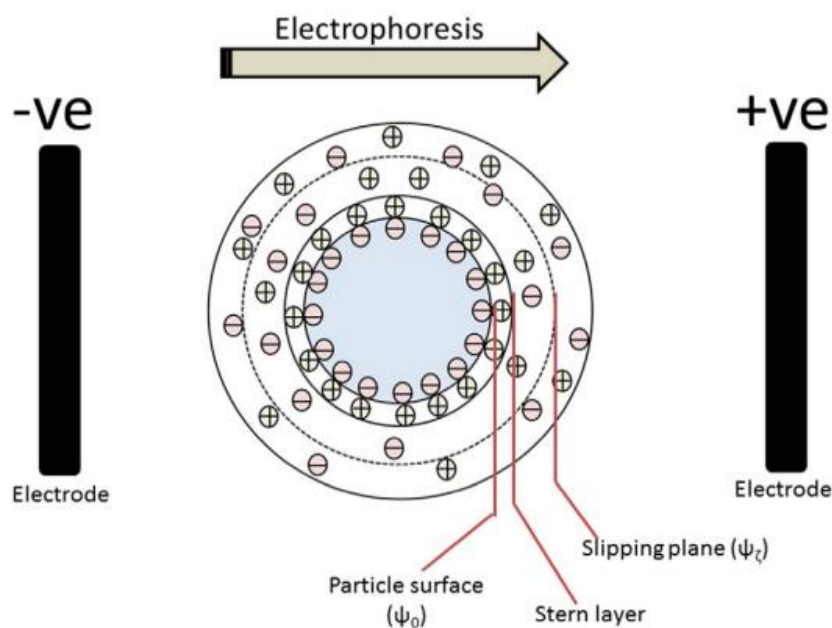
Stanovení stability vezikul, které se skládají z nabitých částic, je možné pomocí metody elektroforetického rozptylu světla, ELS (ang. Electrophoretic light scattering). Pomocí této techniky se měří elektroforetická pohyblivost částic nebo molekul v roztoku a zeta potenciál. Hlavní rozdíl od DLS je ten, že měření probíhá v oscilujícím elektrickém poli. Nabité částice se pohybují v důsledku elektromigrace v průběhu elektroforézy. Nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje směrem k opačně nabité elektrodě [45].

Zeta potenciál mají nabité částice, které jsou ve styku s kapalinou obsahující ionty. Jedná se o povrchový náboj, který přitahuje opačně nabité částice nebo odpuzuje stejně nabité částice v roztoku. Částice v kapalině má elektrickou dvojrstvu (Obrázek 17), která se dá rozdělit na vnitřní a vnější část. Vrstva iontů vázaná na povrch částice se nazývá Sternova vrstva (vnitřní), tato vrstva je pevně vázána na částici a pohybuje se s ní. Vrstva tvořená volně vázanými ionty je difúzní vrstva (vnější), není pevně vázána na částici a pohybuje se nezávisle na částici. Elektrostatický potenciál na hranici zmíněných vrstev tzv. *roviny skluzu* je zmíněný zeta potenciál, který souvisí s povrchovým nábojem částice. K výpočtu zeta potenciálu lze použít Henryho rovnici:

$$U_e = \frac{2\varepsilon \cdot z \cdot f(\kappa a)}{3\eta}, \quad (8)$$

kde U_e je elektroforetická pohyblivost, ε je dielektrická konstanta, z je zeta potenciál, $f(\kappa a)$ je Henryho funkce a η je absolutní viskozita [46].

Aby mohla být částice považována za stabilní musí být hodnota zeta potenciálu menší než -30 mV nebo větší než +30 mV [47].



Obrázek 17: záporně nabitá částice s elektrickou dvojrstvu v elektrickém poli [47]
Vysvětlivky: *electrode* – elektroda; *electrophoresis* – elektroforéza; *particle surface* – povrch částice; *Stern layer* – Sternova vrstva; *slipping plane* – rovina skluzu

2.7.3 Značení vezikul

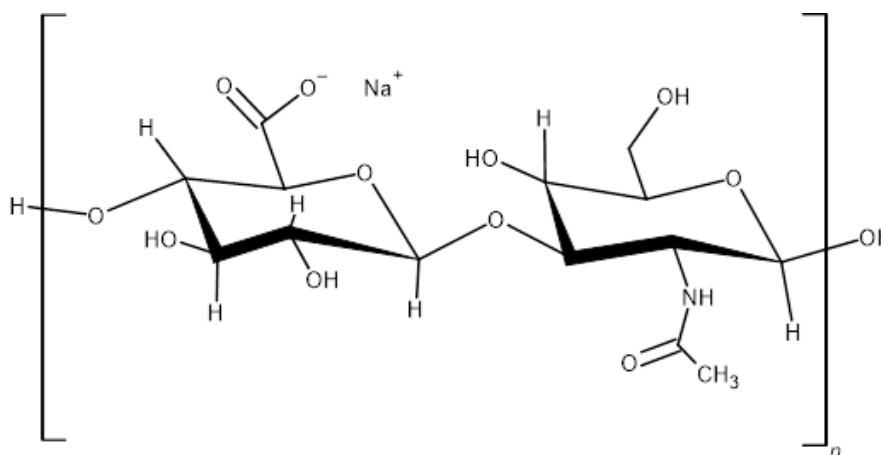
Pro fluorescenční studie je nezbytné při přípravě vezikuly tenzidy, které samotné žádnou fluorescenci nevykazují, opatřit vhodným fluorescenčním barvivem. Rozšířenými fluorescenčními barvivy jsou například fluorescein, Nilská červeň, Oregonová zeleň (derivát fluoresceinu), perylen či DiO (3,3'-dioktadecykloxakarboyanin) [48].

2.8 Interakce vezikul s polymery

Vezikuly a povrchově aktivní látky v interakci s polymery, které jsou rozpustné ve vodě mají širokou škálu využití a tvoří různé fyzikálně-chemické mechanismy. Jejich interakce se používá k dosažení různých účinků jako koloidní stability, emulgace, flokulace, strukturování a regulace reologie. Dají se pak použít při výrobě kosmetických produktů, potravin, vezikulárních systémů pro transport léčiv a při syntéze polymerů. U iontových systémů je schopnost snižovat mezifázové napětí modifikována přítomností polymeru v roztoku [49].

2.8.1 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární biopolysacharid, který je důležitou složkou pro živé organismy od bakterií po člověka. Kyselina hyaluronová je přirozeně syntetizována membránovými proteiny hyaluron syntázy a odbourávána hydrolytickým enzymem hyaluronidázou. Fyziologicky se v organismu vyskytuje ve formě sodné soli, tedy jako hyaluronan či hyaluronát. Polysacharid hyaluronan (Obrázek 18) je lineární polyaniont složený z kyseliny *D*-glukuronové a *N*-acetylglukosaminu, obě jednotky jsou spolu spojeny prostřednictvím beta-1,4 a beta-1,3 glykosidických vazeb a tyto vazby jsou energeticky velmi stabilní. Hyaluronan je velmi hydrofilní molekula s vysokou vazebnou kapacitou k molekulám vody. Hydratovaná molekula hyaluronanu má gelovitou strukturu a v závislosti na molekulové hmotnosti plní řadu biologických funkcí, a to jak na buněčné úrovni, tak na úrovni tkání či kloubních spojení. Například plní biologické funkce udržování elasticity a viskozity tekutého vaziva a tkání, ve kterých řídí hydrataci a přesun vody. Tím, že hydratuje chrupavku a má viskoelastickou povahu pomáhá v kloubech tlumit nárazy a působí zároveň jako mazivo (lubrikant). Díky své biokompatibilitě se jedná o vhodnou látku do kosmetických přípravků a nalézá využití také v medicínských odvětvích. Je zkoumána jako nosič pro léčiva pro různé způsoby podání (oftalmologické, nosní, plicní, parenterální a lokální) [50].



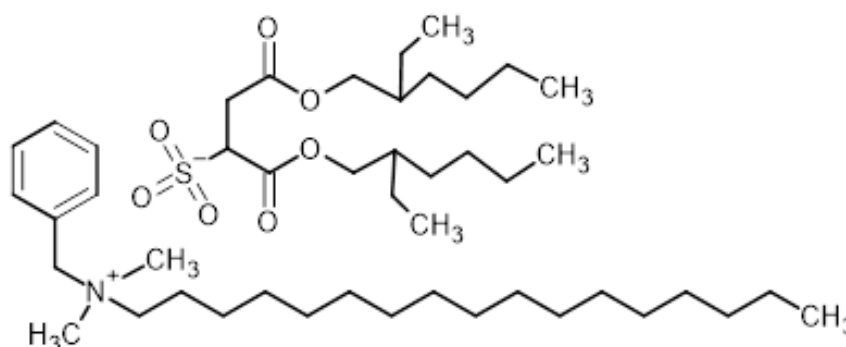
obrázek 18: struktura hyaluronanu [50]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V této kapitole budou popsány výzkumné projekty, které se zabývaly studiem tvorby micelárních a vezikulárních systémů tvořených z povrchově aktivních látek za účelem enkapsulace léčiva a jeho distribuce v lidském organismu. Mezi zkoumané parametry, které se v následujících studiích objevují, patří zkoumání stability systému pomocí metod založených na rozptylu světla, přidání stabilizačního prvku a interakce mezi donorem a akceptorem při měření rezonančního přenosu energie.

3.1 Studium kataniontových vezikulárních systémů

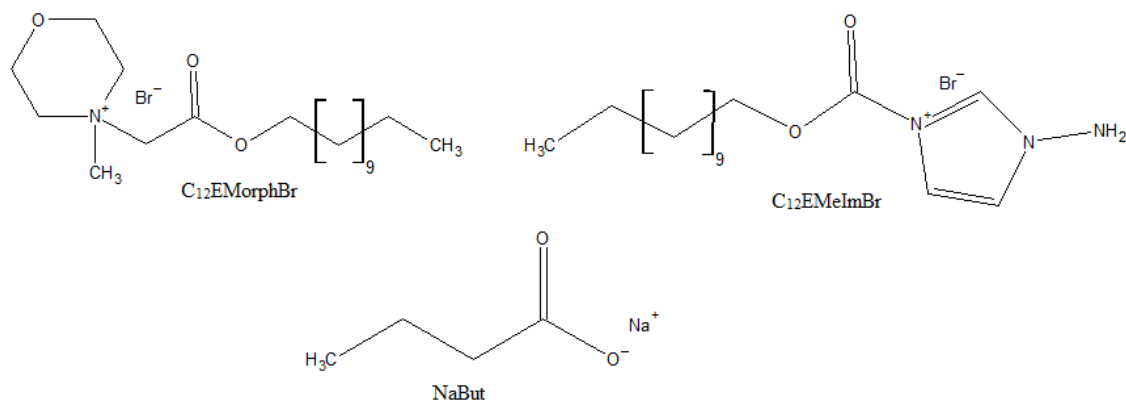
Stagnoli a kol. studovali toxicitu kataniontových vezikulárních systémů AOT-BHD (bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát benzyl-n-hexadecyldimethylamonium), (Obrázek 19). Vezikuly byly tvořeny z ekvimolární směsi Na-AOT (1,4-bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný) a BHDC (benzyl-n-hexadecyldimethylamoniumchlorid). Jejich stabilita v kyselém prostředí byla měřena pomocí metod DLS a ELS a následně byla hodnocena jejich toxicita, a to jak pomocí testů *in vitro* (test hemolýzy, test trypanové modři v leukocytech a MTT test ve fibroblastech) a *in vivo* testů (Lethal dose 50, studium enzymatické aktivity a statistická analýza). Testy *in vivo* byly prováděny na myších. Pouze dávka pod 0,05 mg/ml měla dostatečně nízkou toxicitu a byla označena za biokompatibilní. Dávky vyšší než 2 mg/ml způsobily sníženou rezistenci červených krvinek a dávky 118,70 mg/kg způsobily 50% úmrtnost pokusných zvířat. Podle výsledků studie jsou pro orální podání léků vhodné pouze vezikulární systémy při nejnižších koncentracích (pod 0,05 mg/ml) [51].



Obrázek 19: struktura AOT-BHD [51]

Jain a kol. zkoumali možnost zlepšení rozpustnosti a stability kurkuminu ve vodě jeho uzavřením do micely nebo vezikuly. Tímto způsobem by mohl být kurkumin v biologickém prostředí ochráněn před působením inaktivujících enzymů. Jako nosič pro kurkumin byla zvolena kataniontová vezikula. Vezikuly byly zkoumány pomocí měření FRET, SANS (ang. small-angle neutron scattering), DLS a ELS. Na tvorbu vezikul byly použity dvě sady roztoků, první obsahovala $C_{12}EMorphBr$ (4-methyl-4-(2-(dodecyloxykarbonylmethyl)morfolin-4-ium bromid) a druhá sada obsahovala $C_{12}EMeImBr$ (3-methyl-1-(dodecyloxykarbonylmethyl)imidazolium bromid), do obou roztoků byl přidán NaBut (butyrát sodný). Struktura použitých látek je zobrazena na obrázku 20. Jako fluorescenční barvivo byl použit pyren a methylonranž. Z provedených měření bylo zjištěno, že rozpustnost kurkuminu po uzavření do kataniontové vezikuly byla zvýšena z 0,0006 mg/ml

na 0,80 mg/ml. Dále bylo zjištěno, že uzavření kurkuminu do vezikuly zlepšuje jeho řízené uvolňování, degradovatelnost, biologickou dostupnost transdermálním podáním a jeho terapeutickou účinnost [52].



Obrázek 20: struktura C₁₂EMorphBr, C₁₂EMeImBr a NaBut [52]

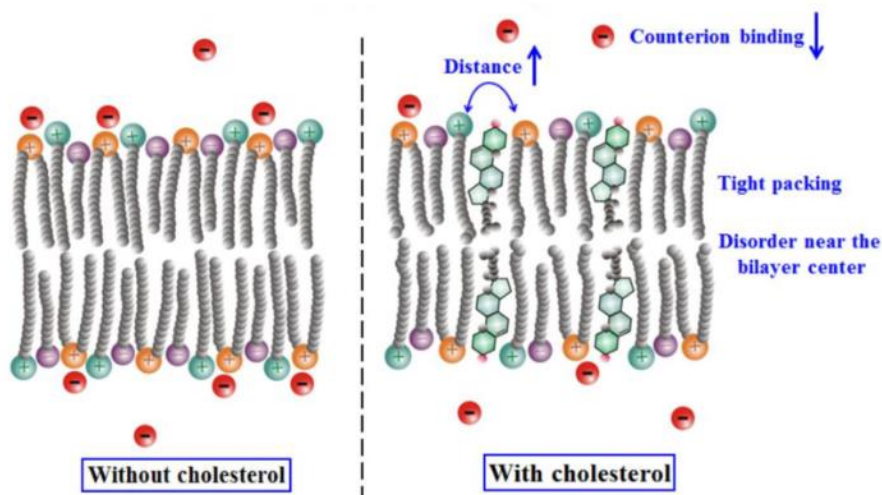
Dhawan a kol. studovali širokou škálu povrchově aktivních látek, které tvořily micely, vezikuly nebo gelovité struktury a zkoušeli do nich enkapsulovat léčiva s různými chemicko-fyzikálními vlastnostmi. Mezi zkoumané struktury patřila např. vezikula tvořená SDS a CTAB. Na charakterizaci vezikul byly použity mikroskopické techniky (Cryo-TEM, Cryo-SEM, Field Emission SEM, Field Emission TEM), techniky založené na rozptylu světla (DLS, SANS, SAXS) a fluorescenční spektroskopické techniky. Bylo zjištěno, že kataniontové vezikuly nabízejí alternativu ke kationtovým liposomům, mají vyšší stabilitu, ale nižší účinnost enkapsulace. Autoři došli k závěru, že kataniontové vezikuly mají velký potenciál v genové terapii a cílené distribuci léčiv [53].

Wang a kol. se zaměřili na studium interakce kataniontové vezikuly tvořené SDS a CTAB s trojblokovým kopolymerem P123 (Poly(oxyethylen-b-oxypropylen-b-oxyethylen)) za účelem zvýšení stability vezikulárního systému. Byly použity metody TEM (Transmisní elektronová mikroskopie), SANS a SANX (ang. Small-angle X-ray scattering). Studie prokázala, že smíchání tenzidu SDS a CTAB vede ke tvorbě jednolamelární vezikuly o tloušťce 32 Å (10⁻¹⁰ m). Po přidání kopolymeru se velikost zvětšila na 34 Å. Zastoupení SDS a CTAB ve vezikule bylo v poměru 3:4. Přidání kopolymeru dodalo vezikule lepší strukturní vlastnosti a stabilitu. Autoři uvádí, že studovaný vezikulární systém nemusí být vhodný pro distribuci léčiv v organismu kvůli vysoké cytotoxicitě [54].

3.2 Studium vlivu přídatku cholesterolu na stabilitu kataniontových vezikul

Kuo a kol. zkoušeli přidat cholesterol jako stabilizační prvek ke kataniontové vezikule tvořené povrchově aktivními látkami SDS, CTAB a DODAC. K vezikule byly přidány různé koncentrace cholesterolu a následně byly zkoumány změny ve fyzikální stabilitě kataniontových vezikul. Ke studiu vezikul byly použity metody DLS, ELS a spektroskopická metoda FTIR (ang. Fourier-transform infrared spectroscopy). Měření prokázalo, že začleněním cholesterolu do struktury vezikuly došlo ke zvýšení její mechanické pevnosti a stability. Cholesterol prodloužil vzdálenost mezi stejně nabitými skupinami a maximalizoval kontakt

uhlovodíkových řetězců (Obrázek 21). Nejstabilnější vezikuly bylo dosaženo přidáním 43 molárních % cholesterolu [55].



Obrázek 21: změna ve struktuře kataniontové vezikuly po přidání cholesterolu [55]

Vysvětlivky: with/without cholesterol – s/bez cholesterolem/u; distance – vzdálenost; counterion binding – vazba protiiontů; tight packing – těsné balení; disorder near the bilayer center – neuspořádanost v blízkosti dvouvrstvého centra

3.3 Studium interakce kataniontových vezikul s hyaluronanem

Havlíková a kol. se zabývali studiem interakce mezi hyaluronanem a kataniontovým vezikulárním systémem. Kataniontové vezikuly byly tvořeny kladně nabitým jednořetězcovým tenzidem hexadecyltrimethylamonium bromidem, záporně nabitým jednořetězcovým tenzidem dodecylsulfátem sodným, dvouřetězcovým kladně nabitým tenzidem dimethyldioktadecylamonium chloridem a cholesterolem. Pro výzkum byly použity čtyři molekulové hmotnosti hyaluronanu (16, 418, 750 a 1670 kDa) a měření byla prováděna metodami DLS, ELS, HR-US (ang. High resolution ultrasonic spectroscopy) a ITC (ang. Isothermal titration calorimetry). Všechny metody potvrdily interakci mezi vezikulami a hyaluronanem. Při zvyšování přídatku hyaluronanu se začaly tvořit agregáty, které se při ještě větších přídatcích rozpadly důsledkem zvýšené elektrostatické aktivity. S postupným přidáváním polymeru k vezikulám se zvětšovala velikost částic a klesala hodnota zeta potenciálu. Interakce měla charakter exotermické reakce. Práce prokázala, že hyaluronan dokáže vezikulární systém stabilizovat i destabilizovat, a to v závislosti na přidaném množství. Nejstabilnější systémů bylo dosaženo s molekulovou hmotností hyaluronanu mezi 400 až 800 kDa [56].

Holínková a kol. studovali interakce kationtových micel s hyaluronanem pomocí měření FRET. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen (donor) a fluorescein (akceptor). Autoři zkoušeli vytvořit dva micelární systémy, první z CTAB a druhý ze Septonexu. Byla měřena ustálená fluorescence, časově rozlišená fluorescence a anizotropie. Bylo zjištěno, že u obou micelárních systémů došlo k interakci s hyaluronanem. Micely vytvořené Septonexem vykazovaly nižší vazebné hodnoty, kvůli méně vhodné orientaci donoru a akceptoru v roztoku. Dále bylo na základě měření zjištěno, že hyaluronan tvoří kolem micel strukturu podobnou perlovému náhrdelníku [57].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro splnění cílů práce bylo potřeba připravit vzorky studovaných vezikulárních systémů použitím níže uvedených chemikálií. K charakterizaci připravených vezikulárních systémů byly použity níže vyjmenované přístroje.

4.1 Chemikálie

Tenzidy:

- hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB)
CAS: 57-09-0; Sigma Aldrich; čistota: >98 %; č. šarže: SLCH0757
- Dodecylsírán sodný (SDS)
CAS: 151-21-3; Sigma Aldrich; čistota: >99 %; č. šarže: STBJ0633
- Dimethyl-di-n-octadecylamonium (DODAC)
CAS: 107-64-2; Alfa Aesar; čistota: $\geq 97,0$ %; č. šarže: 10147338

Polymery:

- Hyaluronan
FHA 300 Sz CSP; TdB Labs. Švédsko; č. šarže: 20799
FHA 900 Sz CSP; TdB Labs. Švédsko; č. šarže: 20793

Stabilizační prvky:

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

Fluorofory:

- Perylen
CAS: 198-55-0; Fluka; čistota: >99 %; č. šarže: 1293053
- Fluorescein
CAS: 518-47-8; Sigma Aldrich; čistota: neuvedeno; č. šarže: BCCD3001
- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)
CAS: 1720-32-7; Fluka; čistota: >98 %; č. šarže: 1054132

Rozpouštědla:

- Chloroform
CAS: 602-006-00-4; Penta s.r.o.; čistota: $\geq 99,8$ %; č. šarže: 2107210716
- Aceton
CAS: 602-006-00-4; Lach-Ner s.r.o.; č. šarže: 606-001-00-8
- Deionizovaná voda
Milipore, Purelab: ELGA

4.2 Přístroje

- Spektrofluorimetr FluoroCube, HORIBA
- Fluorescenční spektrofotometr FS5, Edinburgh Instruments
- Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments
- Analytické váhy PIONEER, OHAUS
- Vortex MS2 Minishaker, IKA
- Ultrazvukový Sonifikátor SONOPLUS, BANDELIN
- Sušárna Venticell, Brněnská Medicínská Technika a.s.

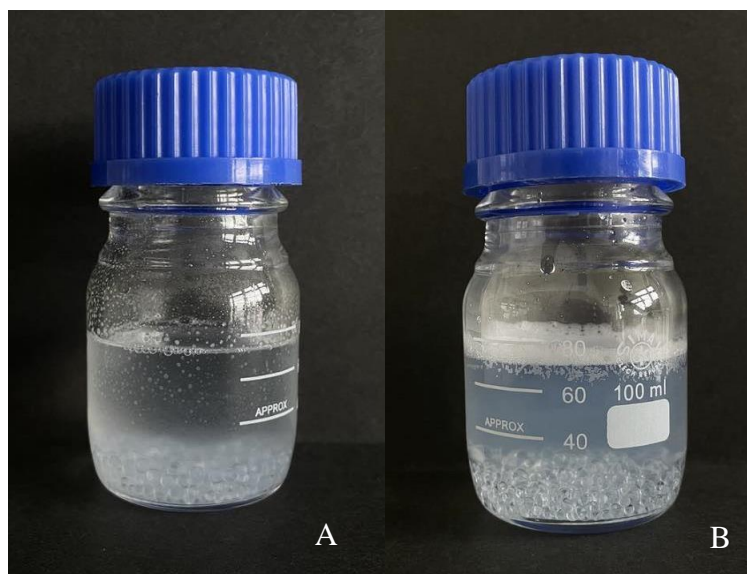
4.3 Příprava prášku IPA

20 mM roztok CTAB byl připraven rozpuštěním adekvátního množství tenzidu v 500 ml deionizované vody. Obdobným způsobem byl připraven roztok tenzidu SDS tak, aby výsledná koncentrace byla stejná jako u CTAB. Oba roztoky se ponechaly přes noc míchat. Následující den byly roztoky smíchány v poměru 1:1 a nechaly se míchat do dalšího dne při teplotě 30 °C. Další den byl roztok zfiltrován při sníženém tlaku za použití Büchnerovy nálevky opatřené speciálním filtračním papírem. Takto připravený prášek byl vysušen v sušárně při 50 °C po dobu 3 až 5 dní. Výsledný IPA prášek byl uskladněn ve vialce.

4.4 Příprava vezikulárních systémů

Do čisté reagenční láhve (Pyrex) bylo napipetováno takové množství roztoku prášku IPA v chloroformu, aby při pozdější rehydrataci 60 ml deionizované vody, byla výsledná koncentrace IPA 2 mM.

Dále byl připraven roztok DODAC v chloroformu tak, aby měl stejnou koncentraci jako roztok IPA. K předem naváženému odpovídajícímu množství cholesterolu byly pipetovány roztoky IPA a DODAC v poměru 9:1. Obsah cholesterolu v celkovém objemu činil 43 molárních %. Po důkladném promíchání na vortexu byly do vzniklého roztoku přidány skleněné kuličky. Poté byl roztok i s kuličkami opět důkladně promíchán na vortexu tak, aby se kuličky roztokem obalily. Následně se nechal chloroform do druhého dne ze směsi odpařit za občasného míchání, aby se kuličky neslepily k sobě. Druhý den bylo možné pozorovat, že se chloroform odpařil a kuličky byly potaženy tenkým filmem. Ke kuličkám bylo přidáno 60 ml deionizované vody. Roztok byl zvortexován a sonifikován tyčovým dispergátorem až po dosažení energie 25 kJ při 50 % amplitudě. Před sonifikací byl roztok zakalený, po sonifikaci bylo možné pozorovat čirý roztok (Obrázek 22).



Obrázek 22: vezikulární roztok před sonifikací (A) a po sonifikaci (B)

4.5 Příprava koncentrační řady vezikul s DPH a perylenem

Byl připraven zásobní roztok DPH v acetonu a zásobní roztok perylenu v acetonu. Roztok DPH byl pipetován k vezikulám v takovém množství, aby vznikly roztoky v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-5}$ po $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Stejným způsobem byly připraveny vzorky s perylenem. Pro roztok DPH bylo připraveno další koncentrační rozmezí od $2,5 \cdot 10^{-5}$ po $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l a pro roztok perylenu od $7,5 \cdot 10^{-6}$ po $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l (Tabulka 1).

Tabulka 1: koncentrace fluoroforů ve vezikulárním roztoku

fluorofor	c [mol/l]	fluorofor	c [mol/l]	fluorofor	c [mol/l]
DPH/perylen	$1,0 \cdot 10^{-5}$	DPH	$2,5 \cdot 10^{-5}$	perylene	$7,5 \cdot 10^{-6}$
	$2,5 \cdot 10^{-5}$		$3,0 \cdot 10^{-5}$		$8,0 \cdot 10^{-6}$
	$5,0 \cdot 10^{-5}$		$3,5 \cdot 10^{-5}$		$8,5 \cdot 10^{-6}$
	$7,5 \cdot 10^{-5}$		$4,0 \cdot 10^{-5}$		$9,0 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$		$4,5 \cdot 10^{-5}$		$9,5 \cdot 10^{-5}$
	-		$5,0 \cdot 10^{-5}$		$1,0 \cdot 10^{-5}$

4.6 Příprava koncentrační řady fluoresceinu

Na základě předchozího měření byla pro ty následující vybrána fluorescenční sonda DPH. Ke vzorkům obsahujícím vezikuly a DPH v koncentraci $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l byl následně pipetován fluorescein, tak aby jeho koncentrace odpovídala množství fluoresceinu obsaženého v roztoku značeného hyaluronanu (Tabulka 2).

Tabulka 2: koncentrace fluoresceinu ve vezikulárním roztoku, která odpovídá množství sondy ve značeném hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 a 900 kDa

c fluorescein [mol/l]	c fluorescein [mol/l]
$2,00 \cdot 10^{-8}$	$2,23 \cdot 10^{-8}$
$1,00 \cdot 10^{-7}$	$1,12 \cdot 10^{-7}$
$2,00 \cdot 10^{-7}$	$2,23 \cdot 10^{-7}$
$1,00 \cdot 10^{-6}$	$1,12 \cdot 10^{-6}$
$2,00 \cdot 10^{-6}$	$2,23 \cdot 10^{-6}$

4.7 Příprava značených vezikulárních systémů s polymerem

K vezikulárním systémům byl pipetován DPH $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l a byly vytvořeny dvě koncentrační řady. Do první koncentrační řady vzorků se přidal hyaluronan s molekulovou hmotností 300 kDa a do druhé koncentrační řady se přidal hyaluronan s molekulovou hmotností 900 kDa. Množství hyaluronanu bylo pipetováno tak, aby vzniklé koncentrační rozmezí hyaluronanu ve vzorcích bylo 1-100 mg/l. Celkově bylo připraveno 10 vzorků (Tabulka 3).

Tabulka 3: hmotnostní koncentrace hyaluronanu ve vezikulárním roztoku

c_m HA300 [mg/l]	c_m HA900 [mg/l]
1	1
5	5
10	10
50	50
100	100

4.8 Charakterizace vezikulárních systémů

Charakterizace vezikul byla provedena pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Teplota pro všechna měření byla kalibrována po dobu pěti vteřin na 25 °C. Velikost a polydisperzita připravených vezikulárních systémů byla měřena metodou dynamického rozptylu světla. Pro měření byla použita skleněná kyveta a každé měření bylo opakováno třikrát. Stabilita částic byla stanovena na základě naměřeného zeta potenciálu metodou elektroforetického rozptylu světla. Při měření zeta potenciálu byla do skleněné kyvety zavedena elektroda (dip cell) a měření bylo opakováno pětkrát.

4.9 Měření excitace a emise fluoroforů

Měření excitačních a emisních spekter zvolených fluoroforů bylo provedeno na fluorescenčním spektrofotometru FS5, který využívá jako zdroj záření xenonovou lampu. Byly měřeny připravené roztoky fluoroforů o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Tabulka 4: fluorofory a rozpouštědla

fluorofor	rozpouštědlo
DPH	aceton, vezikulární roztok
perlylen	aceton
fluorescein	deionizovaná voda

4.10 Měření FRET pomocí TCSPC

Všechny připravené vzorky byly měřeny na Spektrofluorimetru FluoroCube. Byla měřena doba života fluorescence fluoroforů, které mají ve FRET páru funkci donoru. Pro měření byl použit software DATA STATION. Pro měření doby života fluorescence perylenu byla použita dioda emitující světlo vlnové délky 369 nm a pro DPH dioda, která emituje světlo o vlnové délce 361 nm. Emisní monochromátor byl u obou fluoroforů nastaven na 440 nm. Vyhodnocení doby života fluorescence bylo provedeno pomocí softwaru DAS 6 analysis, který dokáže vyhodnotit jednu až pět dob života podle exponenciální funkce:

$$f(i) = A + B_1 \cdot e^{-\frac{i}{T_1}} + \dots + B_n \cdot e^{-\frac{i}{T_n}}, \quad (8)$$

kde i je čas, A je korekční parametr, B je předexponenciální funkce a T je příslušná doba života.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Doba života fluorescence byla stanovena metodou TCSPC. Výsledky měření TCSPC byly hodnoceny na základě parametru χ^2 a zobrazeného průběhu reziduí proložení. Použitelné byly výsledky s hodnotami χ^2 ležícími v intervalu 0,8 až 1,2. Nižší číslo značí dosazování vyššího počtu parametrů, než je potřeba. Vyšší číslo naopak naznačuje nedostatek parametrů.

Připravené koncentrační řady vezikul s DPH a perylenem byly charakterizovány měřením velikosti, polydisperzity a stability pomocí metod DLS a ELS. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v tabulkách níže a jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. U některých opakovaných měření software vyhodnotil jako dostatečně kvalitní pouze jedno z nich, proto u těchto výsledků není uvedena směrodatná odchylka. Vzorky, u kterých bylo na základě vizuálního pozorování zřejmé, že jsou nestabilní (viditelná agregace), nebyly dále měřeny, a proto v níže uvedených tabulkách chybí některá data výsledků měření.

V rámci předkládané práce byla měřena také doba života fluorescence vezikulárních systémů s DPH a fluoresceinem.

5.1 Optimalizace fluoroforů

Byla hledána co nejvyšší koncentrace fluoroforů, kterou bude možné do vezikulárního systému přidat tak, aby se fluorofor nezhášel a vykazoval jenom jednu dobu života fluorescence. Pokud by byla vybrána koncentrace, která vykazuje více dob života, tak by z ní nebylo následně možné určit, jestli dochází k rezonančnímu přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Byla také hledána koncentrace, při které bude vezikulární systém stabilní a bude mít monodisperzní charakter. Systém je stabilní, pokud je zeta potenciál vyšší než 30 mV nebo nižší než -30 mV. O systému lze prohlásit, že je monodisperzní, pokud index polydisperzity není větší než 0,3.

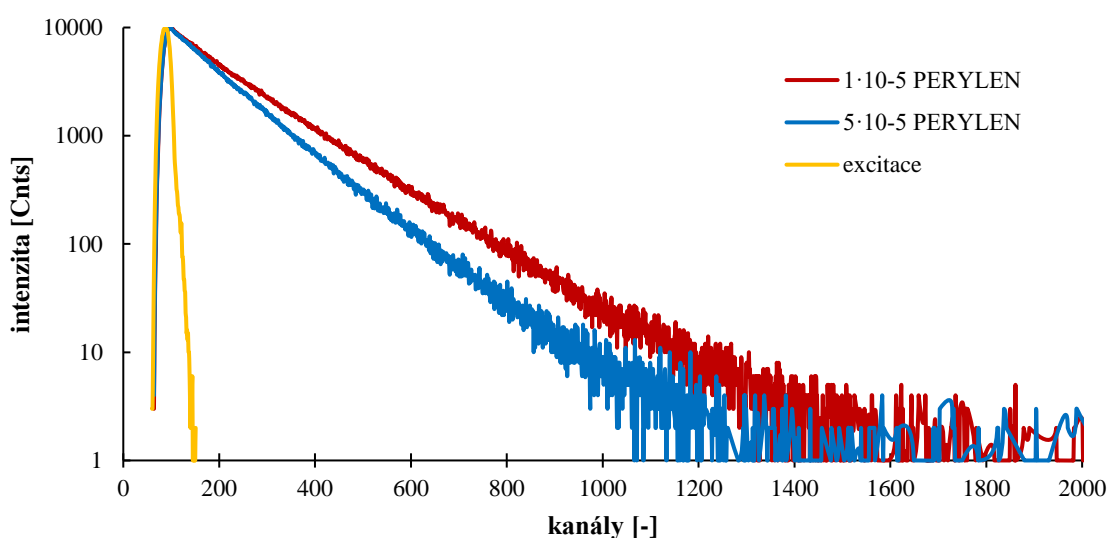
Vzorky byly měřeny v den, kdy byl fluorofor přidán do vezikulárního systému a den poté, aby se zjistilo, jestli má na stabilitu vezikulárních systémů a dobu života fluoroforu vliv čas. Doba života fluorescence byla vždy měřena u fluoroforů, které měly funkci donoru, tedy u perylenu a DPH.

5.1.1 Perylen

Jako první fluorofor pro studium FRET byl zvolen perylen, protože mezi nejznámější donor-akceptorové páry patří perylen-fluorescein. Pro měření byly zvoleny koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Koncentrace $7,5 \cdot 10^{-5}$ a $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l nebyly měřeny, protože došlo k agregaci hned po přidání fluoroforu do vezikulárního systému. U měřených koncentrací nebyla nalezena jedna doba života, parametr χ^2 byl po proložení monoexponenciální funkcí příliš vysoký. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po proložení naměřených dat triexponenciální funkcí. Tyto výsledky však také nebylo možné brát za správné, protože procentuální zastoupení naměřených časů nebylo smysluplně rozloženo. Nejvíce měl být zastoupen čas v jednotkách nanosekund, který odpovídá nezhasenému stavu perylenu. Také u koncentrace $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l bylo pro časy τ_2 a τ_3 vyhodnoceno nulové procentuální zastoupení. Z toho lze usoudit, že software nedokázal data správně vyhodnotit a nedá se správnost dat určovat pouze podle hodnoty χ^2 . Na základě měření, které byly provedeny první den nebylo možné vybrat vhodnou koncentraci. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 5. Byl sestaven graf zobrazující rozdíl zhasení u nejnižší a nejvyšší měřené koncentrace (Obrázek 23).

Tabulka 5: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 měřené první den

c [mol/l]	exp. [-]	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]	τ_3 [s]	A_3 [%]	χ^2 [-]
$1 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$7,08 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	4,6480
	biexp.	$7,99 \cdot 10^{-9}$	94,62	$1,87 \cdot 10^{-10}$	5,38	-	-	1,5736
	triexp.	$4,35 \cdot 10^{-12}$	99,90	$8,52 \cdot 10^{-9}$	0,08	$4,24 \cdot 10^{-9}$	0,01	0,9613
$2,5 \cdot 10^{-5}$	biexp.	$7,68 \cdot 10^{-9}$	49,66	$1,50 \cdot 10^{-11}$	50,34	-	-	1,4140
$5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$6,15 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,2635
	biexp.	$4,68 \cdot 10^{-12}$	99,83	$6,27 \cdot 10^{-9}$	0,17	-	-	1,3796
	triexp.	$2,97 \cdot 10^{-12}$	100,00	$5,19 \cdot 10^{-9}$	0,00	$7,63 \cdot 10^{-9}$	0,00	0,8947

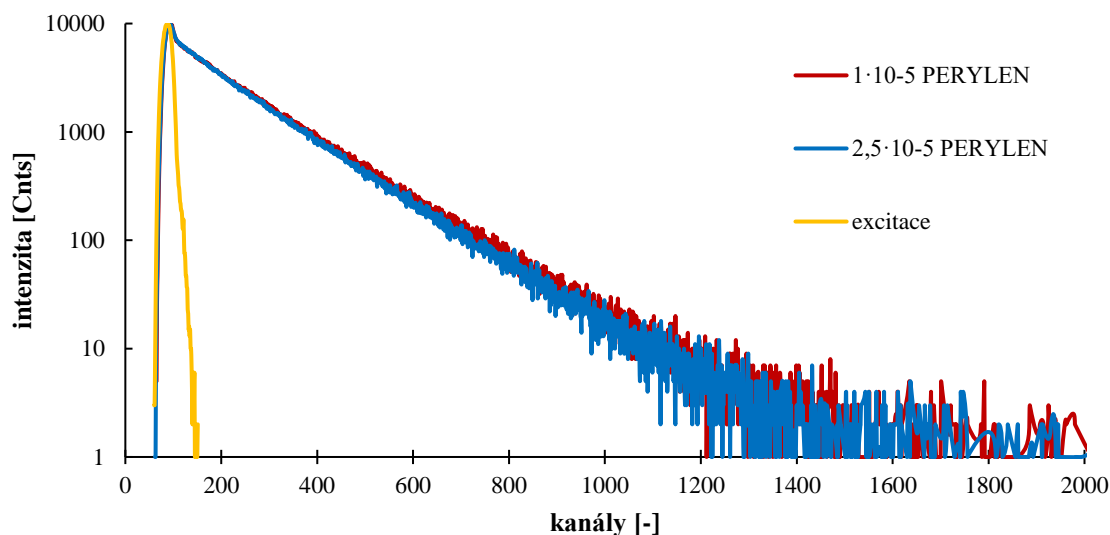


Obrázek 23: vyhasínací křivka pro perylen o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Další den byla naměřená data proložena biexponenciální funkcí, protože pro monoexponenciální neměl systém dostatek naměřených hodnot. Zastoupení dob života u obou koncentrací bylo 100:0 a u koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l nebyla nalezena ani hodnota odpovídající době života perylenu. Některé výsledky byly softwarem vyhodnoceny nesprávně, proto byla zafixována hodnota 8,16 ns, která odpovídá době života perylenu. Po zafixování doby života byla správnost vypočítaných dat na základě hodnoty χ^2 stále nevyhovující (Tabulka 6). Dá se tedy předpokládat, že perylen při zvolených koncentracích vykazuje více než dvě doby života. Všechny zkoumané koncentrace byly pro použití na měření rezonančního přenosu energie, kde by byl perylen v roli donoru, příliš vysoké. Rozdíl zhášení u nejnižší a nejvyšší měřené koncentrace zobrazuje graf na obrázku 24.

Tabulka 6: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 měřené druhý den

c [mol/l]	exponenciála [-]	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]	χ^2 [-]
$1 \cdot 10^{-5}$	biexp.	$2,96 \cdot 10^{-12}$	100,00	$3,16 \cdot 10^{-2}$	0,00	1,5189
	biexp. fixed	$8,16 \cdot 10^{-9}$	54,86	$1,78 \cdot 10^{-11}$	45,14	1,5275
$2,5 \cdot 10^{-5}$	biexp.	$3,25 \cdot 10^{-12}$	100,00	$7,80 \cdot 10^{-9}$	0,00	1,1321
	biexp. fixed	$8,16 \cdot 10^{-10}$	83,95	$1,78 \cdot 10^{-12}$	16,05	2,2350



Obrázek 24: vyhasínací křivka pro perylen o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Perylen nebyl vhodný fluorofor ani na základě měření polydisperzity, protože při všech měřených koncentracích byl vezikulární systém s perylenem polydisperzní. Polydisperzita systému na druhý den ještě vzrostla (Tabulka 7). Přidávky perylenu měly na vezikulární systém destabilizační účinek.

Tabulka 7: měření polydisperzity (PDI), velikosti (d) a zeta potenciálu (ZP) částic

	c [mol/l]	PDI [-]	d [nm]	ZP [mV]	
vezikuly	-	$0,396 \pm 0,007$	98 ± 1	$68,7 \pm 2,3$	
	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,390 \pm 0,003$	118 ± 1	$44,6 \pm 3,7$	
	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,360 \pm 0,042$	214 ± 43	$34,1 \pm 1,2$	
perylene	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$0,586 \pm 0,339$	554 ± 22	$21,2 \pm 0,6$	
	2. den	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,454 \pm 0,064$	118 ± 6	$46,0 \pm 4,3$
		$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,382 \pm 0,071$	211 ± 2	$36,8 \pm 2,6$

Protože se měřením prokázalo, že vezikulární systém potřebuje čas na ustálení stability po přidání donoru, tak další měření s perylenem bylo provedeno pouze den po jeho přidání k vezikulám. Perylen byl dále přidáván pouze v nižších koncentracích, protože z původní koncentrační řady nebylo možné vybrat vhodné rozmezí. I tyto nižší koncentrace ovšem nebyly pro další měření vhodné, protože všechny stále vykazovaly více než jednu dobu života fluorescence. Připravovat koncentrační řadu o ještě nižších koncentracích by už nebylo vhodné,

protože by to snižovalo pravděpodobnost vytvoření páru donoru s akceptorem. Na základě těchto výsledků (Tabulka 8) se nadále s perylenem v měření už nepokračovalo.

Tabulka 8: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2

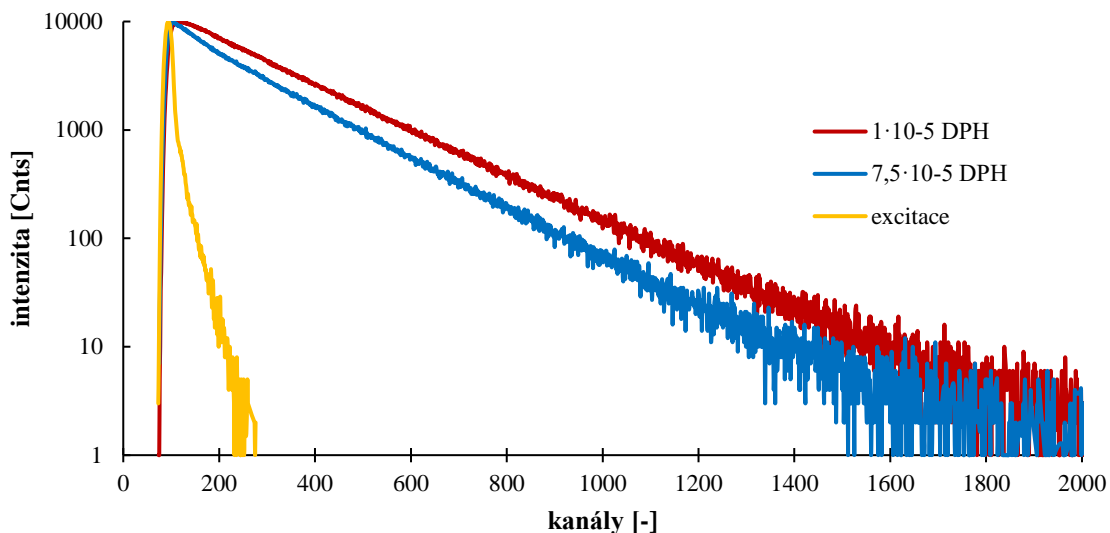
c [mol/l]	exp. [-]	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]	τ_3 [s]	A_3 [%]	χ^2 [-]
$7,5 \cdot 10^{-6}$	monoexp.	$7,88 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,5670
	biexp.	$4,38 \cdot 10^{-9}$	95,08	$1,49 \cdot 10^{-10}$	4,92	-	-	1,3593
	triexp.	$6,06 \cdot 10^{-12}$	97,39	$8,32 \cdot 10^{-9}$	2,44	$3,47 \cdot 10^{-9}$	0,18	1,0252
$8,0 \cdot 10^{-6}$	monoexp.	$7,90 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,6818
	biexp.	$8,04 \cdot 10^{-9}$	94,40	$1,04 \cdot 10^{-10}$	5,60	-	-	1,2700
	triexp.	$2,36 \cdot 10^{-12}$	100,00	$8,39 \cdot 10^{-9}$	0,00	$3,92 \cdot 10^{-9}$	0,00	0,9249
$8,5 \cdot 10^{-6}$	monoexp.	$7,88 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,4644
	biexp.	$8,03 \cdot 10^{-9}$	95,60	$2,39 \cdot 10^{-10}$	4,40	-	-	1,2758
	triexp.	$3,95 \cdot 10^{-12}$	99,97	$8,27 \cdot 10^{-9}$	0,03	$3,13 \cdot 10^{-9}$	0,00	0,9746
$9,0 \cdot 10^{-6}$	monoexp.	$7,84 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,9180
	biexp.	$8,00 \cdot 10^{-9}$	94,65	$1,58 \cdot 10^{-10}$	5,35	-	-	1,3332
	triexp.	$8,28 \cdot 10^{-9}$	82,09	$2,88 \cdot 10^{-11}$	13,03	$3,37 \cdot 10^{-9}$	5,88	0,9990
$9,5 \cdot 10^{-6}$	monoexp.	$7,82 \cdot 10^{-9}$	100,00	-	-	-	-	3,8639
	biexp.	$7,98 \cdot 10^{-9}$	94,68	$1,56 \cdot 10^{-10}$	5,32	-	-	1,2826
	triexp.	$4,29 \cdot 10^{-12}$	99,91	$8,28 \cdot 10^{-9}$	0,08	$3,58 \cdot 10^{-9}$	0,01	0,9672

5.1.2 DPH

Jako druhý fluorofor pro funkci donoru byl zvolen DPH. Měřená doba života DPH byla delší, než by se dalo očekávat na základě teoretických předpokladů a to proto, že u DPH je přechod z energetické hladiny S_1 do základní hladiny S_0 symetricky zakázaný [58]. První den jedné době života fluorescence DPH na základě hodnoty χ^2 odpovídala koncentrace $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Doby života fluorescence a jejich amplitudy jsou zaznamenány v tabulce 9. Rozdíl zhášení u nejnižší a nejvyšší měřené koncentrace zobrazuje graf na obrázku 25.

Tabulka 9: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 měřené první den

c [mol/l]	exponenciála [-]	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]	χ^2 [-]
$1,0 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,11 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,3020
	biexp.	$1,13 \cdot 10^{-8}$	95,24	$5,61 \cdot 10^{-9}$	4,76	1,1294
$2,5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,08 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,1799
	biexp.	$1,12 \cdot 10^{-8}$	94,46	$5,80 \cdot 10^{-9}$	5,54	1,0022
$5,0 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,02 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,5363
	biexp.	$1,05 \cdot 10^{-8}$	94,16	$4,28 \cdot 10^{-9}$	5,84	1,0214
$7,5 \cdot 10^{-5}$	biexp.	$9,98 \cdot 10^{-9}$	91,14	$1,60 \cdot 10^{-9}$	8,86	1,1505

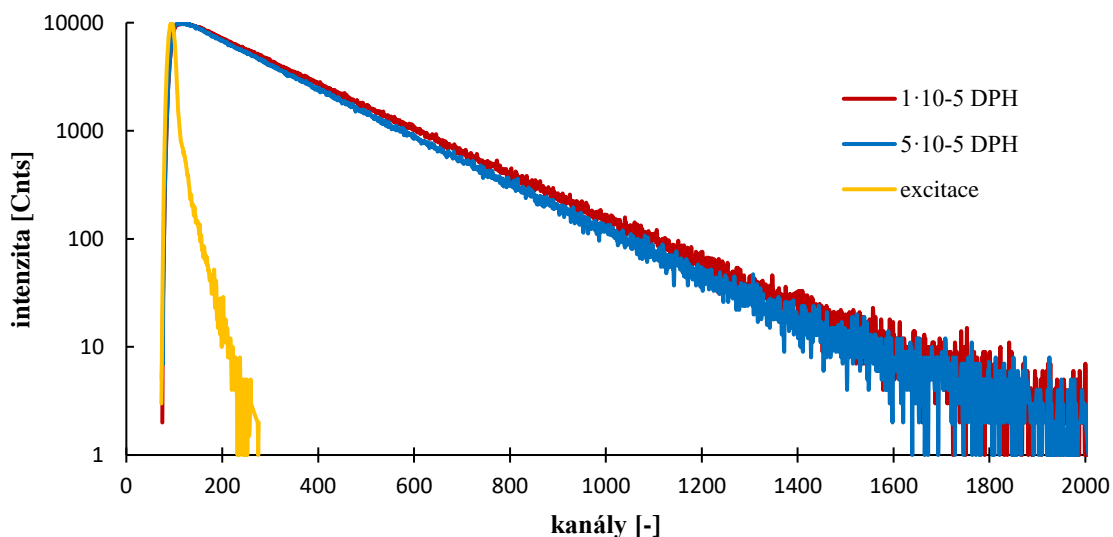


Obrázek 25: vyhasínací křivka pro DPH o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Další den vzorky s koncentracemi $7,5 \cdot 10^{-5}$ a $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l nebyly měřeny, protože byla ve vzorku pozorována agregace. Měření na druhý den prokázalo lepší výsledky po proložení monoexponenciální funkcí. Na základě hodnot χ^2 (Tabulka 10) bylo rozhodnuto, že maximální koncentrace DPH, která vykazuje jednu dobu života fluorescence, bude hledána mezi koncentracemi $2,5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Rozdíl zhášení u nejnižší a nejvyšší měřené koncentrace zobrazuje graf na obrázku 26.

Tabulka 10: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 měřené druhý den

c [mol/l]	exponenciála [-]	τ_1 [s]	A_1 [%]	τ_2 [s]	A_2 [%]	χ^2 [-]
$1 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,13 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,1511
$2,5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,11 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,1780
$5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,06 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,2917
	biexp.	$1,08 \cdot 10^{-8}$	94,71	$5,36 \cdot 10^{-9}$	5,29	1,0879



Obrázek 26: vyhasínací křivka pro DPH o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

První den monodisperzní hodnoty vykazovaly koncentrace $2,5 \cdot 10^{-5}$ – $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l a stabilní hodnoty zeta potenciálu byly naměřeny u koncentrací $1,0 \cdot 10^{-5}$ – $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Byly také měřeny vezikuly, které neobsahovaly DPH. Měření *PDI* druhý den vykazovalo u částic menší polydisperzitu. Hodnoty zeta potenciálu se výrazně nezměnily a koncentrace, které byly předchozí den měřeny v nestabilní oblasti, na druhý den agregovaly, čímž se potvrdila správnost měření z prvního dne. Měřením se potvrdilo, že nejvyšší možnou koncentrací DPH je vhodné hledat v rozmezí koncentrací $2,5 \cdot 10^{-5}$ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 11.

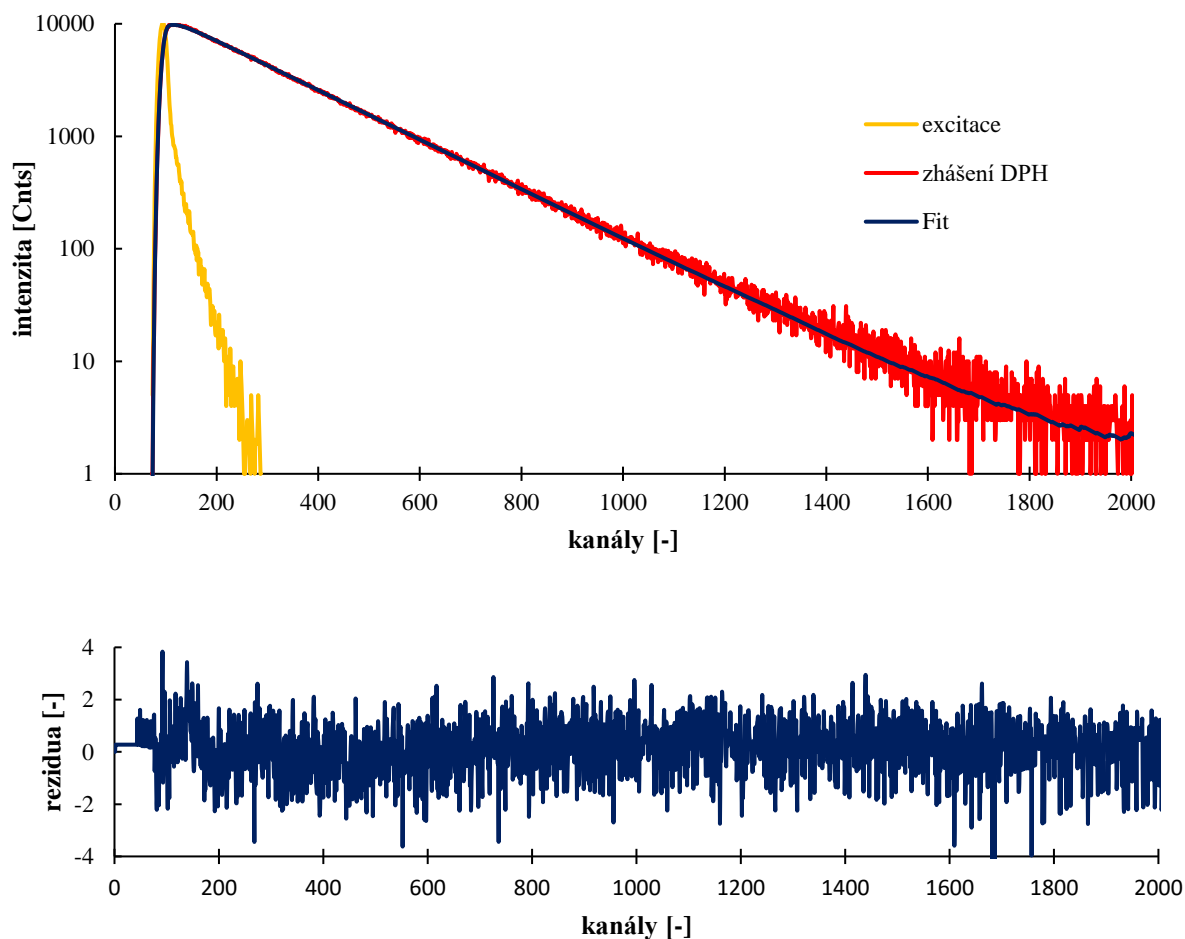
Tabulka 11: měření polydisperzity (*PDI*), velikosti (*d*) a zeta potenciálu (*ZP*) částic první den

vezikuly		<i>c</i> [mol/l]	<i>PDI</i> [-]	<i>d</i> [nm]	<i>ZP</i> [mV]
DPH	1. den	-	$0,396 \pm 0,007$	$98,4 \pm 1,2$	$68,7 \pm 2,3$
		$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,340 \pm 0,011$	$106,9 \pm 0,4$	$49,7 \pm 4,7$
		$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,257 \pm 0,014$	$114,3 \pm 0,8$	$41,3 \pm 2,5$
		$5,0 \cdot 10^{-5}$	$0,229 \pm 0,015$	$139,4 \pm 2,9$	$24,5 \pm 1,0$
		$7,5 \cdot 10^{-5}$	$0,235 \pm 0,015$	$194,2 \pm 3,0$	$14,0 \pm 0,4$
		$1,0 \cdot 10^{-4}$	$0,441 \pm 0,043$	$332,0 \pm 4,6$	$11,4 \pm 1,0$
	2. den	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,279 \pm 0,004$	$102,5 \pm 0,6$	$50,6 \pm 1,8$
		$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,245 \pm 0,009$	$116,5 \pm 0,3$	$40,3 \pm 2,0$
		$5,0 \cdot 10^{-5}$	$0,269 \pm 0,031$	$167,6 \pm 1,2$	$24,5 \pm 4,0$

Na základě předchozích výsledků, jsou dále uváděna pouze data, která byla měřena jeden den po přidání fluoroforu, který sloužil jako hydrofobní donor. Všechna předešlá měření dokázala, že DPH potřebuje delší dobu, aby se dostal do vezikulárního systému a došlo tak k ustálení změn ve stabilitách a velikostech vezikulárních systémů. Na základě měření doby života fluorescence se jako vhodné koncentrace jevíly $3 \cdot 10^{-5}$ a $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, u obou byla naměřená doba života odpovídající DPH a hodnota χ^2 byla téměř rovna jedné (Tabulka 12). Graf zobrazující zhášení u koncentrace $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ukazuje obrázek 27.

Tabulka 12: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (*A*) a χ^2

<i>c</i> [mol/l]	exponenciála [-]	τ_1 [s]	<i>A</i> ₁ [%]	τ_2 [s]	<i>A</i> ₂ [%]	χ^2 [-]
$2,5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,08 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,0985
$3,0 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,07 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,0668
$3,5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,07 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,0089
$4,0 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,06 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,0911
	biexp.	$1,08 \cdot 10^{-8}$	96,39	$5,43 \cdot 10^{-9}$	3,61	1,0002
$4,5 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,06 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,1506
	biexp.	$1,09 \cdot 10^{-8}$	95,54	$5,34 \cdot 10^{-9}$	4,46	1,0004
$5,0 \cdot 10^{-5}$	monoexp.	$1,05 \cdot 10^{-8}$	100,00	-	-	1,5181
	biexp.	$1,07 \cdot 10^{-8}$	97,64	$2,14 \cdot 10^{-9}$	2,36	1,0673



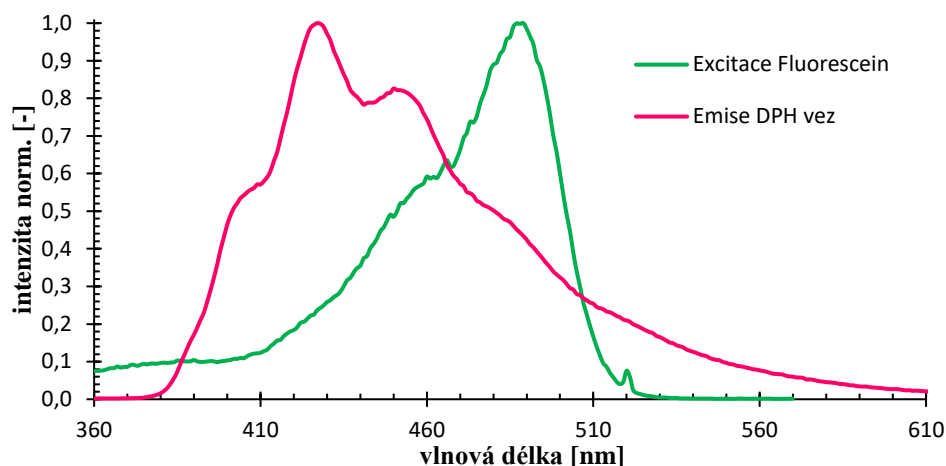
Obrázek 27: vyhasínací křivka pro DPH o koncentraci $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l a proložení exponenciální funkcí (Fit)

Měření polydisperzity a zeta potenciálu prokázaly, že z výše zvolených koncentrací byla nejvíce přijatelná koncentrace DPH $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Tato koncentrace splňovala podmínky monodisperzity i stability (Tabulka 13).

Tabulka 13: měření polydisperzity (PDI), velikosti (d) a zeta potenciálu (ZP) částic

	c [mol/l]	PDI [-]	d [nm]	ZP [mV]
DPH	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,25 \pm 0,02$	$106,3 \pm 1,7$	$39,3 \pm 1,5$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$0,24 \pm 0,01$	$116,2 \pm 0,4$	$31,4 \pm 1,3$
	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$0,28 \pm 0,02$	$121,8 \pm 0,9$	$30,2 \pm 1,3$
	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$0,25 \pm 0,01$	$124,6 \pm 2,3$	$26,1 \pm 2,7$
	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$0,26 \pm 0,02$	$135,1 \pm 0,3$	$23,0 \pm 0,4$
	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$0,42 \pm 0,04$	$179,9 \pm 1,2$	$22,8 \pm 0,9$

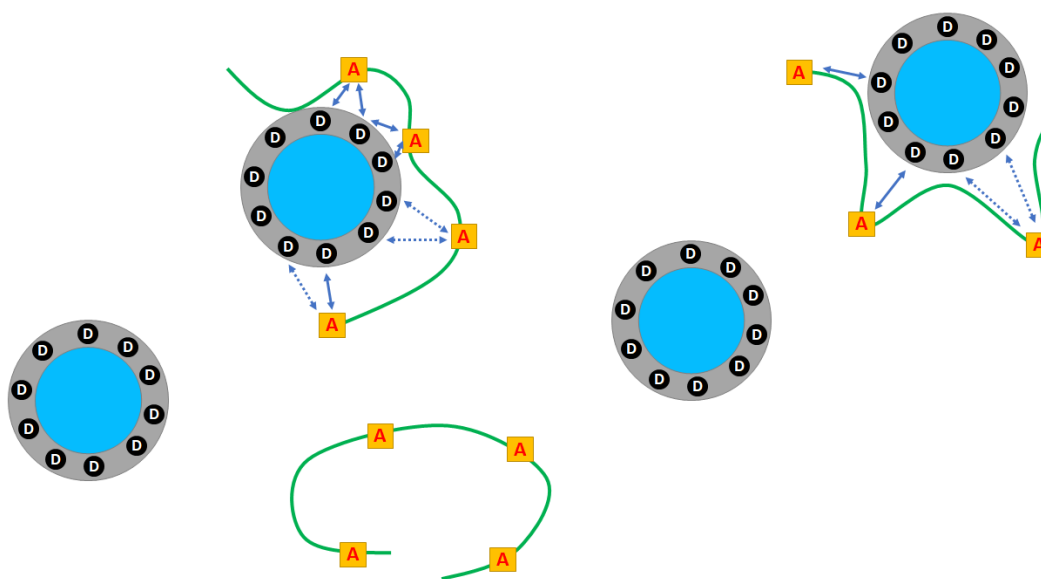
Dále bylo změřeno emisní spektrum DPH v micelárním prostředí a následně excitační spektrum fluoresceinu ve vodném prostředí, aby se potvrdilo, že se překrývá emisní spektrum donoru (DPH) a excitační spektrum akceptoru (fluorescein) a že budou splněny podmínky pro FRET. Obě provedená měření potvrdila, že se výše zmíněná spektra překrývají a k rezonančnímu přenosu energie může dojít (Obrázek 28).



Obrázek 28: překryv emisního spektra DPH ve vezikulárním prostředí a excitačního spektra fluoresceinu ve vodném prostředí

5.2 Interakce vezikul s hyaluronanem

Předpokládá se, že jednotlivé složky ve vezikulárním roztoku nemají rovnoměrnou distribuci. V roztoku se mohou vyskytovat samostatné vezikuly, vezikuly obsahující pouze donor, vezikuly obsahující donor s navázaným/i akceptorem/y a samotný značený polymer, jak je znázorněno na obrázku 29.



Obrázek 29: znázornění pravděpodobné distribuce částic v roztoku, D (donor ve vezikule), A (akceptor navázaný na polymer), plná šipka znázorňuje větší efektivitu přenosu energie než šipka tečkovaná

Ke zvolené koncentraci DPH $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l byl přidáván hyaluronan, který byl značený fluoresceinem. Naměřené hodnoty byly prokládány bi-, tri- a tetraexponenciální funkcí. Při proložení tetraexponenciální funkcí vycházely záporné hodnoty amplitud, proto byly tyto výsledky vyloučeny. U měření zhášení samotného DPH záporné amplitudy zaznamenány nebyly, proto bylo proložení tetraexponenciální funkcí zamítnuto jako vhodný matematický model. Nejlepší χ^2 vycházelo u proložení dat triexponenciální funkcí, proto byla zvolena jako vhodný matematický model. Tento model nejlépe popisuje průběh vyhasínací křivky.

Předpokládalo se největší zastoupení nezhášeného DPH, protože jeho koncentrace v roztoku byla vyšší než koncentrace fluoresceinu. Substitute fluoresceinu na polymeru byla nižší než 1 % (HA₃₀₀ - 0,8 %; HA₉₀₀ - 0,9 %). Interpretace dat byla postavena na předpokladu, že vždy bude existovat nenulová frakce nezhášeného DPH, a proto byla při vyhodnocení zafixována hodnota τ_1 odpovídající nezhášené době života fluorescence DPH.

Měřením bylo dokázáno, že DPH a fluorescein tvoří donor-akceptorový pár ve kterém dochází k rezonančnímu přenosu energie. Naměřená data potvrzují, že po přidání fluoresceinu do vezikulárního roztoku dochází ke zhášení DPH. Čas τ_1 patří nezhášenému DPH a ostatní časy jsou projev zhášení DPH fluoresceinem. DPH je hydrofobní molekula, která se v roztoku nachází v bezvodé části vezikuly. Fluorescein je navázaný na hyaluronanu, který se nachází ve vodném prostředí kolem vezikuly. Na základě interakce DPH a fluoresceinu můžeme potvrdit, že spolu interaguje i vezikula a hyaluronan. Naměřené hodnoty doby života fluorescence, amplitudy a χ^2 pro příslušné exponenciální funkce ukazují tabulky níže (Tabulka 14, Tabulka 15).

Tabulka 14: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 DPH ve vezikulárním prostředí s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 kDa (1–100 mg/ml)

c_m [mg/l]	exp.	$\tau_{1 \text{ fix}}$ [ns]	A_1 [%]	τ_2 [ns]	A_2 [%]	τ_3 [ns]	A_3 [%]	χ^2 [-]
1	biexp.	11,8	88,95	6,7	11,05	-	-	1,165
	triexp.	11,8	63,97	10,5	34,37	1,4	1,66	0,955
5	biexp.	11,8	89,16	6,4	10,84	-	-	1,180
	triexp.	11,8	61,35	10,6	36,75	1,5	1,91	0,943
10	biexp.	11,8	86,67	6,5	13,33	-	-	1,211
	triexp.	11,8	68,10	10,0	29,80	1,7	2,10	0,989
50	biexp.	11,8	68,70	6,0	31,30	-	-	2,152
	triexp.	11,8	55,94	8,1	40,00	1,2	4,06	1,096
100	biexp.	11,8	59,71	6,3	40,29	-	-	2,237
	triexp.	11,8	45,80	8,1	49,55	1,3	4,65	1,060

Tabulka 15: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 DPH ve vezikulárním prostředí s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 900 kDa (1–100 mg/ml)

c_m [mg/l]	exp.	$\tau_{1 \text{ fix}}$ [ns]	A_1 [%]	τ_2 [ns]	A_2 [%]	τ_3 [ns]	A_3 [%]	χ^2 [-]
1	biexp.	11,8	84,94	7,7	15,06	-	-	1,096
	triexp.	11,8	66,25	10,2	32,43	1,3	1,32	0,941
5	biexp.	11,8	85,76	7,2	14,24	-	-	1,123
	triexp.	11,8	71,73	9,8	26,88	1,1	1,40	0,91
10	biexp.	<i>Data nebyla k dispozici</i>						
	triexp.	11,8	70,76	9,3	27,44	1,4	1,80	0,984
50	biexp.	11,8	73,16	5,7	26,84	-	-	2,001
	triexp.	11,8	58,17	8,4	37,30	1,4	4,54	1,029
100	biexp.	11,8	54,64	6,2	45,36	-	-	2,852
	triexp.	11,8	39,86	8,0	54,49	1,3	5,65	1,226

Triexponenciální model nejlépe popisuje průběh zhášení fluorescence DPH, ale zhášených dob života fluorescence DPH by ve skutečnosti bylo více, než bylo určeno pomocí triexponenciální křivky. Podle fyzikálních předpokladů by mělo být více frakcí zhášené doby života fluorescence a více možných vzdáleností mezi donorem a akceptorem. Proto je pro výpočet efektivity rezonančního přenosu energie potřeba počítat s průměrnou hodnotou zhášených dob života fluorescence:

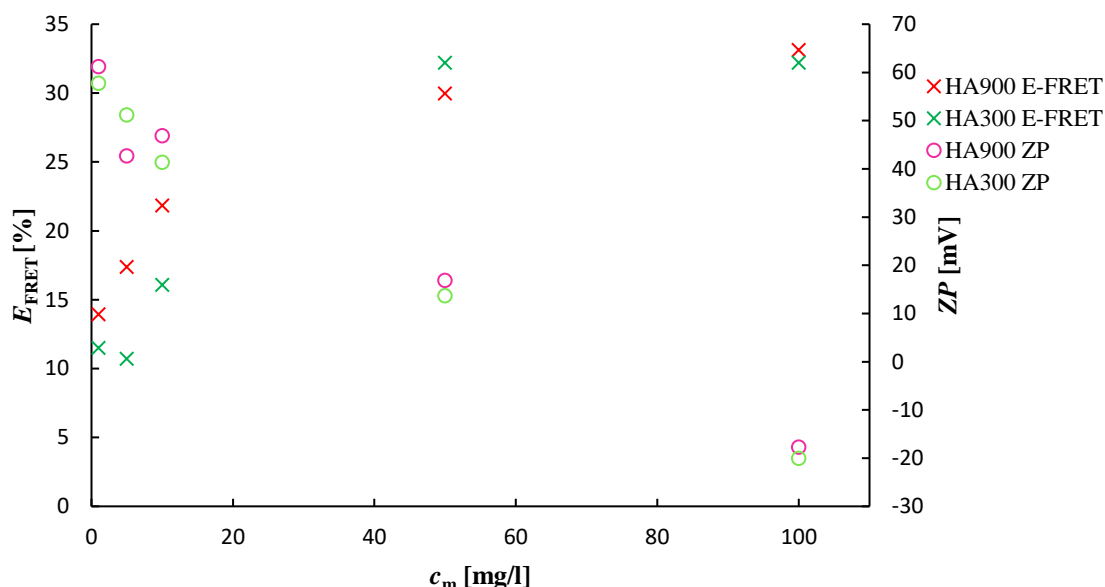
$$\tau_{AVG} = \frac{\sum(A_i \tau_i^2)}{\sum(A_i \tau_i)}, \quad (9)$$

kde A_i jsou amplitudy příslušných zhášených dob života a τ_i jsou zhášené doby života fluorescence DPH. Vypočtená hodnota byla dosazena do vzorce pro výpočet efektivity rezonančního přenosu energie:

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{AVG}}{\tau_d}, \quad (10)$$

kde τ_d je nezhášená doba života fluorescence DPH. Takto vypočtená efektivita zohledňuje distribuci částic a jejich vzájemné vzdálenosti. Není vhodné interpretovat efektivitu pro konkrétní vzdálenosti, protože je nelze stanovit.

Závislost vypočtené efektivity na přidané koncentraci hyaluronanu (300 a 900 kDa) znázorňuje graf na obrázku 30.



Obrázek 30: efektivita rezonančního přenosu energie a zeta potenciál pro vezikulární systém s DPH a hyaluronanem (300 a 900 kDa)

Měření byla prováděna při různých koncentracích polymeru, ale obecně bylo v roztoku vždy více vezikul než polymeru. Vezikuly se všemi přidavky hyaluronanu měly polydisperzní charakter, což nasvědčuje tomu, že některé vezikuly byly polymerem obaleny více než jiné nebo nebyly obaleny vůbec. Toto tvrzení dokládá obrázek v příloze 6. Se zvyšováním koncentrace hyaluronanu ve vzorcích postupně klesala hodnota zeta potenciálu až do nestabilní oblasti (Tabulka 16, Obrázek 30). Nestabilita těchto koncentrací byla potvrzena i vizuálním pozorováním. Z toho lze vyvodit, že hyaluronan má při vyšších koncentracích destabilizační účinky.

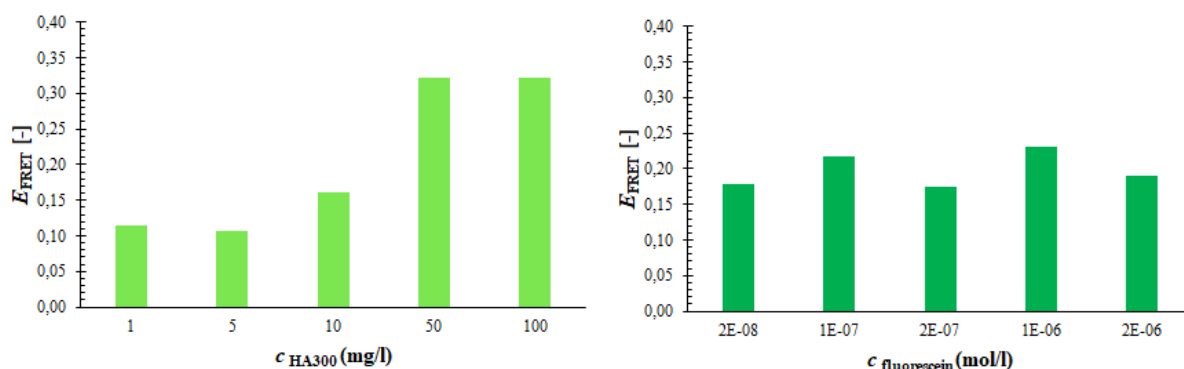
Tabulka 16: měření polydisperzity (PDI), velikosti (d) a zeta potenciálu (ZP) vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 a 900 kDa

	c_m [mg/l]	PDI [-]	d [nm]	ZP [mV]
vezikuly	-	$0,33 \pm 0,03$	91 ± 2	$65,7 \pm 4,9$
HA300	1	$0,37 \pm 0,01$	101 ± 1	$57,8 \pm 5,4$
	5	$0,36 \pm 0,01$	102 ± 2	$51,2 \pm 3,9$
	10	$0,39 \pm 0,01$	110 ± 2	$41,4 \pm 3,2$
	50	0,64	325	$13,7 \pm 1,6$
	100	$0,51 \pm 0,03$	289 ± 4	$-20 \pm 0,8$
	HA900	1	$0,35 \pm 0,01$	98 ± 1
5		$0,38 \pm 0,02$	104 ± 1	$42,7 \pm 2,9$
10		$0,34 \pm 0,01$	111 ± 2	$46,9 \pm 2,8$
50		$0,63 \pm 0,03$	211 ± 3	$16,9 \pm 1,5$
100		$0,60 \pm 0,10$	468 ± 12	$-17,7 \pm 0,2$

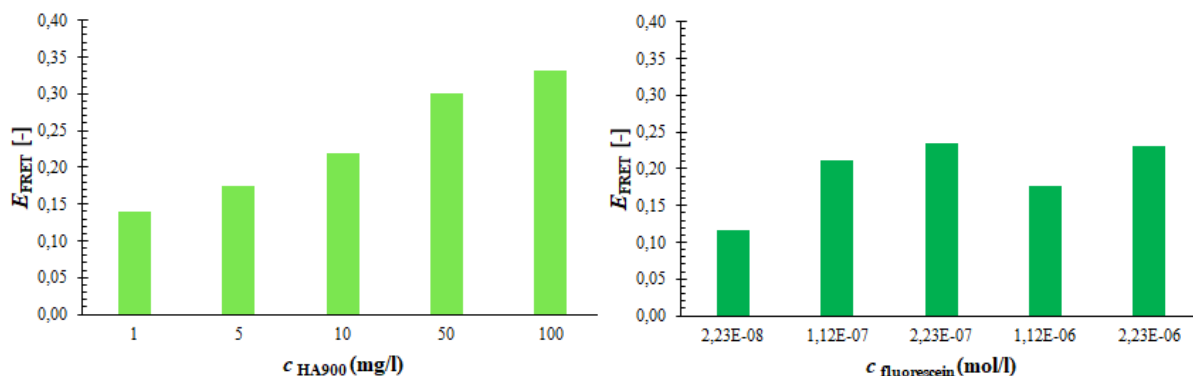
5.3 Porovnání interakce vezikul s fluoresceinem a značeným hyaluronanem

Byla měřena doba života fluorescence DPH ve vezikulách, ke kterým byl přidán dianion fluoresceinu. Koncentrace přidavku fluoresceinu byly voleny tak, aby odpovídaly množství fluoresceinu vázaného na hyaluronan. Z naměřených dat (Příloha 7, Příloha 8) byla vypočtena E_{FRET} postupem uvedeným výše.

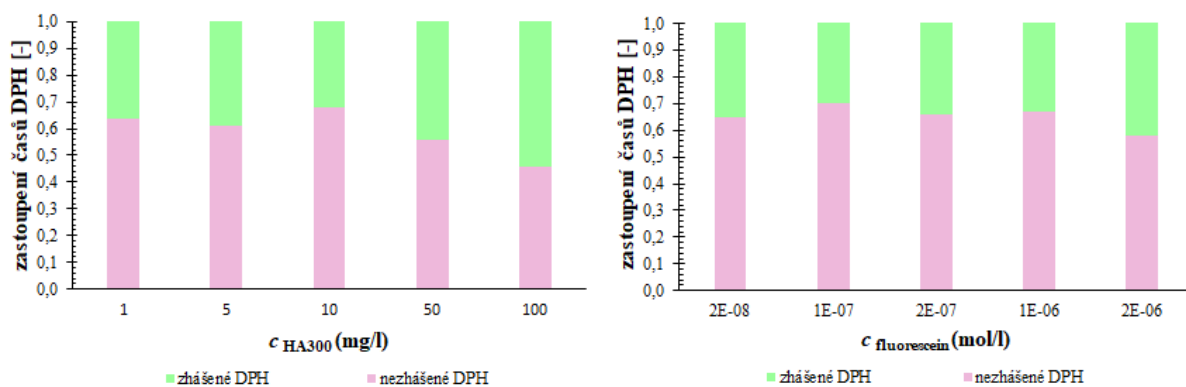
Pro porovnání interakce vezikul, ke kterým byl přidán značený hyaluronan a fluorescein byly výsledky vyneseny do histogramů (Obrázek 31, Obrázek 32). Hyaluronan s molekulovou hmotností 300 kDa interagoval s vezikulou podobně jako hyaluronan s molekulovou hmotností 900 kDa. U hyaluronanu se E_{FRET} s přidavky zvyšuje. Při přidání čistého fluoresceinu je zastoupení E_{FRET} spíše náhodné. Výsledky také ukázaly, že při měření hyaluronanu navázaného na polymeru došlo při vyšších koncentracích k výraznějšímu zastoupení zhaseného času DPH než při interakci s volným fluoresceinem (Obrázek 33, Obrázek 34). Lze tedy říci, že hyaluronan obaluje vezikulu a tím napomáhá lepšímu vytvoření donor-akceptorových párů DPH-fluorescein.



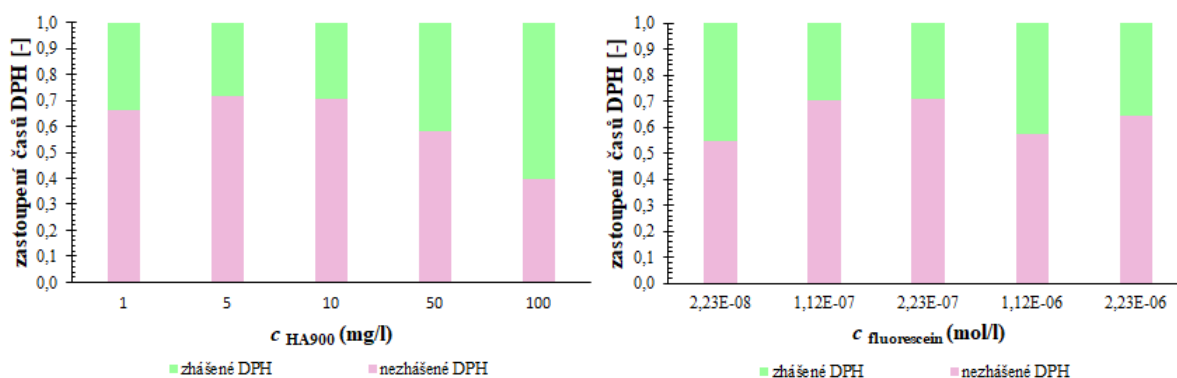
Obrázek 31: porovnání efektivity rezonančního přenosu energie u vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu značeného fluoresceinem s molekulovou hmotností 300 kDa a s přidavkem fluoresceinu



Obrázek 32: porovnání efektivity rezonančního přenosu energie u vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu značeného fluoresceinem s molekulovou hmotností 900 kDa a s přidavkem fluoresceinu



Obrázek 33: porovnání zhášení DPH u vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu značeného fluoresceinem s molekulovou hmotností 300 kDa a s přidavkem fluoresceinu



Obrázek 34: porovnání zhášení DPH u vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu značeného fluoresceinem s molekulovou hmotností 900 kDa a s přidavkem fluoresceinu

6 ZÁVĚR

Kataniontové vezikulární systémy se jeví jako vhodná alternativa pro podávání léčiv do lidského organismu, protože mají lepší fyzikálně-chemické vlastnosti než doposud používané fosfolipidové vezikuly. Nezbytnou podmínkou pro využití kataniontových vezikul je minimalizace jejich toxicity, čehož se dá dosáhnout obalením vezikuly biologicky odbouratelným polymerem, který bude s vezikulou interagovat. Důkaz vzájemné interakce vezikuly a polymeru měřením rezonančního přenosu energie byl jedním z cílů předkládané bakalářské práce. Studované kataniontové vezikuly byly tvořeny z tenzidů SDS, CTAD a DODAC, jako stabilizační prvek byl přidán cholesterol.

Pro studium vzájemné interakce musely být zvoleny vhodné donor-akceptorové páry. Na základě literární rešerše byly jako donor-akceptorové páry fluoroforů zvoleny DPH-fluorescein a perylen-fluorescein. Nejprve byla připravena koncentrační řada 2mM vezikulárního systému s přídatkem DPH o koncentracích $1 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Stejným postupem byly připraveny vzorky s perylenem. Měření pomocí metody TCSPC byly hledány koncentrace fluoroforů, které budou vykazovat pouze jednu dobu života fluorescence. Dále byla u všech vezikulárních systémů měřena jejich stabilita metodami založenými na rozptylu světla. Na základě všech provedených měření byl jako vhodný fluorofor, který by splňoval podmínky pro funkci donoru ve studiu rezonančního přenosu energie, zvolen DPH o koncentraci $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Samotné DPH bez přídatku akceptoru nevykazovalo zhášení fluorescence. Po přídatku hyaluronanu, který byl značen fluoresceinem (akceptor) u DPH bylo měřeno více dob života fluorescence. Tyto výsledky potvrzují, že došlo k rezonančnímu přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Protože DPH je hydrofobní a nacházelo se v nepolární části vezikulárního systému a interagovalo s fluoresceinem, který byl na polymeru, lze tedy říci, že spolu interagují i vezikula a polymer.

Potvrzením vzájemné interakce mezi vezikulou a polymerem jsou kataniontové vezikuly vhodným adeptem pro podrobnější studium možnosti jejich uplatnění jako nosiče léčiv.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TIWARI, Gaurav, et al. Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2012, 2.1: 2.
- [2] VADER, Pieter, Emma A. MOL, Gerard PASTERKAMP a Raymond M. SCHIFFELERS, 2016. Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **106**, 148-156 [cit. 2023-05-11]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2016.02.006
- [3] RAJPUT, Sargam M., Sugam KUMAR, Vinod K. ASWAL, Omar A. EL SEOUD, Naved I. MALEK a Suresh Kumar KAILASA, 2018. Drug-Induced Micelle-to-Vesicle Transition of a Cationic Gemini Surfactant: Potential Applications in Drug Delivery. *ChemPhysChem* [online]. **19**(7), 865-872 [cit. 2023-05-11]. ISSN 1439-4235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201701134
- [4] ROSA, Mónica, Maria da Graça MIGUEL a Björn LINDMAN, 2007. DNA encapsulation by biocompatible cationic vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. **312**(1), 87-97 [cit. 2023-05-11]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2006.07.084
- [5] AMARO, Mariana, Radek ŠACHL, Piotr JURKIEWICZ, Ana COUTINHO, Manuel PRIETO a Martin HOF, 2014. Time-Resolved Fluorescence in Lipid Bilayers: Selected Applications and Advantages over Steady State. *Biophysical Journal* [online]. **107**(12), 2751-2760 [cit. 2023-05-11]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2014.10.058
- [6] ALBANI, J.R., 2004. Fluorescence: Principles and Observables. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. Elsevier, 2004, 55-98. ISBN 9780444514493. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-51449-3/50002-2
- [7] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jorg ENDERLEIN, 2011. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*. Germany: Wiley-VCH Verlag. ISBN 9783527316694.
- [8] VALEUR, Bernard, 2012. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2e. Germany: Wiley-VCH Verlag. ISBN 9783527328376.
- [9] DEMCHENKO, Alexander, Jzef HELDT, Jacek WALUK, Pi-Tai CHOU, Pradeep SENGUPTA, Larissa BRIZHIK a Juan CARLOS DEL VALLE, 2014. Michael Kasha: From Photochemistry and Flowers to Spectroscopy and Music. *Angewandte Essays*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 10. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201405222
- [10] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 s. ISBN 03-873-1278-1.
- [11] SINKELDAM, Renatus W., Nicholas J. GRECO a Yitzhak TOR, 2010. Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. **110**(5), 2579-2619. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr900301e
- [12] HIRVONEN, Liisa M a Klaus SUHLING, 2017. Wide-field TCSPC: methods and applications. *Measurement Science and Technology* [online]. **28**(1) [cit. 2023-03-17]. ISSN 0957-0233. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6501/28/1/012003

- [13] ČASOVĚ KORELOVANÉ ČÍTÁNÍ JEDNOTLIVÝCH FOTONŮ, 2022. *Optixs: Lasery a přístrojová technika* [online]. Praha 9 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: <https://www.optixs.cz/aplikace-53/spektroskopie-145/casove-korelovane-citani-jednotlivych-fotonu-254>
- [14] BEREZIN, Mikhail Y. a Samuel ACHILEFU, 2010. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*. **110**(5), 2641-2684. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr900343z
- [15] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C., Richard ANKERHOLD a Gregor P. C. DRUMMEN, 2012. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. **17**(4), 4047-4132. ISSN 1420-3049. 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules17044047
- [16] PAWLEY, James B., 1995. *Handbook of biological confocal microscopy*. 2 ed. New York: Plenum Press. ISBN 0-306-44826-2.
- [17] PISTON, David W., Gert-Jan KREMERS a Gregor P. C. DRUMMEN, 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*. **32**(9), 407-414. ISSN 09680004. 1420-3049. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003
- [18] Time-resolved fluorescence lifetime measurements. *HORIBA: scientific* [online]. [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Molecular_and_Microanalysis/DeltaFlex/TechNote-1b-Time-resolved_fluorescence_lifetime_measurements.pdf
- [19] CLEGG, Robert M, 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **6**(1), 103-110 [cit. 2023-04-17]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/0958-1669(95)80016-6
- [20] HABERTHUR, Kristen. How Fluorescent Molecules Work. *BiteSizeBio* [online]. 2017 [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/32973/fluorescent-molecules/>
- [21] ZDENĚK FIŠAR, Zdeněk, 2003. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. Praha 2 [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- [22] ZHENG, Hong, Xin-Qi ZHAN, Qing-Na BIAN a Xiao-Juan ZHANG. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chemical Communications* [online]. 2012, 19 [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: doi:DOI <https://doi.org/10.1039/C2CC35997A>
- [23] Pubchem: Fluorescein. *National Library of Medicine: Pubchem* [online]. USA [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluorescein>
- [24] MARCIA, Mario, Andreas HIRSCH a Frank HAUKE, 2017. Perylene-based non-covalent functionalization of 2D materials. *FlatChem* [online]. **1**(9), 89-103 [cit. 2023-03-18]. ISSN 24522627. Dostupné z: doi:10.1016/j.flatc.2017.01.001
- [25] LI, Jialuo, Shuai YUAN, Jun-Sheng QIN, et al. Fluorescence Enhancement in the Solid State by Isolating Perylene Fluorophores in Metal–Organic Frameworks. *FlatChem* [online]. 2020, **12**(23), 26727-26732 [cit. 2023-03-18]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.0c05512
- [26] ȚIMBOLMAȘ, LARISA MILENA; CHIȘ, V. PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF PERYLENE MOLECULE. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica*, 2017, 62.

- [27] Perylene. *National Library of Medicine: Pubchem* [online]. USA [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perylene>
- [28] MAKWANA, Pinakin K., Prashant N. JETHVA a Ipsita ROY, 2011. Coumarin 6 and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as fluorescent probes to monitor protein aggregation. *The Analyst* [online]. **136**(10) [cit. 2023-03-19]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/c0an00829j
- [29] CAPEK, Ignac. *Nanocomposite structures and dispersions*. Elsevier, 2019.
- [30] IAKIMOV, Nikolai P., et al. Evaluation of critical packing parameter in the series of polytyrosine-PEG amphiphilic copolymers. *Colloid and Polymer Science*, 2021, 299.10: 1543-1555
- [31] SALAGER, Jean-Louis, 2002. *SURFACTANTS Types and Uses*. 2nd ed. Mérida-Venezuela: UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
- [32] THIELE, Bjoern, 2005. Surfactants. *Chromatographic Analysis of the Environment, Third Edition*. CRC Press, 2005-11-29, 1173-1198. Chromatographic Science Series. ISBN 978-0-8247-2629-4. Dostupné z: doi:10.1201/9781420027983.ch30
- [33] ARONSON, Jeffrey K., 2015. *Meyley's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions* [online]. 16th Edition. United States of America: Elsevier Science [cit. 2023-03-24]. ISBN 9780444537164. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/T/A/9780444537164>
- [34] FARRELL, Robert E., 2009. *RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization* [online]. 4th Edition. Academic Press [cit. 2023-03-24]. ISBN 9780080884950. Dostupné z: <https://shop.elsevier.com/books/T/A/9780123747273>
- [35] Sodium Lauryl Sulfate. *Chemspider: search and share chemistry* [online]. Royal Society of Chemistry [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8677.html>
- [36] *DIMETHYLDIOCTADECYLAMMONIUM CHLORIDE (DODMAC): Summary Risk Assessment Report* [online], 2009. European Chemicals Bureau: Institute for Health and Consumer Protection [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/96909e2f-1793-4e24-a3df-d0bbcb08ff87>
- [37] OLIVEIRA, Isabel S., Sandra G. SILVA, Maria Luísa DO VALE a Eduardo F. MARQUES, 2023. Model Catanionic Vesicles from Biomimetic Serine-Based Surfactants: Effect of the Combination of Chain Lengths on Vesicle Properties and Vesicle-to-Micelle Transition. *Membranes* [online]. **13**(2) [cit. 2023-04-01]. ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes13020178
- [38] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG, 2005. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. **21**(14), 6179-6184 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la047207g
- [39] HAVLÍKOVÁ, Martina, Adam JUGL, Jitka KROUSKÁ, et al., 2021. Interactions between Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles and Hyaluronan—A Physicochemical Study. *Langmuir* [online]. **37**(28), 8525-8533 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.1c00993

- [40] CHRISTIE, William W. Sterols: 1. Cholesterol and Cholesterol Esters. *The LipidWeb* [online]. LipidMaps®, 2023 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/simple/cholest/index.htm
- [41] RUWIZHI, Ngonidzashé a Blessing Atim ADERIBIGBE, 2020. The Efficacy of Cholesterol-Based Carriers in Drug Delivery. *Molecules* [online]. **25**(18) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184330
- [42] MALMSTEN, Martin. *Surfactants and polymers in drug delivery*. CRC Press, 2002.
- [43] BERNE, Bruce J.; PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation, 2000.
- [44] HASSAN, Puthusserickal A., Suman RANA a Gunjan VERMA, 2015. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* [online]. **31**(1), 3-12 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la501789z
- [45] KOKUFUTA, Etsuo, 2016. Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering of Biopolymers. In: OHSHIMA, Hiroyuki. *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2016-09-24, s. 619-627 [cit. 2023-04-08]. ISBN 9781119075691. Dostupné z: doi:10.1002/9781119075691.ch51
- [46] CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, 2011, 63-70.
- [47] BHATTACHARJEE, Sourav, 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* [online]. **235**, 337-351 [cit. 2023-04-08]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [48] Fluorescent Dye, 2022. *BroadFarm: A Worldwide Leading PEG Supplier* [online]. San Diego [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: https://broadpharm.com/product-categories/fluorescent-dye?gclid=EA1aIQobChMIyc2lg-ea_gIVso9oCR0rcAw8EAAYASAAEgKKQ_D_BwE
- [49] HOLMBERG, Krister, 2003. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley. ISBN 0-471-49883-1.
- [50] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR, 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína* [online]. **53**(8), 397-411 [cit. 2023-04-09]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [51] STAGNOLI, Soledad, M. Alejandra LUNA, Cristian C. VILLA, Fabrisio ALUSTIZA, Ana NIEBYLSKI, Fernando MOYANO, N. Mariano CORREA a R. Darío FALCONE, 2017. Unique catanionic vesicles as a potential “Nano-Taxi” for drug delivery systems. In vitro and in vivo biocompatibility evaluation. *RSC Advances* [online]. **7**(9), 5372-5380 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C6RA27020D
- [52] JAIN, Monika, Ayushi MARFATIA, Nahajaveen IMAM, et al., 2021. Ionic liquid-based catanionic vesicles: A de novo system to judiciously improve the solubility, stability and antimicrobial activity of curcumin. *Journal of Molecular Liquids* [online]. **341** [cit. 2023-04-12]. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2021.117396

- [53] DHAWAN, Vivek V. a Mangal S. NAGARSENKER, 2017. Catanionic systems in nanotherapeutics – Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* [online]. **266**, 331-345 [cit. 2023-04-22]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.040
- [54] WANG, Chen-An, Yi-Qi YEH, Chung-Yuan MOU, Chun-Jen SU, Wei-Ru WU a U-Ser JENG, 2022. Small-angle-scattering resolved catanionic unilamellar vesicles as molecule carriers. *Materials Chemistry and Physics* [online]. **277** [cit. 2023-04-23]. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2021.125435
- [55] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG, 2018. Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. **92**, 29-35 [cit. 2023-04-23]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [56] HAVLÍKOVÁ, Martina, Adam JUGL, Jitka KROUSKÁ, et al., 2021. Interactions between Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles and Hyaluronan—A Physicochemical Study. *Langmuir* [online]. **37**(28), 8525-8533 [cit. 2023-04-18]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.1c00993
- [57] HOLÍNKOVÁ, Petra, Filip MRAVEC, Tereza VENEROVÁ, Chien-Hsiang CHANG a Miloslav PEKAŘ, 2022. Hyaluronan interactions with cationic surfactants – Insights from fluorescence resonance energy transfer and anisotropy techniques. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **211**, 107-115 [cit. 2023-04-18]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.05.067
- [58] YAMASHITA, Shoji, Aurthur G. SZABO a P. CAVATORTA, 1989. Temperature Dependence and Decay Kinetics of the High-Energy Band in DPH Fluorescence. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. **62**(9), 2849-2853 [cit. 2023-05-11]. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.62.2849,

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

8.1 Seznam použitých symbolů

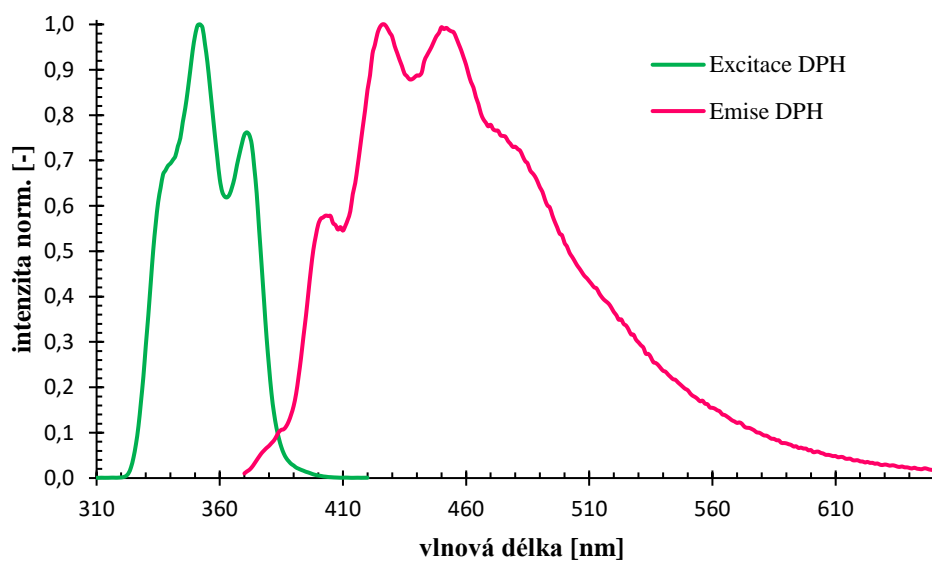
S_0	nejnižší energetická hladina
S_1, S_2	vyšších singletové stavy
k_{nr}	rychlostní konstanta popisující nezářivé procesy fluorescence
Γ	rychlostní konstantou, popisující nezářivé procesy fluorescence
τ	doba života fluorescence
Q	fluorescenční kvantový výtěžek
E_{FRET}	účinnost FRET
r	vzdálenost
R_0	vzdálenost, kde je účinnost FRET 50 %
κ^2	úhel mezi dipóly
Q_D	donorový kvantový výtěžek
N_A	Avogadrova konstanta
N	index lomu světla
$J(\lambda)$	integrál spektrálního překryvu mezi donorem v základním stavu a akceptorem v excitovaném stavu
τ_d	doba života donoru
τ_{da}	doba života donoru po přidání akceptoru
v	objem hydrofobní části
l_c	délka hydrofobní části tenzidu
a_0	plocha hydrofilní části
P_c	packing parameter
D	difúzní koeficient
k_B	Boltzmanova konstanta
T	teplota
H	dynamická viskozita
R_H	hydrodynamický poloměr
U_e	elektroforetická pohyblivost
E	dielektrická konstanta
z	zeta potenciál
$f(\kappa a)$	Henryho funkce
η	absolutní viskozita
c	koncentrace
c_m	hmotnostní koncentrace
i	čas
A	korekční parametr
B	předexponenciální funkce
T	příslušná doba života
χ^2	Chi square
A	amplituda

<i>d</i>	velikost
<i>PDI</i>	polydisperzní index
<i>ZP</i>	zeta potenciál
τ_{AVG}	průměrná hodnota zhasených dob života fluorescence

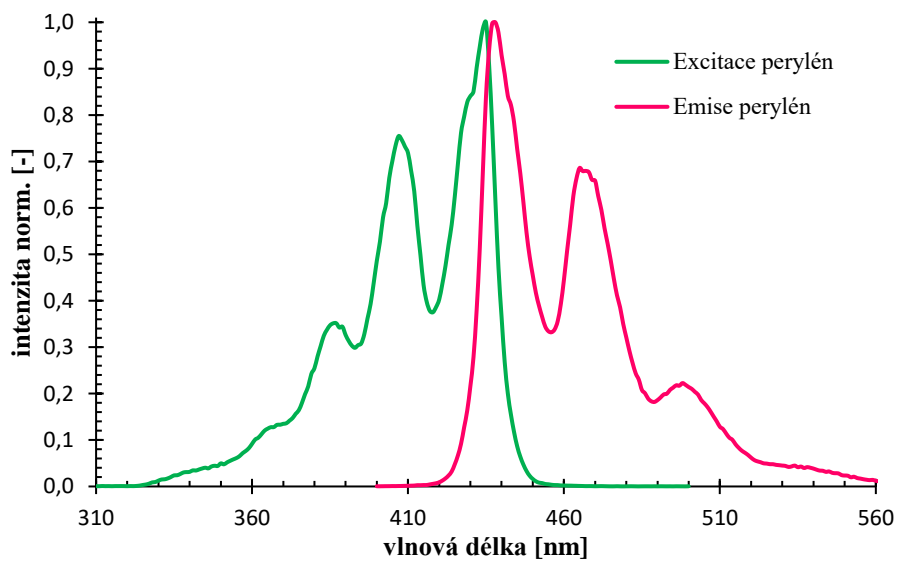
8.2 Seznam použitých zkratk

IC	vnitřní konverze
ISC	mezisystémový přechod
S	singletový elektronový stav
T	tripletové elektronový stav
UV	ultrafialové záření
IČ	infračervené záření
TCSPC	time-Correlated Single Photon Counting
CFD	constant fraction discriminator
TAC	time-to-Amplitude Converter
FRET	Förster resonance energy transfer
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	critical micelle concentration
CPP	critical packing parameter
CTAB	cetrimoniumbromid
SDS	dodecylsírán sodný
DODAC	dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid
IPAs	ion pair amphiphiles
DLS	dynamic light scattering),
ELS	electrophoretic light scattering).
DiO	3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin)
AOT-BHD	bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát benzyl-n-hexadecyldimethylamonium
Na-AOT	1,4-bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný
BHDC	benzyl-n-hexadecyldimethylamoniumchlorid
SANS	small-angle neutron scattering
C ₁₂ EMorphBr	4-methyl-4-(2-(dodecyloxykarbonylmethyl)morfolin-4-ium bromid
C ₁₂ EMeImBr	3-methyl-1-(dodecyloxykarbonylmethyl)imidazolium bromid
P123	Poly(oxyetylen-b-oxypropylen-b-oxyetylen)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
SANX	Small-angle X-ray scattering
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HR-US	High resolution ultrasonic spectroscopy
ITC	Isothermal titration calorimetry
HA300	hyaluronam s molekulovou hmotností 300 kDa
HA900	hyaluronam s molekulovou hmotností 900 kDa

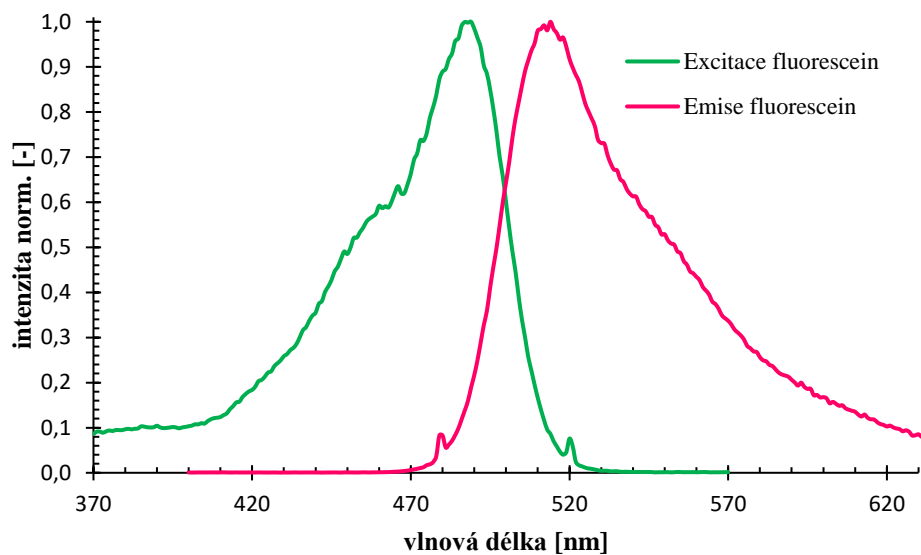
9 PŘÍLOHY



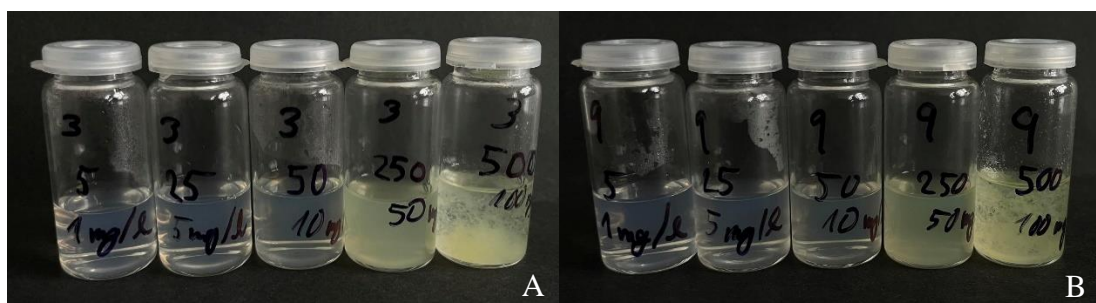
Příloha 1: excitační a emisní sken DPH



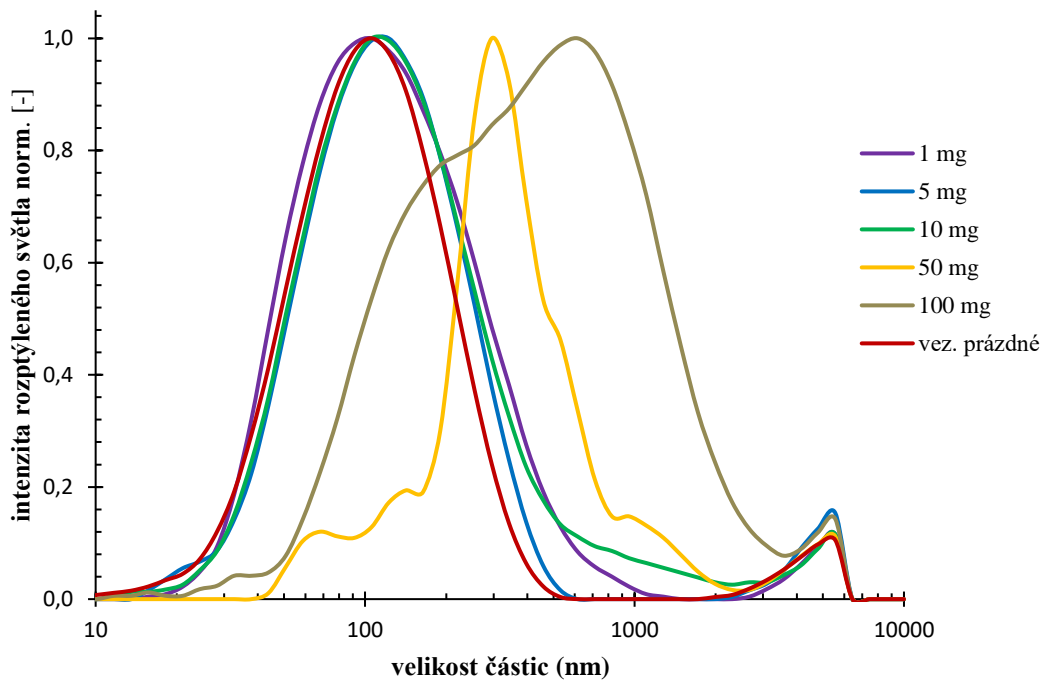
Příloha 2: excitační a emisní sken perylenu



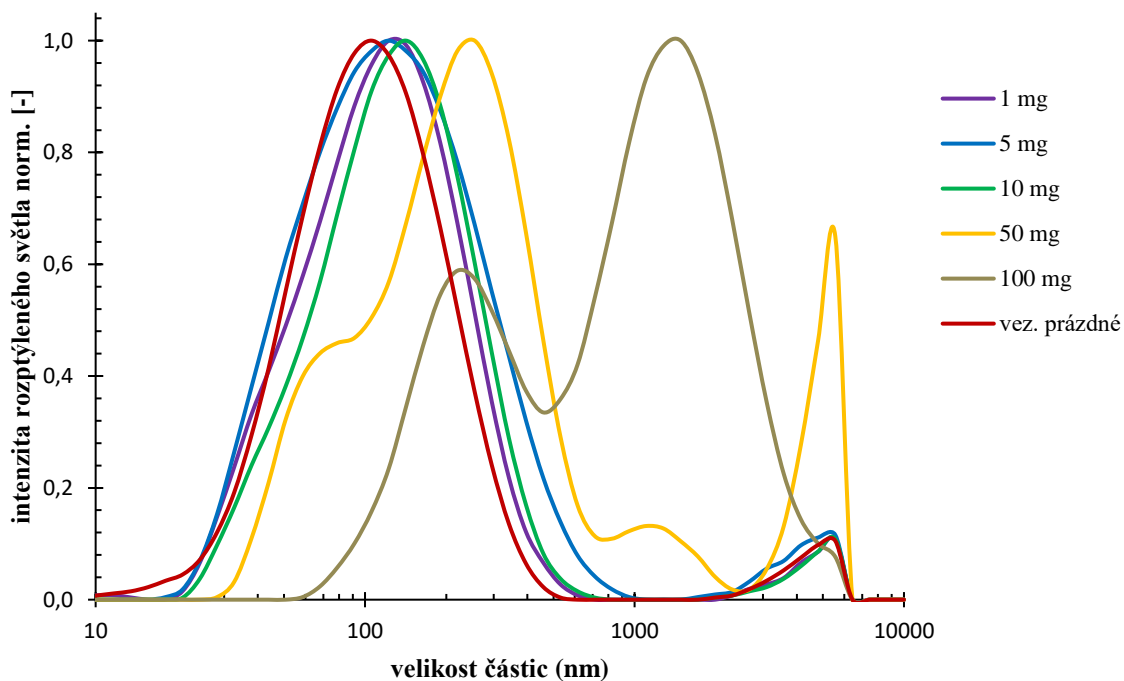
Příloha 3: excitační a emisní sken fluoresceinu



Příloha 4: vizuální pozorování vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 kDa (A) a 900 kDa (B)



Příloha 5: zobrazení velikosti částic vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 kDa



Příloha 6: zobrazení velikosti částic vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu s molekulovou hmotností 900 kDa

Příloha 7: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 DPH zhaseného fluoresceinem ($2 \cdot 10^{-8}$ – $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l), jehož koncentrace odpovídá fluoresceinu obsaženého v přídavcích hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 kDa

c [mol/l]	exp.	$\tau_{1 \text{ fix}}$ [ns]	A_1 [%]	τ_2 [ns]	A_2 [%]	τ_3 [ns]	A_3 [%]	χ^2 [-]
$2,00 \cdot 10^{-8}$	biexp.	11,85	82,73	7,05	17,27	-	-	1,688
	triexp.	11,85	64,79	9,72	33,39	0,62	1,82	1,067
$1,00 \cdot 10^{-7}$	biexp.	11,85	82,88	6,95	17,12	-	-	1,517
	triexp.	11,85	70,00	9,27	28,32	0,58	1,69	1,003
$2,00 \cdot 10^{-7}$	biexp.	11,85	83,48	7,1	16,52	-	-	1,505
	triexp.	11,85	65,87	9,78	32,46	0,67	1,67	0,993
$1,00 \cdot 10^{-6}$	biexp.	11,85	79,75	7,05	20,25	-	-	1,728
	triexp.	11,85	67,19	9,1	30,99	0,61	1,82	1,101
$2,00 \cdot 10^{-6}$	biexp.	11,85	78,40	6,87	21,60	-	-	1,864
	triexp.	11,85	57,81	9,6	39,74	0,92	2,45	1,125

Příloha 8: hodnoty dob života fluorescence (τ), amplitudy (A) a χ^2 DPH zhaseného fluoresceinem ($2,23 \cdot 10^{-8}$ – $2,23 \cdot 10^{-6}$ mol/l), jehož koncentrace odpovídá fluoresceinu obsaženého v přídavcích hyaluronanu s molekulovou hmotností 900 kDa

c [mol/l]	exp.	$\tau_{1 \text{ fix}}$ [ns]	A_1 [%]	τ_2 [ns]	A_2 [%]	τ_3 [ns]	A_3 [%]	χ^2 [-]
$2,23 \cdot 10^{-8}$	biexp.	11,85	83,86	7,30	16,14	-	-	1,372
	triexp.	11,85	54,89	10,46	43,37	1,17	1,74	1,045
$1,12 \cdot 10^{-7}$	biexp.	11,85	84,58	6,64	15,42	-	-	1,818
	triexp.	11,85	70,31	9,34	27,78	0,40	1,90	1,048
$2,23 \cdot 10^{-7}$	biexp.	11,85	83,43	6,57	16,57	-	-	1,64
	triexp.	11,85	70,76	9,07	27,36	0,5	1,88	0,969
$1,12 \cdot 10^{-6}$	biexp.	11,85	76,92	7,57	23,08	-	-	1,56
	triexp.	11,85	57,50	9,76	40,62	0,89	1,88	1,074
$2,23 \cdot 10^{-6}$	biexp.	11,85	78,40	6,89	21,60	-	-	1,614
	triexp.	11,85	64,31	9,13	33,61	0,89	2,08	1,053