



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STUDIUM DIFÚZNÍCH VLASTNOSTÍ VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

STUDY OF DIFFUSION PROPERTIES OF VESICULAR SYSTEMS USING FLUORESCENCE CORRELATION  
SPECTROSCOPY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Barbora Rašticová**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1901/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Barbora Rašticová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Studium difúzních vlastností vezikulárních systémů pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie

### Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na téma techniky Fluorescenční korelační spektroskopie a její využití ve studiu vezikulárních systémů.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodné fluorofory a postupy pro barvení vezikulárních systémů.
- 3) Ověřit vhodnost vybraných fluoroforů a postupy barvení na stanovení difúzních vlastností vezikulárních systémů. Provést srovnávací experimenty s metodou dynamického rozptylu světla.
- 4) Zhodnotit dosažené výsledky z hlediska využitelnosti této metodiky pro studium interakce mezi polymery a vezikulami.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

-----  
Bc. Barbora Rašticová  
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá studiem difuzních vlastností vezikulárních systémů tvořených ze dvou opačně nabitých tensidů SDS a CTAB s přidavkem dvouřetězcového tenzidu DODAC a cholesterolu. Cílem práce bylo vybrat vhodné fluorescenční sondy a prozkoumat jejich využití při zobrazování těchto systémů pomocí metody dynamického rozptylu světla a fluorescenční korelační spektroskopie. K připraveným systémům také byly přidány různé koncentrace hyaluronanu. Jako fluorescenční sondy byly vybrány dva zástupci karbokyaninových (DiI, DiO) a dva xanthenových (F16, RBOE) barviv. U všech sond, s výjimkou RBOE, došlo k ověření vhodnosti jejich použití. Zároveň došlo k porovnání naměřených výsledků z obou metod. Bylo zjištěno, že spolu data nekorelují, z důvodu značné složitosti analyzovaných systémů a dostupné matematické modely k prokládání FCS křivek jsou tak nedostačující.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kataniontové vezikulární systémy, dynamický rozptyl světla, fluorescenční korelační spektroskopie, DiI, DiO, F16, RBOE, hyaluronan

## **ABSTRACT**

This master's thesis deals with the study of the diffusion properties of vesicular systems composed of two oppositely charged tensides SDS and CTAB with the addition of the double-chain tenside DODAC and cholesterol. The aim of this work was to select suitable fluorescent probes and investigate their use in imaging these systems using dynamic light scattering and fluorescence correlation spectroscopy. Different concentrations of hyaluronan were also added to the prepared systems. Two representatives of carbocyanine (DiI, DiO) and two xanthene (F16, RBOE) dyes were selected as fluorescent probes. The suitability of their use was verified for all probes except RBOE. The measurement results from the two methods were also compared. It was found that the data do not correlate with each other, due to the considerable complexity of the analyzed systems and the available mathematical models to fit the FCS curves are therefore insufficient.

## **KEY WORDS**

Cationic vesicle systems, dynamic light scattering, fluorescence correlation spectroscopy, DiI, DiO, F16, RBOE, hyaluronan

RAŠTICOVÁ, Barbora. *Studium difúzních vlastností vezikulárních systémů pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148067>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Filip Mravec.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

---

podpis studenta

### ***Poděkování***

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a cenné rady, které mi věnoval při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Ivaně Málkové za její pomoc, rady a čas strávený v laboratoři. Dále také Ing. Martině Havlíkové za cenné rady a konzultace. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.*

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>8</b>
2.1	Povrchově aktivní látky.....	8
2.1.1	Micely.....	9
2.1.2	Kataniontové vezikulární systémy.....	11
2.2	Hyaluronan.....	13
2.2.1	Historie.....	13
2.2.2	Struktura a vlastnosti.....	13
2.2.3	Biotechnologická produkce.....	14
2.2.4	Aplikace.....	14
2.3	Tepelný pohyb částic.....	15
2.3.1	Difuze.....	15
2.4	Dynamický rozptyl světla.....	16
2.5	Elektroforetický rozptyl světla.....	18
2.6	Fluorescenční spektroskopie.....	19
2.6.1	Fluorescence.....	19
2.6.2	Instrumentace fluorescenční spektroskopie.....	21
2.6.3	Fluorescenční korelační spektroskopie.....	22
<b>3</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b> .....	<b>32</b>
3.1	Příprava a stabilizace kataniontových vezikulárních systémů.....	32
3.2	Studium interakce kladně nabitých vezikul s opačně nabitým polymerem.....	34
3.3	Studium interakce lipidů s fluorofory pomocí fluorescenční korelační spektroskopie.....	35
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>38</b>
4.1	Použité chemikálie.....	38
4.2	Pracovní postupy.....	39
4.2.1	Příprava zásobního prášku IPA.....	39
4.2.2	Příprava kataniontových vezikulárních systémů s cholesterolem.....	39
4.2.3	Příprava vzorků s fluorescenční sondou pro měření FCS a DLS.....	39
4.2.4	Příprava koncentrační řady hyaluronanu pro měření FCS a DLS.....	39
4.2.5	Příprava fluorescenčních silikátových částic s hyaluronanem.....	40
4.2.6	Měření optických vlastností vybraných fluorescenčních sond.....	40
4.2.7	Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla.....	41
4.2.8	Měření fluorescenční korelační spektroskopie.....	42
<b>5</b>	<b>Předmluva k výsledkům</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>44</b>
6.1	Příprava zásobního IPA prášku.....	44

6.2	Příprava kationtových vezikul s cholesterolem .....	44
6.3	Vizuální pozorování .....	44
6.3.1	Systémy s fluorescenčními sondami .....	44
6.3.2	Systémy s hyaluronanem.....	45
6.3.3	Fluorescenčně značené křemenné kuličky s hyaluronanem.....	45
6.4	Měření spektrálních vlastností.....	46
6.5	Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla .....	47
6.5.1	Velikost a stabilita systémů cIPA s přidavkem fluorescenčních sond .....	47
6.5.2	Velikost a stabilita vezikulárních systémů s přidavkem hyaluronanu .....	50
6.5.3	Měření koncentrační řady hyaluronanu s fluorescenčně značenými silikátovými částicemi .....	62
6.6	Měření fluorescenční korelační spektroskopie a její porovnání s DLS.....	65
6.6.1	Měření koncentrační řady hyaluronanu s vezikulárními systémy .....	65
6.6.2	Měření koncentrační řady hyaluronanu se silikátovými částicemi .....	74
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Seznam zkratk a symbolů .....</b>	<b>85</b>
<b>10</b>	<b>Příloha.....</b>	<b>86</b>
10.1	Excitační spektrum .....	86
10.2	FLCS analýza .....	87
10.2.1	Sonda DiI .....	87

# 1 ÚVOD

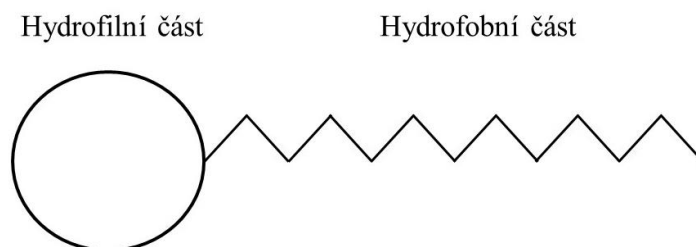
Vezikulární systémy jsou již dlouhá léta předmětem zkoumání, zejména pak díky jejich duté kulovité struktuře skládající se jak z hydrofilní, tak hydrofobní části. Kvůli tomuto uspořádání jsou schopny enkapsulace celé řady látek hydrofilní i hydrofobní povahy. Své aplikace pak nacházejí zejména jako potencionální nosiče léčiv s možností jejich řízeného uvolňování. Jedny z nejvyužívanějších vezikulárních systémů jsou tzv. lipozomy, skládající se z molekul fosfolipidů. Jejich nevýhodou je však jejich poměrně složitá příprava, omezená doba skladovatelnosti a nízká stabilita. Proto došlo v posledních letech ke snaze najít systémy s podobnou strukturou, vykazující lepší vlastnosti. Jedním z takových systémů se jeví být kataniontové vezikulární systémy, které jsou známy svou amfifilní strukturou tvořenou dvěma opačně nabitými tenzidy v jejich ekvimolárním poměru. Svou strukturou tak připomínají lipozomy, nicméně jejich výhodou je, kromě jejich snadné přípravy a nižší ceny, také prodloužená doba stability. Zároveň lze úpravou směšovacího poměru či výběrem tenzidů snadno řídit jejich vlastnosti, jako je velikost či náboj. Jednou z nevýhod vezikulárních systémů je však jejich toxicita. Tento problém může být pak vyřešen navázáním polysacharidu hyaluronanu, který zvyšuje biokompatibilitu systémů.

Samotné vlastnosti vezikulárních systémů pak lze charakterizovat pomocí řady metod, mezi které se řadí dynamický rozptyl světla (DLS). Jedná se o rozptylovou techniku využívanou zejména pro popis makromolekul a částic v roztoku. Díky ní jsme schopni na základě analyzování Brownova pohybu částic zjistit difuzní koeficient, ze kterého lze snadno dopočítat jejich velikost. Na podobném principu je pak založena metoda fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), která však zatím nebyla otestována při analýze vezikulárních systémů. Obě metody sice pracují na podobném principu, a to na měření intenzity fluktuujícího signálu. U dynamického rozptylu světla je signálem světlo rozptýlené částicemi, u korelační spektroskopie se pak jedná o fluorescenci. Výhodou FCS oproti DLS je, že právě díky fluorescenci může poskytnout bližší informace o analyzovaném systému. Jedná se například o detekci specifických molekul, či zjištění jednotlivých frakcí fluoroforu pomocí Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Tato metoda se proto jeví jako velmi slibná za účelem charakterizace vezikulárních systémů. Jednou z nevýhod by naopak mohl být fakt, že na autokorelační funkci, kterou se data FCS prokládají, má vliv mnoho parametrů, jako je velikost, translační difuzní koeficient či molekulární jas, což může dělat její vyhodnocení o to náročnější, zejména pak u složitějších systémů vykazující nehomogenní distribuci či anomální difuzi.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL), také tenzidy, jsou organické sloučeniny s alespoň jednou lyofilní a jednou lyofobní skupinou. Pokud je použitým rozpouštědlem voda nebo vodný roztok, pak se používají termíny hydrofilní a hydrofobní skupiny. Zjednodušeně řečeno se jedná o látky obsahující jak nepolární, tak polární (iontovou) část (Obrázek 1) [1].

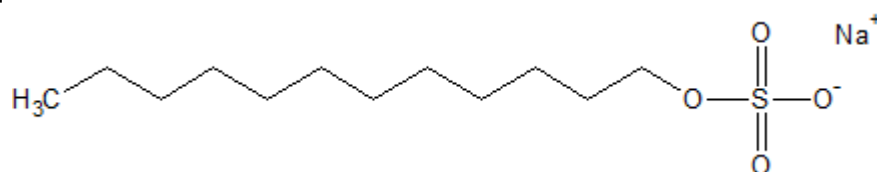


Obrázek 1: Struktura PAL [1].

Hydrofilní skupina může nést náboj záporný, kladný či oba zároveň, popřípadě nemusí obsahovat náboj vůbec. Z tohoto důvodu lze základně povahy hydrofilní skupiny rozdělit PAL do několika tříd, a to aniontové, kationtové, amfoterní a neiontové PAL [1].

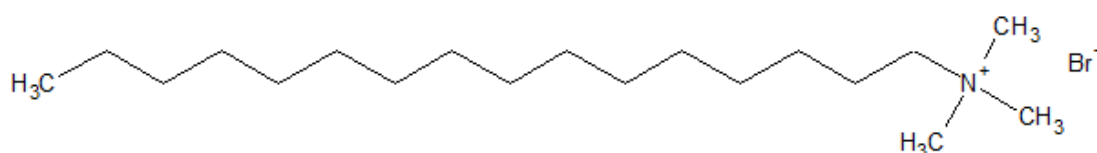
Aniontové povrchově aktivní látky jsou díky jejich relativně nízkým nákladům na výrobu nejvyužívanější třídou tenzidů, a to zejména v průmyslových aplikacích [2,3]. Pro optimální detergentní účinek je hydrofobním řetězcem lineární alkylová skupina s délkou řetězce 12 až 16 atomů uhlíku. Nejvíce využívané hydrofilní skupiny u aniontových PAL jsou zejména karboxyláty, sulfáty, sulfonáty a fosforečnany [4].

Konkrétním příkladem záporně nabitého tenzidu je SDS neboli dodecylsírán sodný, též lauroylsírán sodný (Obrázek 2). Jeho struktura je složena z nepolárního řetězce obsahujícího 12 atomů uhlíku, na který je navázána záporně nabitá síranová skupina. Můžeme ho najít v celé řadě čistících prostředků, v zubních pastách, šamponech či pěnach na holení. Kromě toho se také využívá v biochemických laboratořích jakožto nezbytná součást elektroforézy proteinů nazývaná jako SDS-PAGE [5].



Obrázek 2: Struktura SDS.

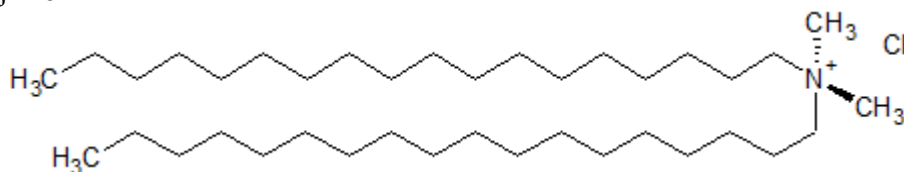
Mezi nejběžnější kationtové povrchově aktivní látky patří kvartérní amoniové sloučeniny s obecným vzorcem  $R^1R^2R^3R^4N^+X^-$ , kde  $X^-$  představuje většinou chloridový ion a R alkylové skupiny [4]. Mezi takové látky patří například CTAB neboli centrimonium bromid, též hexadecyltrimethylamonium bromid (Obrázek 3). Jedná se o organickou bromidovou sůl cetylmethylamonia [6]. Jeho struktura je složena z nepolárního řetězce obsahujícího 16 uhlíkových atomů a z hydrofilní části tvořené kladně nabitým atomem dusíku se třemi methylovými zbytky.



Obrázek 3: Struktura CTAB.



Další třídou kationtových povrchově aktivních látek je ta, která obsahuje dva dlouhé alkylové řetězce. Příkladem takové látky je dimethyldioktadecylamonium chlorid neboli DODAC (Obrázek 4) [4]. Jedná se o kvartérní amoniovou sůl. Na kladně nabitým dusíkovém atomu jsou připojeny dva methylové zbytky a nepolární část, která je tvořena dvěma uhlíkovými řetězci, z nichž každý obsahuje 18 atomů uhlíku.



Obrázek 4: Struktura DODAC.

Kationtové PAL s jedním uhlovodíkovým řetězcem jsou sice dobře rozpustné ve vodě, ale nejsou rozpustné v uhlovodíkových rozpouštědlech. Naproti tomu dialkylové PAL jsou v porovnání s monoalkylovými méně rozpustné ve vodě, ale naopak jsou dobře rozpustné v uhlovodíkových rozpouštědlech. Kationtové PAL jsou obecně chemicky stálé a odolné vůči změnám pH, snesou také přítomnost elektrolytů. Používají se například jako antikoroziční prostředky na ocel, antistatické prostředky na plasty nebo vlasové kondicionéry. Dále taky jako protispěkové prostředky do hnojiv a jako baktericidy [4].

Amfoterní povrchově aktivní látky obsahují jak kationtovou, tak aniontovou skupinu [7]. Nejběžnějšími amfoterními PAL jsou N-alkylbetaminy, deriváty trimethyl glycinu. Hlavní charakteristikou amfoterních PAL je jejich závislost na pH roztoku, ve kterém se nacházejí. Jestliže jsou v prostředí s kyselým pH, molekula získává kladný náboj a chová se jako kationtová PAL. Pokud se ale nachází v prostředí s alkalickým pH, nabíjí se záporně a chová se jako aniontová [4].

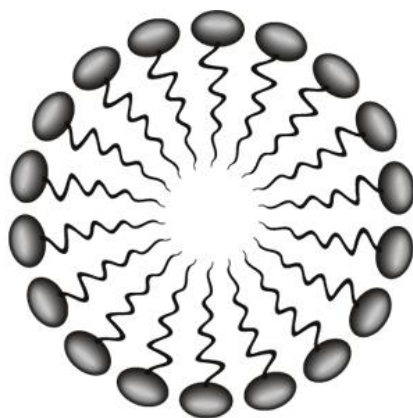
Nejběžnějšími neiontově povrchově aktivními látkami jsou látky na bázi ethylenoxidu označované jako ethoxylovené PAL [8,9].

### 2.1.1 Micely

Povrchově aktivní látky, které se nacházejí ve vodném roztoku při nízkých koncentracích, se vyskytují v podobě monomerů (jako volné molekuly). Tyto monomery migrují na rozhraní vzduch/voda a pevná látka/voda a orientují se tak, aby co nejvíce minimalizovaly kontakt mezi svou hydrofobní částí a vodou. Tomuto procesu se přezdívá adsorpce. Se zvyšující se koncentrací PAL se plocha dostupná pro adsorpci zmenšuje a v roztoku se tak začnou hromadit jednotlivé monomery. Protože je zde ale stále snaha o minimalizaci kontaktu hydrofobní části s vodou, začne docházet k agregaci jednotlivých molekul tenzidů. Vzniklé agregáty (micely, vezikuly, obrácené micely) jsou zároveň v rovnováze s monomery povrchově aktivní látky. To, o jaký typ agregátu se bude jednat závisí na mnoha faktorech, zejména na teplotě, koncentraci, pH nebo síle elektrolytu [1].

Při určité koncentraci, zvané kritická micelární koncentrace (CMC z angl. *critical micelle concentration*), dochází k tvorbě uzavřených agregátů zvaných micel. Jejich struktura je tvořena z lyofobní i lyofilní části. Ve vodném prostředí pak hydrofobní konce směřují k sobě a jsou tak chráněny před vodou, zatímco hydrofilní části jsou v kontaktu s vodou (Obrázek 5). Typické hodnoty CMC při pokojové teplotě jsou  $10^{-3}$  až  $10^{-2}$  M pro aniontové tenzidy,  $10^{-3}$  až  $10^{-1}$  M pro kationtové a amfoterní a  $10^{-5}$  až  $10^{-4}$  M pro neiontové tenzidy [1]. Hodnota CMC je také ovlivněna několika faktory. K poklesu CMC dochází při zvyšování počtu uhlíkových atomů v hydrofobním řetězci či přidáním elektrolytu. Naopak ke zvýšení dochází v přítomnosti dvojnás vazby či polární skupiny v hydrofobní části [10].

Znalost hodnot CMC pro jednotlivé tenzidy je užitečná při jejich výběru pro konkrétní aplikace. Například tenzidy s nízkými hodnotami CMC jsou méně dráždivé než ty s vysokými hodnotami. Zjištění kritické micelární koncentrace lze dosáhnout měřením řady fyzikálních vlastností, jako je elektrická vodivost, zákal či povrchové napětí [11].








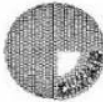

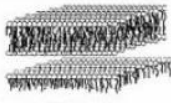


Obrázek 5: Micela [12]

Stabilní struktura agregátu ve vodném prostředí by měla vypadat následovně. Vnitřní část obsahuje hydrofobní řetězce, zatímco povrch agregátu je tvořen z hydrofilních částí molekuly, která je tak v kontaktu s vodným prostředím. Pokud jsou polární části iontové, obsahují náboj a vzájemně se tak odpuzují. Čím větší bude náboj, tím více se budou odpuzovat, a tím méně bude docházet k jejich agregaci. Oproti tomu hydrofobní části jsou k sobě navzájem přitahovány díky hydrofobnímu efektu. Pokud je tedy koncentrace PAL dostatečná, dochází ke shlukování molekul povrchově aktivních látek v důsledku interakce dvou protichůdných sil [1].

Teorie pro strukturu agregátu byla navržena na základně plochy, kterou zabírá hydrofobní a hydrofilní část PAL [13,14]. Tvar a velikost agregátů lze určit pomocí tzv. sbalovacího parametru (z angl. *packing parameter*)  $P_c$  (2.1), což je poměr plochy hydrofobní skupiny ( $v/l_c$ ) k ploše hydrofilní hlavy ( $a_0$ ) [1]:

$$P_c = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (2.1)$$

kde  $v$  je plocha, kterou představuje hydrofobní skupina,  $l_c$  délka hydrofobního řetězce a  $a_0$  plocha hydrofilní skupiny [15]. Sférické micely jsou tvořeny, jestliže je sbalovací parametr  $P_c$  menší než  $1/3$ . Cylindrické micely zase při hodnotě  $P_c$  mezi  $1/3$  a  $1/2$ . Jakákoliv změna vlastností roztoku, způsobující zmenšení efektivní velikosti hydrofilní části, způsobí změnu velikost a tvar agregátu ze sférického na cylindrický tvar. Vezikuly a lipozomy jsou pak tvořeny při  $P_c$  mezi  $1/2$  a  $1$ . Posledním typem agregátu jsou obrácené micely, jejichž tvorba nastává při hodnotě  $P_c$  větší než  $1$ . Obrácené micely jsou tvořeny v nepolárním prostředí a jejich struktura je opačná klasické micely, tedy hydrofilní hlavy jsou drženy pohromadě a hydrofobní řetězce směřují do rozpouštědla. Následující obrázek shrnuje výše zmíněné poznatky (Obrázek 6).

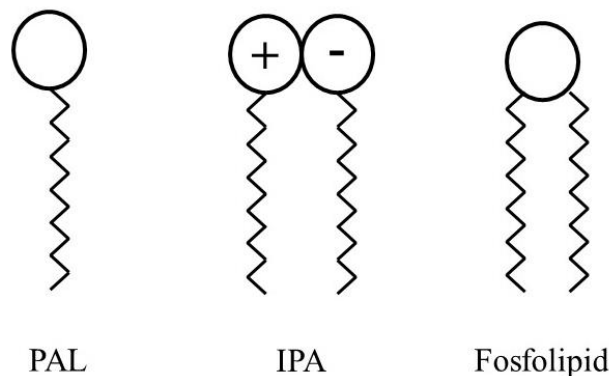
Tvar PAL	Hodnota sbalovacího parametru	Agregát PAL
	$< 1/3$	 Sférická micela
	$1/3 - 1/2$	 Cylindrická micela
	$1/2 - 1$	 Vezikul
	1	 Dvojvrstva
	$> 1$	 Obrácená micela

Obrázek 6: Schéma tvorby jednotlivých typů agregátů a hodnoty sbalovacího parametru [1].

### 2.1.2 Kataniontové vezikulární systémy

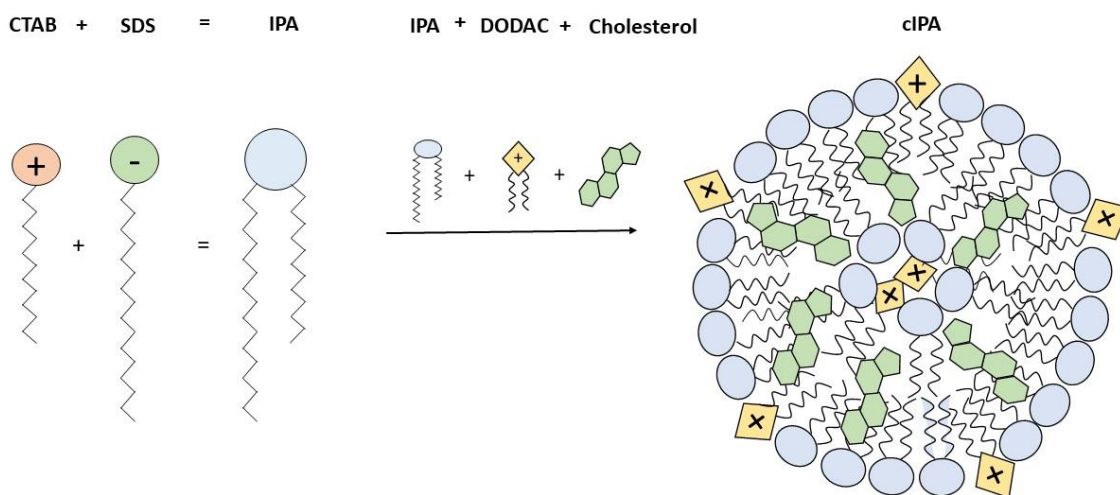
Vezikuly jsou duté systémy kulového tvaru, skládající se z dvojvrstev. Základní složkou utvářející vezikul jsou dvouřetězcové amfifilní molekuly [16]. Termínem amfifilní nebo také amfipatická molekula se rozumí látka skládající se jak z hydrofilní, tak hydrofobní části. Takový charakter mají např. fosfolipidy. Jedná se o hlavní složky buněčných membrán, které jsou schopny se samo uspořádat do tzv. lipidových vezikul zvaných lipozomů. Jsou využívány zejména ve farmacii k modifikaci adsorpce léčiva, prodloužení jejich biologického poločasu nebo ke snížení toxicity a metabolismu [17,18,19].

Kromě fosfolipidů se ke tvorbě vezikul mohou využívat i další látky, včetně výše zmíněných povrchově aktivních látek a to vytvořením tzv. iontově amfifilního páru (IPA z angl. *ion pair amphiphile*). Jedná se o molekulární komplex složený z kationtových i aniontových amfifilních látek. Díky opačným nábojům spolu hydrofilní části molekul drží pohromadě prostřednictvím elektrostatických sil a utvářejí tak tzv. pseudo dvouřetězcovou strukturu, připomínající fosfolipid (Obrázek 7) [20]. Struktury tvořené z iontově amfifilních párů se nazývají kataniontové vezikulární systémy, (Obrázek 8) a slouží jako lipozomové náhražky, které mají velký potenciál zejména v kosmetice a farmaceutických aplikacích [16,21].



Obrázek 7: Ukázka struktury PAL, IPA a fosfolipidu.

Kataniontové vezikulární systémy jsou oproti lipozomům vysoce chemicky stabilní vůči hydrolyze. Na druhou stranu ale vykazují nižší fyzikální stabilitu. Pro zlepšení jejich fyzikální stability se využívá jak intervezikulárních, tak intravezikulárních modifikací [16]. Příkladem intervezikulární úpravy je zavedení dalšího nabitého dvou řetězcového amfifilu do struktury IPA. Takovou látkou může být například výše zmíněný DODAC. Tímto získají vezikuly stejný náboj, budou se odpuzovat, tudíž nebude docházet k agregaci a jejich stabilita tak bude zvýšena [22]. Intravezikulární modifikace může být dosaženo zavedením stabilizačních látek. Takovou látkou je například cholesterol, který zvyšuje nejen stabilitu, ale i mechanické vlastnosti systémů [23].



Obrázek 8: Tvorba katanionového vezikulu.

Fosfolipidová membrána se při dané teplotě může vyskytovat buď v pevné nebo kapalné fázi. V pevné fázi jsou alkylové řetězce více uspořádány, zatímco v kapalné méně. Přidání cholesterolu do kapalné neuspořádané fáze může indukovat uspořádání sousedních alkylových řetězců, což vede ke zvýšení stability membrány [24]. Naopak přidání cholesterolu do pevné uspořádané fáze, naruší jejich shlukování. Membrány tvořeny pomocí IPA vykazují podobné fázové chování, jako membrány z fosfolipidových dvojvrstev [25]. Přidávky cholesterolu také vyvolávají podobné účinky na fázové a mechanické vlastnosti [26]. Nedávné studie také ukázaly, že přidáním cholesterolu ke kataniontovým vezikulárním systémům dochází ke zvyšování jejich stability pravděpodobně v důsledku vymizení lokální separace fází [27].

Výhodou kataniontových vezikulárních systémů oproti lipozomům je jejich snadná dostupnost, zejména pak díky jejich nižší ceně. Díky vysoké kombinovatelnosti různých druhů tenzidů jsou pak

i poměrně snadné na přípravu. Na druhou stranu ale představují komplikace při jejich využití ve farmaceutickém průmyslu, a to díky jejich možné toxicitě. Jednou z možností, jak zvýšit biokompatibilitu těchto systémů je přidavek dalšího stabilizačního prvku, jako je například polysacharid hyaluronan [28].

## 2.2 Hyaluronan

Hyaluronan, také kyselina hyaluronová (HA) je vysokomolekulární lineární biopolysacharid. Poprvé byl objeven roku 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v očním sklivci skotu. Nalezneme ho ve většině pojivových tkání obratlovců, nejvíce pak zejména v synoviální tekutině, očním sklivci, pupečníku či hřebenu kohoutů v různých koncentracích a s různými molekulovými hmotnostmi. Je syntetizován třídou membránových proteinů zvanou hyaluronansyntázy a degradován hyaluronidázami. Přirozeně se vyskytuje u živočichů, kde plní důležité biologické funkce, jako je udržování viskoelastivity, hydratace a transport vody. Můžeme ho také nalézt i u řady bakterií [29].

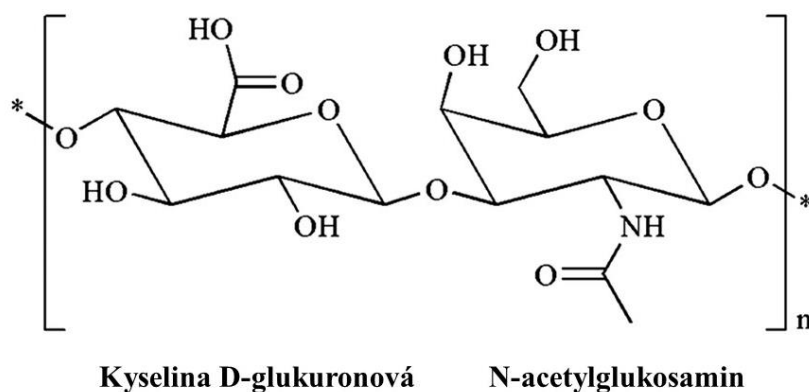
### 2.2.1 Historie

Jak již bylo zmíněno, hyaluronan byl poprvé objeven roku 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Tuto, předtím neznámou látku, izolovali ze sklivce oka skotu. Název byl poté odvozen kombinací dvou slov, a to řeckým slovem hyalos, což v překladu znamená sklo a kyseliny uronové, což je jedna ze dvou molekul, ze kterých je HA složena. [29].

K první aplikaci hyaluronanu u člověka došlo na konci 50. let 20. století, kdy byl použit jako náhrada sklivce při operaci očí. Aplikovaný hyaluronan byl izolován z lidské pupečnickové šňůry a kohoutích hřebínků [29].

### 2.2.2 Struktura a vlastnosti

Primární struktura kyseliny hyaluronové je tvořena ze dvou opakujících se sacharidových jednotek, a to z N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronové (Obrázek 9). Tyto dva monomery jsou spolu navzájem spojeny pomocí  $\beta(1-4)$  a  $\beta(1-3)$  glykosidických vazeb [30].

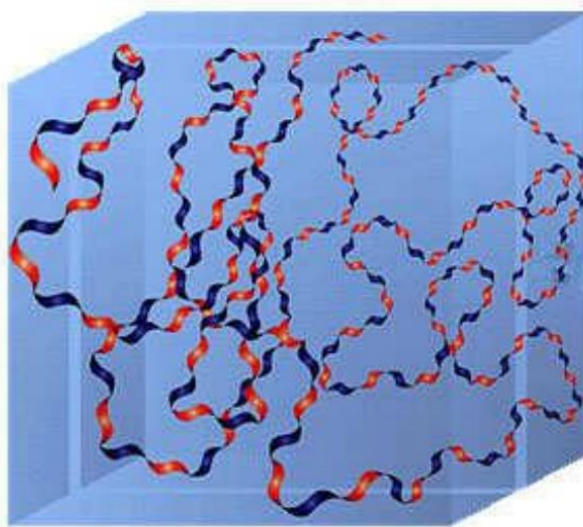


Obrázek 9: Primární struktura hyaluronanu [29].

Hyaluronsyntázy vytvářejí lineární polymery opakujícího se disacharidu střídavým přidáváním kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu k rostoucímu řetězci. Počet opakujících se disacharidových jednotek ve finální molekule může dosahovat více než 10 000 a molekulová hmotnost až 4 milionů Daltonů. Pokud by byla molekula hyaluronanu o velikosti 10 000 sacharidových jednotek natažena, může nabývat velikosti až 10  $\mu\text{m}$ , což je přibližně stejná velikost jako průměrný rozměr erytrocytu člověka [29].

Hyaluronan je přirozeně záporně nabitou molekulou (díky karboxylovým skupinám), což jí umožňuje na sebe vázat velké množství vody a vytvářet tak vysoce viskózní gel [31]. V roztoku se molekula hyaluronanu uspořádává tak, že objemné části molekuly jsou v ekvatoriální rovině,

zatímco malé vodíkové atomy v axiální. Axiální atomy vodíku tak vytvářejí relativně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální část tvořená postranními řetězci je polární. Díky tomuto uspořádání se tak vytváří zkroucenou stuhovitou strukturu [29] (Obrázek 10).



Obrázek 10: Zkroucená stuhovitá struktura hyaluronanu v roztoku [32].

Roztoky hyaluronanu vykazují poměrně neobvyklé reologické vlastnosti, jsou mazlavé a vysoce hydrofilní. Polymerní řetězce jsou tvarovány do náhodného klubka a vzájemně se tak proplétají. Při vyšších koncentracích mají vysokou viskozitu (1% roztok se chová jako želé), poté co jsou ale vystaveny tlaku se jejich viskozita snižuje, mohou tak být snadno aplikovatelné pomocí jehly s malým otvorem. Díky těmto vlastnostem se hyaluronan řadí mezi tzv. pseudoplastické materiály [29].

### 2.2.3 Biotechnologická produkce

Díky tomu, že se jedná o biokompatibilní, viskoelastickou látku schopnou vysoké retence vody je hyaluronan důležitou součástí nejen farmaceutických, ale také biomedicínských a kosmetických produktů. Z tohoto důvodu je jeho produkce poměrně vysoká v celosvětovém měřítku. V současné době se pro získání hyaluronanu používají dva výrobní procesy. Jedná se o extrakci ze zvířecí tkáně, zejména pak kohoutích hřebínků a bakteriální produkci za využití bakterie rodu *Streptococcus*. V posledních letech ale dochází ke zpochybnění obou metod, a to zejména díky obavám ohledně jejich bezpečnosti, ať už produktů pocházející ze živočichů nebo bakterie *Streptococcus*, známého patogenu, jenž produkuje celou řadu endotoxinů. Proto byly navrženy některé alternativní metody přípravy, a to její generace prostřednictvím bezbuněčného systému, čímž by došlo ke snížení nejen nákladů na čištění, ale také možné kontaminace, popřípadě využití geneticky upravených mikroorganismů neprodukcující endotoxiny [31].

### 2.2.4 Aplikace

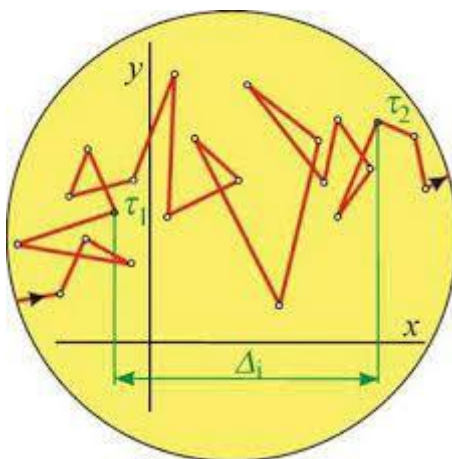
Hyaluronan se díky své viskózní gelovité struktuře využívá jako lubrikant. Proto se vyskytuje zejména na povrchu tkání, kde slouží jako tlumič nárazů. Díky své biokompatibilitě, neimunogenním a viskoelastickým vlastnostem se hojně využívá také v biomedicíně pro podání léčiva, v oční chirurgii, tkáňovém inženýrství nebo při léčbě osteoartrózy. Své uplatnění také nachází v kosmetice, kde se využívá jako dermální výplň nebo jako zvlhčovač. Kromě výše zmíněných poznatků je hyaluronan také rozpoznán systémem jako signální molekula, a je tak zapojen do celé řady biologických procesů. Hraje tak důležitou roli v mnoha pochodech, jako je zánět, tumorigeneze nebo abnormální imunitní odpověď [31]. Také bylo prokázáno, že lubrikační vlastnosti hyaluronanu snižují pooperační stavy tvorby adhezí po břišních a ortopedických operacích [29].

Využití hyaluronanu také závisí na jeho molekulové hmotnosti. Například vysokomolekulární hyaluronan (více než 10 kDa) je žádoucí pro produkty používané v oftalmologii, ortopedii, kosmetice či tkáňovém inženýrství, zatímco nízkomolekulární (do 5 kDa) nachází své uplatnění při produkci látek, které podporují angiogenezi, inhibují nárůst nádorů či indukují expresi zánětlivých reakcí [31].

## 2.3 Tepelný pohyb částic

Kationoté systémy spadají díky své velikosti mezi koloidní částice, které vykonávají tzv. tepelný pohyb. Částice nacházející se v roztoku je obklopena molekulami disperzního prostředí. Tyto molekuly vykonávají neustálý translační tepelný pohyb a narážejí tak do disperzní částice, která v důsledku toho také začne provádět tepelný pohyb. Díky tomu, že molekuly narážejí do částice všemi směry, je tak pohyb částice čistě nahodilý. Takovýto pohyb částic se nazývá Brownův. Intenzita pohybu částice záleží zejména na teplotě a velikosti (hmotnosti) částice. S rostoucí teplotou roste také pohyb, naopak s rostoucí velikostí (hmotností) intenzita tepelného pohybu klesá. U částice s průměrem větší než 4  $\mu\text{m}$  již není tepelný pohyb pozorován [33].

Určit skutečnou délku dráhy částice není ve své podstatě možné, díky tomu, že dochází k častým změnám její rychlosti i směru. Můžeme pouze pozorovat změnu polohy částice v určitých časových intervalech a získat tak tzv. plošnou projekci pohybu částice (Obrázek 11) [33].



Obrázek 11: Znázornění dráhy částice a středního posuvu [33].

Veličina charakterizující intenzitu tepelného pohybu se nazývá střední posuv  $\bar{\Delta}_i$ . Jedná se o kvadratický průměr všech posuvů vykonaných jednou částicí ve stejných, za sebou jdoucích intervalech  $n$  (2.2) [33]:

$$\bar{\Delta}_i = \sqrt{\frac{\Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \Delta_3^2 + \dots}{n}} \quad (2.2)$$

Tepelný pohyb se v makroskopickém rozměru projevuje jako difuze [33].

### 2.3.1 Difuze

Difuze je děj, při němž dochází v soustavách s koncentračním gradientem k samovolnému vyrovnání koncentrací. Disperzní částice se nacházejí v disperzní soustavě v určitém vyhrazeném objemu. Postupem času, vlivem difuze, tento objem opouští a rozprostřou se do celého objemu soustavy. Jestliže máme dva systémy o různé koncentraci – systém A s koncentrací  $c_1$  (vlevo) a systém B o menší koncentraci  $c_2$  (vpravo), pak díky tepelnému pohybu bude docházet k přechodu určitého množství částic látky A úměrné koncentraci  $c_1$  zleva doprava. Zároveň ale ve stejnou dobu bude docházet k i přechodu látky B v opačném směru. Látky budou difundovat tak dlouho, dokud nedojde k vyrovnání jejich koncentrací [33].

Rychlost samotné difuze, je pak charakterizována pomocí difuzního toku  $J_i$ . Jedná se o látkové množství difundující složky prošlé jednotkovým průřezem kolmým ke směru difuze za jednotku času. Vztah mezi intenzitou difuzního toku a koncentračním gradientem pak popisuje 1. Fickův zákon (2.3), který nám říká, že difuzní tok je přímo úměrný zápornému gradientu koncentrace. A tedy:

$$J_i = -D_\tau \cdot \frac{dc_i}{dx}, \quad (2.3)$$

kde  $x$  je prostorová souřadnice ve směru koncentračního spádu,  $c_i$  je koncentrace částic a  $D_\tau$  je tzv. difuzní koeficient. Difuzní koeficient je látkové množství difundující látky  $i$ , která projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Závisí nejen na vlastnostech samotné difundující látky, ale také na vlastnostech prostředí [33].

První Fickův zákon platí, jestliže se jedná o tzv. stacionární difuzi, a tedy, že se koncentrace s časem nemění. Pokud se ale koncentrační gradient  $dc_i/dx$  s časem mění, mění se zároveň i difuzní tok s polohou a jedná se o tzv. nestacionární difuzi. Zde potom platí 2. Fickův zákon (2.4) [33]:

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D_\tau \cdot \frac{d^2 c_i}{dx^2} \quad (2.4)$$

Měření difuzního koeficientu může být provedeno dvojím způsobem. První metodou, využívanou spíše v minulosti, je měření rychlosti difundující látky přes porézní přepážku. Tímto způsobem se analyzují spíše nízkomolekulární látky. Druhou, častější, metodou je měření volné difuze látek. Tento způsob je založen na pozorování difundující látky a rozpouštědla v daných časových intervalech. Difundující látka a rozpouštědlo přitom musí být v takovém kontaktu, že mezi nimi dojde k vytvoření ostrého koncentračního rozhraní. Celý systém musí být udržován při konstantní teplotě a musí být chráněn před otřesy. Po určitém čase se zjistí nové rozdělení koncentrací, ke které došlo v důsledku difuze. Z výsledku se pak následně vypočítá difuzní koeficient. Stanovení nového rozdělení koncentrací může být provedeno buď vizuálním sledováním, a to například charakteristickou změnou barvy, nebo měřením absorpce světla či indexu lomu. Nejnovější metody jsou založeny na měření kvazielastického rozptylu světla (viz. kapitola 2.4), kdy v důsledku nahodilého tepelného pohybu dochází k rozptylu světla částicemi, a tím ke změně vlastností oproti původnímu paprsku [33].

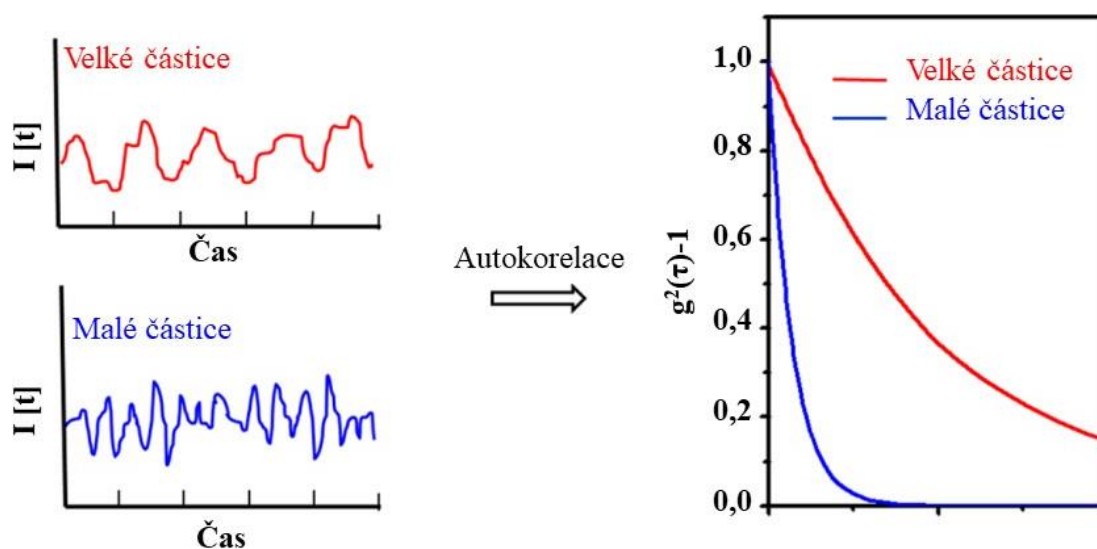
## 2.4 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS z angl. *dynamic light scattering*), také znám pod názvem fotonová korelační spektroskopie (PCS z angl. *photon correlation spectroscopy*) nebo kvazielastický rozptyl světla je technika využívaná k určení velikosti, distribuce velikosti a tvaru částic v suspenzi. Využívá se zde zejména výše zmíněného Brownova pohybu a Dopplerova jevu vyvolaných pomocí laserového paprsku [34,35]. Po dopadu monochromatického laserového paprsku na částice v roztoku, dochází ke změně vlnové délky odraženého světla. Tomuto jevu se říká Dopplerův jev, a právě díky němu jsme schopni získat informace o velikosti, distribuci velikosti, tvaru a struktuře analyzovaných částic [36,37,38].

Rozptyl světla je běžný optický jev, ke kterému dochází v důsledku interakce elektromagnetického světelného paprsku s hmotou. Když světlo narazí na překážku, dochází k jeho rozptylu [39]. Rozlišujeme dva druhy rozptylu světla, a to statický a dynamický. Při statickém je intenzita analyzována jako časově zprůměrovaná hodnota při různých úhlech rozptylu [40], která nám může poskytovat informace o molekulové hmotnosti. Naopak při dynamickém rozptylu světla se sleduje časová závislost fluktuace intenzity [41]. Časová závislost intenzity rozptylu vyplývá ze skutečnosti, že koloidní částice v suspenzi nejsou stacionární, ale pohybují se nahodilým způsobem [40].



Metodou DLS se tak měří časový záznam fluktuací intenzity rozptýleného záření. Tyto fluktuace jsou způsobeny právě Brownovým pohybem částic a souvisí s jejich difuzním koeficientem. Malé částice difundují v roztoku relativně rychle, čímž dochází k tvorbě rychle fluktuujícího signálu. Naopak u větších částic, které difundují prostředím pomaleji, nejsou fluktuace tak velké. Kvantitativní informace týkající se časového záznamu fluktuací intenzity rozptýleného záření, se získají zpracováním naměřeného signálu pomocí tzv. autokorelace. Vše můžeme vidět na následujícím obrázku (Obrázek 12) [40].



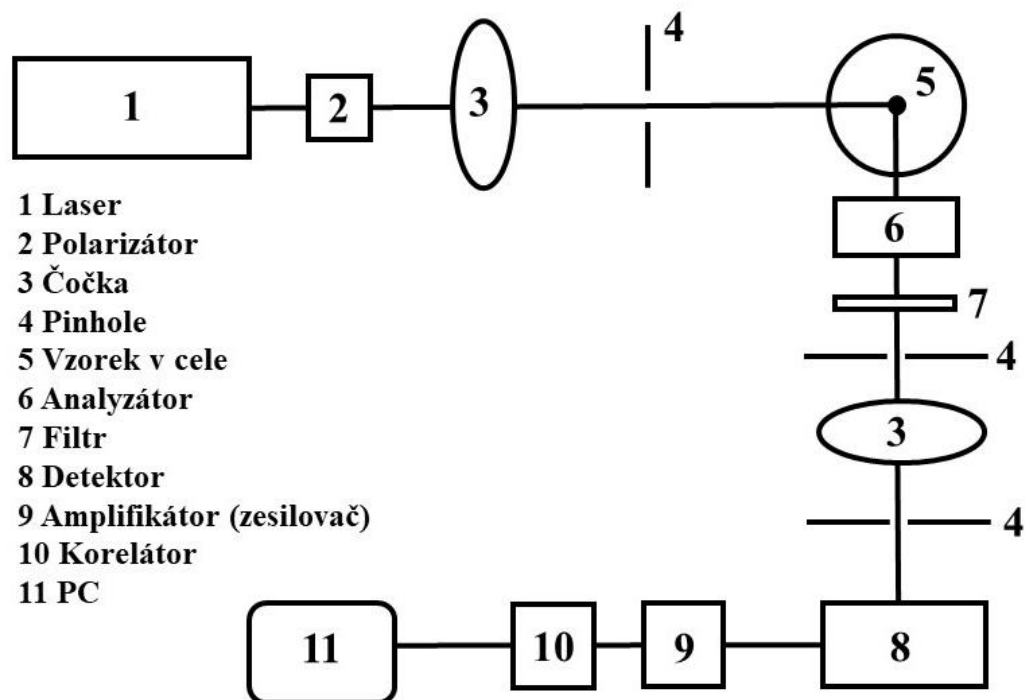
Obrázek 12: Znárodnění fluktuace intenzity pro různé velikosti částic a odpovídající autokorelační funkce [40].

Jak již bylo řečeno, DLS sleduje nahodilý pohyb částic, které jsou suspendovány v kapalném médium. Rychlost částice při Brownově pohybu je definována jejím translačním difuzním koeficientem  $D_\tau$ . Tento koeficient lze následně využít k získání tzv. hydrodynamického poloměru částice. Hydrodynamický poloměr, nebo také Stokes-Einsteinův či Stokesův poloměr je poloměr hypotetické koule, která má stejný difuzní koeficient jako zkoumaná částice [39]. Celý vztah popisuje Stokes-Einsteinova rovnice (2.5):

$$D_\tau = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (2.5)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta ( $1,380 \cdot 10^{-23} \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  je termodynamická teplota,  $\eta$  je dynamická viskozita a  $R_h$  je hydrodynamický poloměr [41].

Instrumentace DLS je poměrně jednoduchá. Přístrojové vybavení je snadno dostupné, nenákladné a snadné na údržbu [42]. Samotný přístroj je složen z několika základních komponent. Jedná se zejména o zdroj světla, optický systém, detektor a korelátor. Nejčastěji využívaným zdrojem světla jsou lasery, z nich nejběžněji používané jsou zejména He-Ne či argonové. Laserový paprsek prochází čočkou, pomocí níž je zaměřen do vzorku. Ten je uzavřen v teplotně kontrolované cele. Světlo rozptýlené ze vzorku je následně pomocí dalších čoček zaostřeno na detektor, nejčastěji fotonásobič, pod úhlem v rozsahu 10 až 160°. Tento úhel je vybrán programem dle typu experimentu. Kromě fotonásobičů také mohou být využity lavinové fotodiody. Výstup z fotonásobiče je následně zesílen a odeslán do korelátoru, kde dojde pomocí autokorelační funkce k převodu surových dat na kvantitativní informace [43,44]. Vše znázorňuje Obrázek 13.



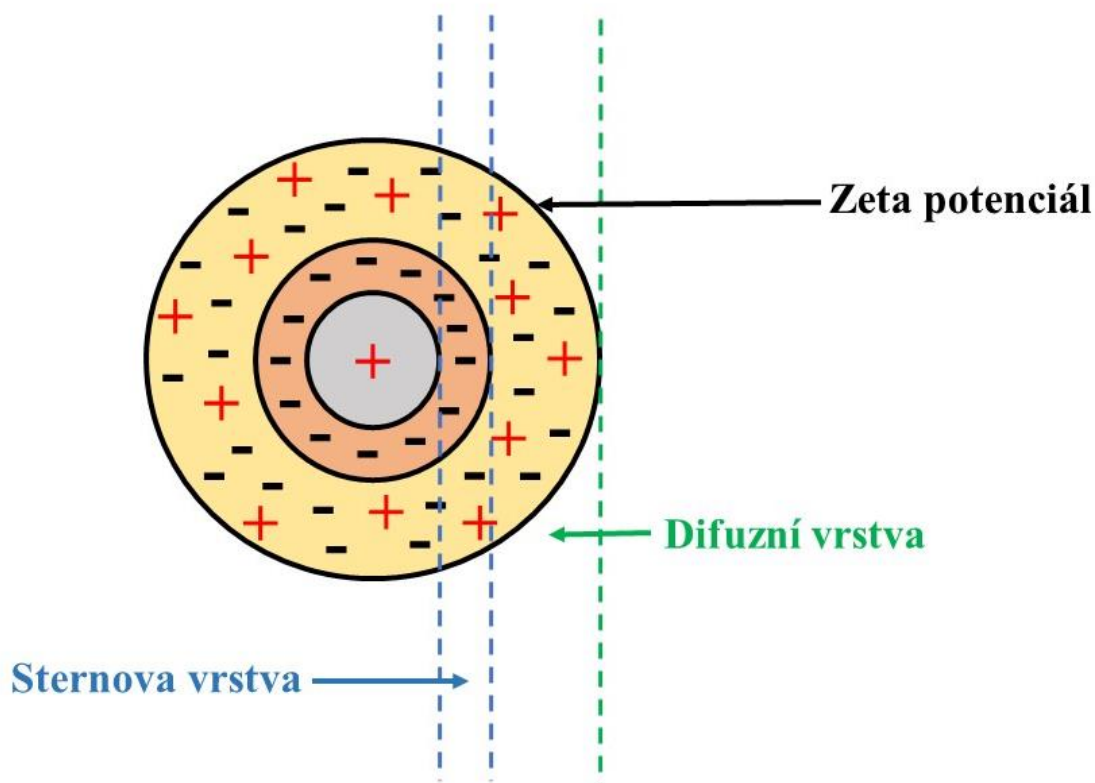
Obrázek 13: Schéma DLS instrumentace [43].

## 2.5 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla (ELS z angl. *electrophoretic light scattering*) je metoda využívaná pro charakterizaci povrchového náboje koloidních systémů, a to prostřednictvím zeta potenciálu  $\zeta$  [45].

Nanočástice rozptýlené v kapalině okolo sebe vytvářejí tzv. elektrickou dvojvrstvu, tvořenou z vnitřní a vnější vrstvy. Ve vnitřní vrstvě, zvané Sternova, jsou ionty silně vázány k povrchu nabitých částic pomocí adsorpčních a elektrostatických sil. Naopak vnější vrstva, zvaná difuzní, je tvořena pohyblivými protionty vázajícími se slabšími silami (Obrázek 14). Je-li centrální částice nabitá kladně, Sternova vrstva je tvořena záporně nabitými ionty. Difuzní vrstva je pak tvořena tak, že v těsné blízkosti Sternovy vrstvy je největší koncentrace aniontů, naopak koncentrace kationtů je minimální. S rostoucí vzdáleností klesá koncentrace aniontů, a naopak koncentrace kationtů roste. Postupně tak dochází k jejich vyrovnání. Na povrchu difuzní vrstvy se pak vytváří potenciál zvaný zeta potenciál [46].

Měření zeta potenciálu umožňuje získání informace o stabilitě koloidních systémů. Mezní hodnoty rozhodující o stabilitě či nestabilitě systému jsou  $+30$  mV a  $-30$  mV. Částice se zeta potenciálem v rozmezí  $-30$  mV až  $+30$  mV se považují za nestabilní, zatímco částice s hodnotami mimo tento interval se vyznačují svojí stabilitou [46].



Obrázek 14: Schéma elektrické dvojvrstvy [47].

V praxi je zeta potenciál získán měřením elektroforetické mobility materiálů (částic) dispergovaných v médiu [47]. Zeta potenciál pak následně může být vypočítán pomocí Smoluchovského rovnice (2.6):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu}{\epsilon}, \quad (2.6)$$

kde  $\epsilon$  je dielektrická konstanta rozpouštědla,  $\eta$  je viskozita prostředí a  $\mu$  je výše zmíněná elektroforetická mobilita [48]. Hodnota je závislá na vlastnostech daného systému včetně velikosti částic, koncentrace iontů, pH nebo vodivosti média [47].

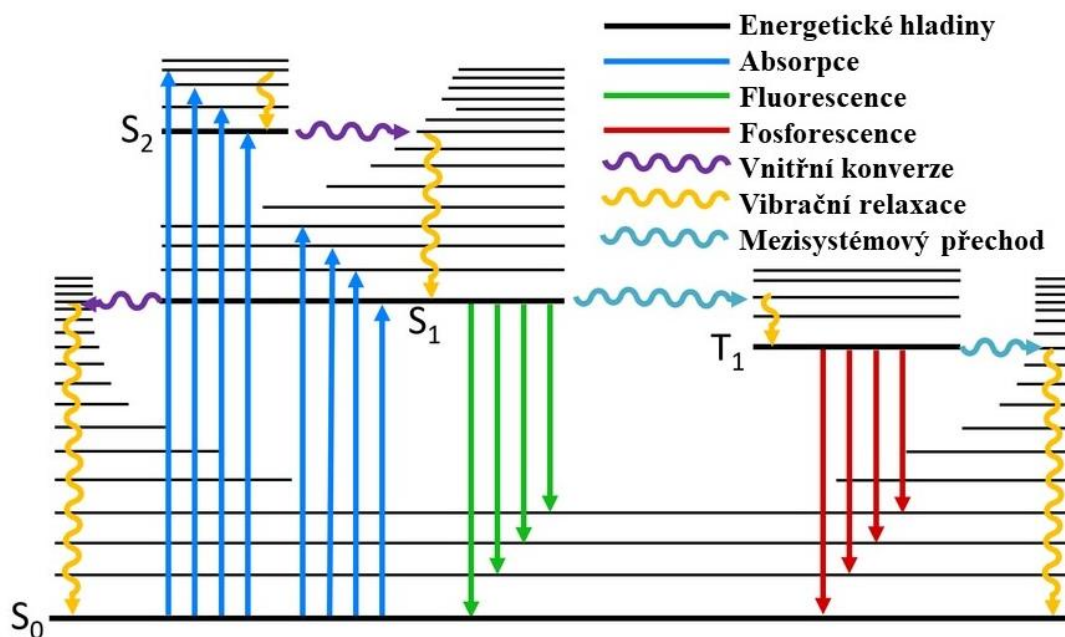
## 2.6 Fluorescenční spektroskopie

Další metodou pro studium koloidních systémů je fluorescenční spektroskopie. Jedná se o často využívanou techniku, zejména pro studium konformace a dynamiky nejen koloidních systémů, ale i makromolekul a celé řady nízkomolekulárních sloučenin [49]. Jako většinu biofyzikálních metod lze fluorescenční spektroskopii provádět na mnoha úrovních. Jedná se zejména o klasické měření fluorescence v ustáleném stavu či o náročnější metody jako jsou časově rozlišené studie [50].

### 2.6.1 Fluorescence

Některé molekuly se po absorpci UV světla či světla viditelného dostávají do elektronicky excitovaného stavu, kde setrvávají po určitou dobu a následně se vrací zpět do stavu základního za současné emise fotonů, přičemž energie emitovaných fotonů je odlišná od energie absorbované. Tento jev se nazývá fotoluminiscence. Existují dva typy fotoluminiscence – fluorescence a fosforescence. Tyto dva jevy se liší způsobem, jakým deaktivují excitovanou molekulu [51].

U fluorescence se molekuly dostávají do excitovaných singletových stavů. V těchto stavech je elektron v excitovaném orbitalu spárován s druhým elektronem v orbitalu základního stavu s opačným spinem. Díky tomu je návrat z excitovaného stavu do stavu základního povolen a děj tak probíhá velmi rychle. Emisní rychlost fluorescence se řádově pohybuje okolo  $10^8 \text{ s}^{-1}$  a typická doba životnosti fluorescence (průměrná doba mezi excitací a návratem do základního stavu) je okolo 10 ns. Fosforescence je emise světla z tripletových excitovaných stavů, kde má elektron v excitovaném orbitalu stejný spin jako elektron v základním stavu. Návrat do základního stavu je tak zakázán a rychlost emise je mnohem pomalejší. Řádově se pohybuje okolo  $10^3$  až  $100 \text{ s}^{-1}$ . Doba života fosforescence je pak v rozmezí milisekund až sekund [52]. Pro popis procesů se nejčastěji využívá Perrin-Jabloňského diagram (Obrázek 15).



Obrázek 15: Perrin-Jablonského diagram [53].

Většina molekul se při pokojové teplotě nachází na nejnižší vibrační energetické hladině základního singletového stavu  $S_0$ . Po absorpci fotonu dochází k excitaci elektronu na jednu z vibračně excitovaných hladin vyšších singletových stavů  $S_1$ ,  $S_2$  (či vyšších). Tento proces je velmi rychlý, řádově  $10^{-15}$  s. Přejechy tohoto druhu jsou typické u složitějších molekulárních systémů, zejména pak u látek obsahující atomy s volným elektronovým párem (kyslík, dusík) nebo pro látky obsahující aromatické nebo alifatické konjugované nenasycené systémy. Následně dochází k tzv. vibrační relaxaci ( $10^{-12}$  až  $10^{-10}$  s). Jedná se o proces, kde se excitovaná molekula dostává na základní energetickou hladinu singletového stavu  $S_1$ . Jestliže byla molekula vyexcitována do vyšších energetických stavů ( $S_2$  a výše) dochází nejprve k tzv. vnitřní konverzi ( $10^{-11}$  až  $10^{-9}$  s), kdy dochází k přechodu do singletových hladin  $S_1$ . Ze základní hladiny singletového stavu  $S_1$  pak může molekula pokračovat dvěma směry. Může se buď vrátit zpět do základní energetické hladiny  $S_0$  za současné emise záření – fluorescence, nebo nejprve přejde ze základní singletové hladiny  $S_1$  do tripletového stavu  $T_1$  procesem zvaným mezisystémový přechod ( $10^{-10}$  až  $10^{-8}$  s). Následně se opět vrací na základní energetickou hladinu  $S_0$ . Tento proces se nazývá fosforescence. Fluorescence a fosforescence jsou procesy patřící mezi tzv. zářivé přechody, zatímco vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémový přechod spadá do přechodů nezářivých [51,54].

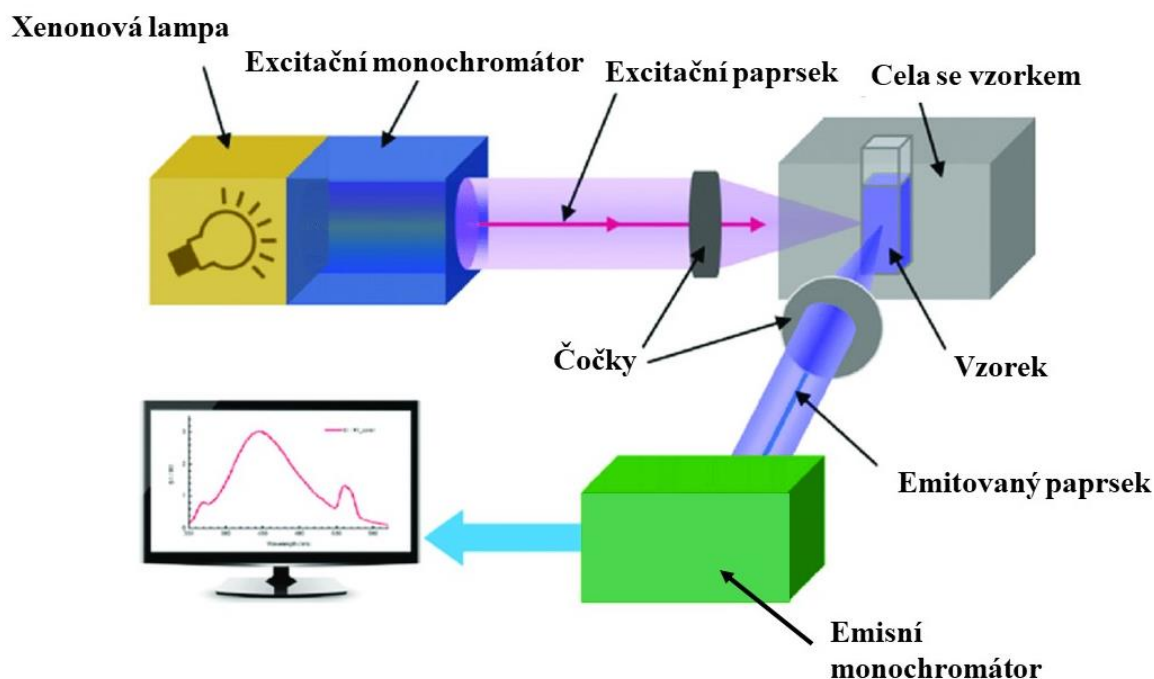
## 2.6.2 Instrumentace fluorescenční spektroskopie

Přístroje sloužící pro měření intenzity fluorescence, doby života či polarizace se nazývají spektrofluorimetry. Typický spektrofluorimetr je složen z několika hlavních součástí, mezi které patří zdroj světla, držák vzorku, optické prvky, detektory a systémy zpracovávající signál z detektoru [55]. Nejběžněji používané zdroje světla jsou vysokotlaké xenonové lampy. Tyto lampy představují kontinuální zdroj světla a poskytují intenzitu v širokém spektrálním rozsahu od 250 do 700 nm. Využívají se zejména pro měření časově ustálené fluorescence. Pro měření časově rozlišné fluorescence se více používají pulzní zdroje světla [56].

Další nezbytnou součástí jsou monochromátory. Jedná se o zařízení, které způsobují rozptýlení polychromatického světla do jednotlivých vlnových délek. Dochází tak k vytvoření spektra, kdy dále pokračuje pouze světlo o vybrané vlnové délce. K rozptylu může docházet buď pomocí hranolů nebo difrakční mřížky. V současné době se využívá spíše difrakčních mřížek než hranolů [56].

Kromě monochromátorů je také důležité využívat i optických filtrů. Rozlišujeme jich několik druhů. První skupinou jsou tzv. low-pass filtry, které propouští pouze světlo o kratší vlnové délce, než je zvolená hodnota. Dále se jedná o high-pass filtry. Zde je naopak propouštěno světlo o delší vlnové délce, jak zvolená hodnota. Třetím typem jsou pásmové filtry (band-pass) propouštějící určitý rozsah vlnových délek [56].

Posledním prvkem využívaným pro měření fluorescence jsou detektory. Jako vysoce citlivé detektory se pak využívají zejména fotonásobiče [55].

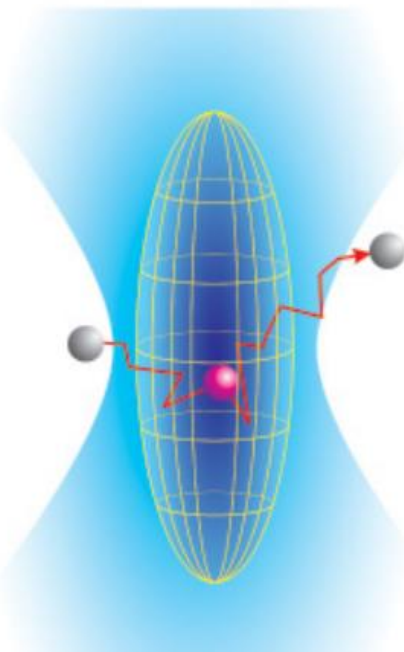


Obrázek 16: Schéma spektrofluorimetru [57].

Na Obrázku 16 můžeme vidět schéma spektrofluorimetru. Světlo ze zdroje dopadá na excitační monochromátor, kde je rozděleno na jednotlivé vlnové délky. Dále prochází jen světlo o vybrané vlnové délce, které dopadá na vzorek. Záření emitované vzorkem se rozptyluje ve všech směrech, nicméně sběr dat probíhá pod úhlem  $90^\circ$ , aby se minimalizovaly účinky rozptylu a transmitance excitačního světla. Emisní paprsek je následně rozložen emisním monochromátorem a vybraná vlnová délka je zaostřena do fotonásobiče [58].

### 2.6.3 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS z angl. *fluorescence correlation spectroscopy*) je mikroskopická metoda, ve které je v průběhu času pozorována fluktuace intenzity fluorescence. Ta pochází z molekul nacházejících se v malém pozorovacím objemu a je způsobena různými molekulárními procesy, jako jsou chemické reakce, rotační a translační difuze nebo vazebnými procesy [59]. Na Obrázku 17 můžeme vidět znázornění právě takovéto molekuly, pohybující se přes pozorovaný objem a způsobující tak zmíněnou fluktuaci intenzity. Tato intenzita je pak následně korelována za účelem získu informací týkajících se analyzovaného systému. Jedná se především o koncentraci a rychlost difuze částic [60,61].



Obrázek 17: FCS pozorovací objem [62].

Stejně jako ostatní fluorescenční techniky je metoda FCS nedestruktivní. Měření jsou vysoce citlivá a lze je tak provádět na úrovni jedné molekuly [60]. I z tohoto důvodu se volí velmi malé pozorovací objemy, typicky řádově femtolitry. Zároveň se tímto také zvyšuje poměr signálu k šumu [63].

Na rozdíl od jiných dynamických metod se také může měřit ve větším časovém rozsahu (od nanosekund až po sekundy) [63]. Na druhou stranu je metoda komplikována mnoha faktory, jako je pohyb molekul nebo fotovybělování fluoroforu. Kromě toho, že se FCS omezuje pouze na mobilní vzorky, je také nutné pečlivě zvážit výběr fluoroforů, a to tak, aby došlo k minimalizování efektu fotovybělení. Zároveň je také důležité využít pouze určité koncentrační rozsahy (jedna fluorescenční částice na pozorovaný objem). Příliš nízký nebo naopak příliš vysoký výběr koncentrace vyžaduje pro spolehlivou analýzu velmi dlouhé doby pozorování [60].

#### 2.6.3.1 Počátky fluorescenční korelační spektroskopie

Počátky fluorescenční korelační spektroskopie se kladou do 70 let 20. století, přesněji do roku 1972. Na jejím vzniku se podílely dvě skupiny. Jedna z Cornellovy univerzity v New Yorku (Ithaca) a druhá z Karolinského institutu ve Stockholmu. Skupina z Ithacy se zaměřila na laterální difuzi a kinetiku chemických reakcí, zatímco skupina ze Stockholmu se zabývala rotační difuzí. Jednou z původních motivací pro FCS bylo studium mechanismu rozplétání DNA. Experiment byl zaměřen na měření fluktuace fluorescence způsobených vazbou a uvolněním ethidium bromidu (EB) na DNA. Nejprve byla pro tento experiment využita metoda dynamického rozptylu světla, nicméně záhy bylo zjištěno, že ačkoliv je tato metoda ideálním přístupem pro měření molekulárního transportu, pro měření

průběhu chemických reakcí už tak ideální není. Tohle poznání vedlo k myšlence použít více chemicky citlivější parametry pro indikaci reakčních procesů a tou byla právě fluorescence. Původní experiment byl proveden za pomoci optické lavice [64].

Myšlenka analyzovat dynamické chování molekul v roztoku měřením fluktuace fluorescence v rámci definovaného pozorovacího objemu byla sice navržena již v roce 1972, nicméně praktickým nástrojem pro výzkum molekulární dynamiky se stala až od 90. let 20. století. Aplikaci FCS na biologické systémy bránila řada faktorů. Tyto faktory souvisely zejména s přístrojovým vybavením, jako byla stabilita laserového osvětlení, citlivost detektoru nebo velikost pozorovacího objemu [62].

Od té doby došlo ke značným pokrokům a k překonání těchto omezení. Díky tomu se dospělo k značným rozšířením aplikací FCS, zejména pak k umožnění intracelulárního měření v živých buňkách. Hlavním pokrokem byl zejména vývoj konfokálních a dvoufotonových optických technik pro definování malých pozorovacích objemů. První FCS instrumentace využívající konfokální optiku k definování pozorovacího objemu byla představena roku 1993 od Rigler et al, instrumentace využívající dvoufotonových optických technik pak roku 1995 od Berland et al. Současné konfokální a dvoufotonové FCS přístroje jsou schopny měřit fluktuace fluorescence v pozorovacích objemech menších než 1 femtolitr [62].

### 2.6.3.2 Konstrukce FCS přístroje

FCS experimenty vyžadují velmi účinnou detekci fluorescence z velmi malého objemu vzorku a rychlý výpočet autokorelace detekovaného signálu. Proto musí konstrukce FCS přístroje splňovat určité požadavky. Zejména se pak jedná o následující kroky: (1) excitace velmi malé oblasti vzorku; (2) sběr fluorescenčního signálu z této oblasti; (3) filtrace excitačního záření, rozptýleného světla a fluorescence pozadí; (4) zaostření fluorescence do tzv. pinhole; (5) detekce fluorescence pomocí vysoce účinného detektoru a (6) rychlý výpočet autokorelační funkce získaného signálu [65].

Nejvíce využívanými zdroji excitace jsou lasery. Pro jedno fotonové experimenty se mohou používat kontinuální lasery s nízkým výkonem (do 1 mW). Příkladem je helium neonový laser neboli He:Ne laser (vlnové délky od 540 nm do 610 nm). Dále se jedná o argonový iontový laser (488 nm až 510 nm). Tyto dva zdroje jsou schopny pokrýt excitační spektra běžně využívaných fluorescenčních barviv. Pro více fotonové experimenty jsou žádoucí lasery pulzní. Jedním z nich je titan-safírový laser. Ten poskytuje femtosekundové pulzy v širokém rozsahu vlnových délek (700 až 1000 nm) [65].

Fluorescence ze vzorku je shromažďována pomocí čočky mikroskopu (stejně čočky se využívá i při excitaci). Obvykle se zde používají čočky s vysokou numerickou aperturou. Důvodem je fakt, že čím větší je numerická apertura, tím efektivněji dochází ke sběru fluorescence. Proto se zde nejčastěji setkáme s vodní imerzí (1,2 NA) nebo s imerzí olejovou (1,3 NA) [65].

Shromážděná fluorescence musí být následně oddělena od dráhy excitačního světla a nasměrována do detektoru. K tomuto kroku slouží dichromatické zrcadlo. Jedná se o optické zařízení, které propouští pouze určitý rozsah vlnových délek, přičemž záření, které nespadá do tohoto rozsahu je odraženo. Zbývající excitační fotony, které nebylo zrcadlo schopno zachytit, jsou následně odfiltrovány pomocí tzv. bandpass interferenčního filtru. Výběr dichromatického zrcadla i interferenčního filtru musí být proveden velmi pečlivě. Nejenže musí dojít k účinnému odstranění excitačního záření a snížení intenzity fluorescence pozadí. Zároveň ale musí dojít i k co nejefektivnějšímu přenosu emisního záření do detektoru [65].

Světlo, které přešlo přes filtry je poté zaostřeno do tzv. pinhole. Zde dochází k blokaci fluorescenčního světla, které nepochází z ohniskové oblasti. Tím dochází k vytvoření velmi malého pozorovacího objemu, díky čemuž se výrazně zvyšuje poměr signálu k šumu, a také se zkracuje doba měření potřebná k získání korelační křivky [66].

Detekce se provádí pomocí rychlého a citlivého detektoru, typicky se jedná o fotonásobiče (PTM z angl. *photomultiplier tube*) nebo jednofotonové lavinové diody (SPAD z angl. *single photon avalanche diodes*), [67]. SPAD mají nižší citlivost, proto jsou využívány spíše v rozsahu vlnových

délek viditelného světla. Oproti tomu citlivější PTM se využívají v UV oblasti nebo při dvoufotonové excitaci [65].

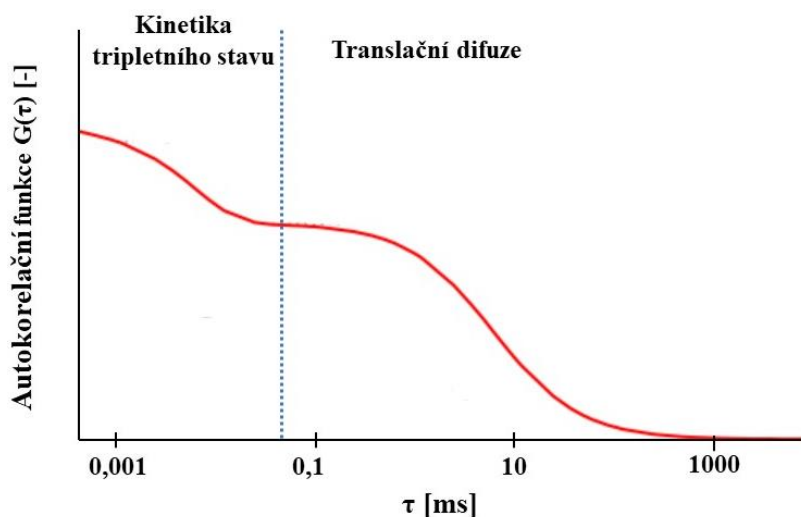
Signál z detektoru je následně přiváděn do počítače, kde dochází k jeho zpracování. Konkrétně se jedná o autokorelaci příchozího signálu. K autokorelaci se využívá speciálních softwarů, které obsahují několik standardních modelů pro fitování některých typů dat FCS.

### 2.6.3.3 Autokorelační funkce

V klasickém FCS experimentu se fotony zaznamenávají během několika sekund. Když fluorescenční molekula vstoupí do pozorovacího objemu, počet fotonů se zvýší. Když naopak objem opouští, jejich počet se sníží. To má za následek fluktuaci fluorescence. Amplituda každé fluktuace poskytuje informace o kvantovém výtěžku a agregačním stavu molekuly během doby, kdy se vyskytuje v pozorovacím objemu. Trvání každé fluktuace pak představuje informaci týkající se časové konstanty pro změnu kvantového výtěžku nebo pohybu molekul. Celkové chování molekul vyskytujících se v celém zkoumaném systému lze pak analyzovat aplikací různých korelačních metod na celkový záznam fluktuace [62].

Pro analýzu FCS dat se nejčastěji využívají následující tři metody. První z nich je tzv. křížová korelace. Ta je využívána při analýze interakcí dvou látek, kde každá z nich je značena jinou fluorescenční sondou. Dále se jedná o analýzu za využití histogramu, která své uplatnění nachází zejména při měření kvantového výtěžku. V neposlední řadě se jedná o tzv. autokorelační analýzu. Ta se využívá zejména pro měření koncentrací, difuzních vlastností či k zisku tripletových frakcí [62].

Autokorelační funkce se získá porovnáním intenzity v čase  $t$  s intenzitou v čase  $t + \tau$ . Amplituda autokorelační funkce v čase  $\tau = 0$  je nepřímo úměrná průměrnému počtu fluorescenčních molekul v pozorovaném objemu. Díky tomuto můžeme vypočítat koncentraci fluorescenčních molekul. Pokles autokorelačních dat v čase odráží fluktuaci fluorescence s různými časovými konstantami, které odpovídají různým dějům. Přechody do tripletových stavů jsou poměrně rychlé a u autokorelační křivky jsou pozorovány u zhruba 10  $\mu$ s. Difuze molekul pak závisí na jejich velikosti. Molekuly samotného fluorescenčního barviva se pohybují okolo 100  $\mu$ s, zatímco difuze větších molekul, jako jsou např. proteiny se pohybují až v rozmezí několika ms [62]. Zmíněné procesy odpovídající daným časovým konstantám můžeme vidět na Obrázku 18.



Obrázek 18: Příklad autokorelační křivky znázorňující některé procesy, které nastávají v různých časových intervalech [62].

Pro získání samotných autokorelačních křivek se využívá celé řady softwarů a metod. Jednou z nich je metoda nejmenších čtverců, využívající prokládání křivek. Pomocí ní lze zjistit řadu parametrů, které po vložení do modelu odpovídají nejvíce pozorovaným experimentálním datům. Nejprve musí dojít k vytvoření zmíněného modelu, který popisuje autokorelační data. Ten má formu výpočetního



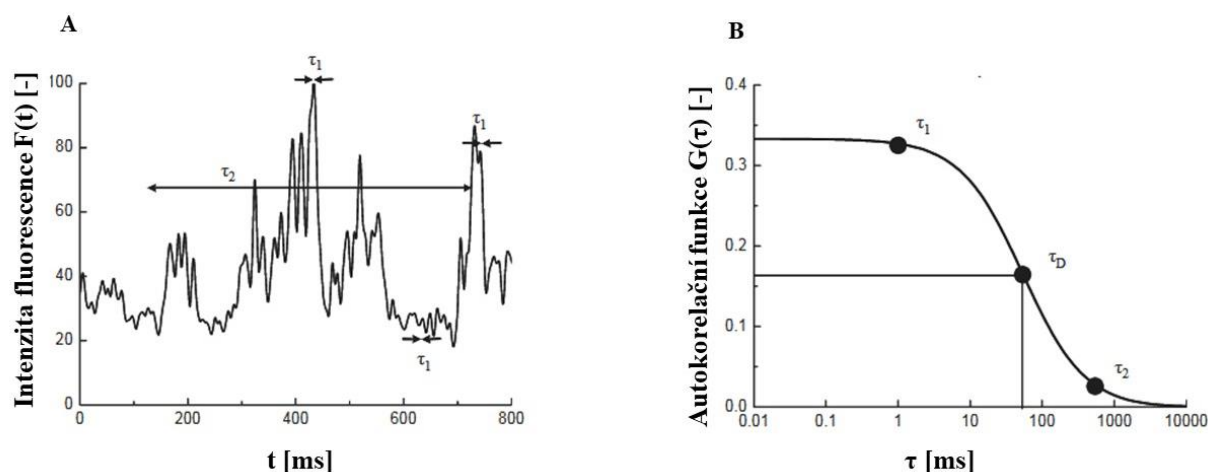
postupu (rovnice), který využívá podmínky experimentu k určení pozorovaných výsledků. Poté dojde k odhadu samotných hodnot daných parametrů. Následně je pomocí algoritmu vypočítán předpokládaný výsledek experimentu. Ten je porovnán s experimentálními výsledky. Poté dochází ke změně hodnot parametrů tak, aby model lépe odpovídal skutečným datům. Cílem prokládání křivek je odhadnout hodnoty pro každý parametr [68].

Pokud využijeme všechny výše zmíněné poznatky, dostaneme obecnou rovnici pro výpočet autokorelační funkce (2.7).

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (2.7)$$

kde  $F(t)$  je intenzita fluorescence,  $\delta$  popisuje okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty a  $\langle \rangle$  značí průměrnou hodnotu v čase [68].

Díky autokorelační funkci jsme schopni zjistit, jak mezi sebou souvisí intenzita fluorescence v časovém okamžiku jedna s intenzitou fluorescence v jiném časovém okamžiku dva. Autokorelační funkci  $G(\tau)$  pro různé časové intervaly ( $\tau$ ) zjistíme právě díky fluktuaci fluorescenčního signálu. Jestliže je časový interval  $\tau_1$  krátký,  $G(\tau)$  se nachází v jejím maximu. Pokud je naopak  $\tau_2$  delší, funkce klesne k nule. Oba případy můžeme vidět na Obrázku 19 [68].



Obrázek 19: Ukázka naměřeného fluorescenčního signálu a sestavení autokorelační funkce [68].

Výše popsaná fakta můžeme vysvětlit následovně. Ideální situace nastává v momentě, kdy je v pozorovaném detekčním objemu pouze jedna fluoreskující molekula. Ta se díky difuzi střídavě ukazuje a zase mizí z pozorovaného objemu. V okamžiku, kdy je přítomna, má odchylka od průměrné hodnoty fluorescence  $\delta F$  kladnou hodnotu. Pokud přítomna není, hodnota odchylky je záporná [68].

Při krátkém časovém intervalu  $\tau_1$ , kdy  $G(\tau)$  dosahuje svého maxima, mohou nastat dvě situace. V prvním případě je molekula přítomna již na začátku, proto se předpokládá její přítomnost i na konci časového intervalu. Hodnota odchylky je tedy kladná. V druhém případě se na začátku molekula nevyskytuje a pravděpodobně se tak nestihne objevit ani na jejím konci. Hodnota odchylky je zde tedy záporná. V obou případech bývá součin odchylek na začátku a na konci časového intervalu většinou kladné číslo. Stejně tomu tak je i po vystředování přes celé měření [68].

Při dlouhém časovém intervalu  $\tau_2$  se v detekčním objemu nezobrazí pouze jedna molekula, ale naopak se jich zde vystřídá několik. Intenzity fluorescence na začátku a na konci už spolu nijak nekorelují a součin odchylek tak bude nabývat náhodných hodnot. Po vystředování kladných a záporných hodnot pak dostaneme nulu [68].

Pokud předpokládáme, že u sledovaných částic zůstává počet fotonů detekovaný z jedné částice za sekundu neměnný a že se částice pohybují volnou difuzí ve třech dimenzích, teoretický tvar autokorelační funkce je pak podle rovnice (2.8) následující:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}}\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}, \quad (2.8)$$

kde  $\langle C \rangle$  je lokální koncentrace částic,  $z_0$  udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu,  $r_0$  je rozměr v ohniskové vzdálenosti,  $V_{\text{eff}}$  je efektivní detekční objem, který lze vypočítat podle rovnice (2.9):

$$V_{\text{eff}} = \pi^2 \cdot r_0^2 \cdot z_0, \quad (2.9)$$

a  $\tau_D$  je difuzní čas udávající, jak dlouho stráví částice v detekčním objemu. Lze jej vypočítat podle rovnice (2.10):

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}, \quad (2.10)$$

kde  $D$  značí difuzní koeficient. Dalším důležitým parametrem, který lze spočítat je průměrný počet částic (PN z angl. *particle number*) v pozorovacím objemu (2.11):

$$\text{PN} = \frac{1}{G(0)} = V_{\text{eff}}\langle C \rangle. \quad (2.11)$$

Z výše uvedených rovnic můžeme vidět, že změřením fluktuujícího signálu, vypočítáním autokorelační funkce (2.7) a jejím následným proložením teoretickou závislostí (2.8), můžeme získat velmi cenné informace o analyzovaném systému, konkrétně difuzní čas  $\tau_D$  (2.10) nebo průměrný počet částic v pozorovacím objemu (2.11). Zároveň pokud známe informace o rozměrech detekčního objemu, lze také vypočítat difuzní koeficient či koncentraci látky [68].

Následující rovnice (2.12), (2.13) a (2.14) zobrazují ukázkou tří nejvíce využívaných matematických modelů k proložení FCS dat (převzato z programu Symphotime využitého pro měření FCS dat).

Pure diffusion

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Dioff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i] \cdot \kappa^2}\right]^{0,5}} \quad (2.12)$$

Triplet

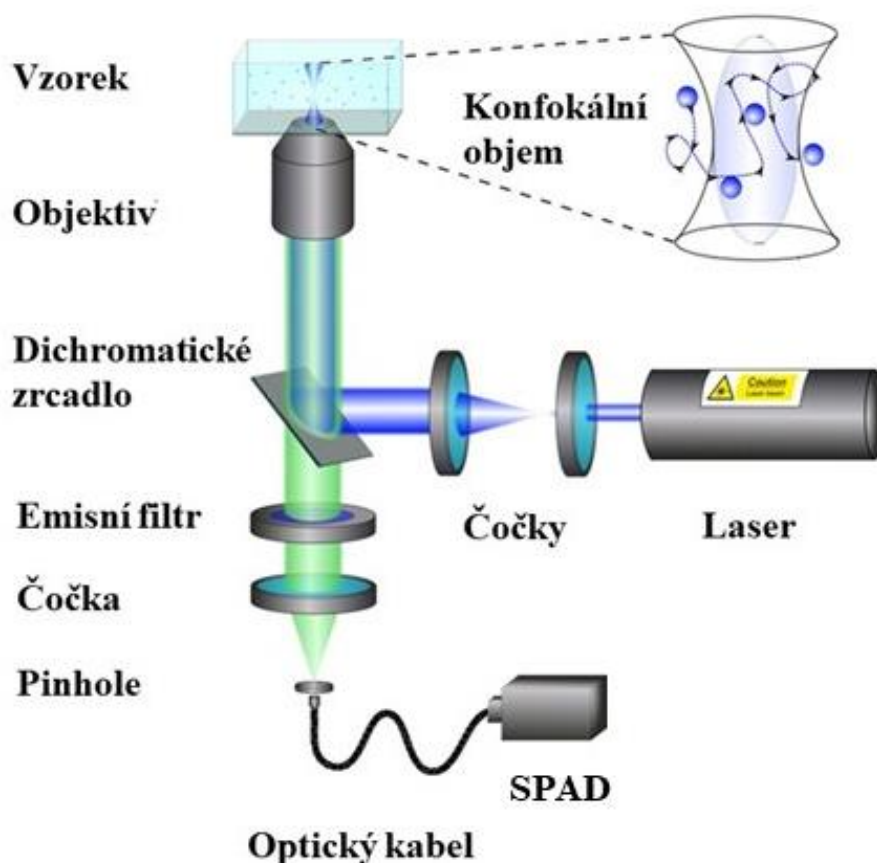
$$G(\tau) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Triplet}}}\right) - 1\right]\right] \cdot \sum_i^{n_{\text{Dioff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i] \cdot \kappa^2}\right]^{0,5}} \quad (2.13)$$

Triplet extended 3D:

$$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{\text{Triplet}}-1} T[j] \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Triplet}}[j]}\right) - 1\right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right]^{\alpha[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{\left[\frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]}\right]}{\kappa^2}\right]^{0,5}} + G_{\text{inf}} \quad (2.14)$$

#### 2.6.3.4 Instrumentace FCS

První, méně častou, možností FCS instrumentace je využití tzv. uspořádání bez mikroskopu. Jedná o konstrukci sestavenou z komerčně dostupné optiky a optických držáků. Využití nachází zejména při *in vitro* experimentech, může být, ale také využita i pro experimenty buněčné. Nevýhodou však je, že samotná buňka zde díky nepřítomnosti mikroskopu nemůže být pozorována. Proto je pro buněčné experimenty vhodnější instrumentace za použití klasického konfokálního mikroskopu. Schéma takového systému můžeme vidět na Obrázku 20 [65].



Obrázek 20: Schéma konfokálního mikroskopu [66].

Princip FCS instrumentace již byl nastíněn v kapitole 2.6.3.2. Laserový paprsek je fokusován pomocí optického systému na objektiv. Ten slouží k zaostření laserového paprsku na difrakčně omezený bod do vzorku. Po ozáření vzorku dochází k excitaci fluoroforu. Záření poté prochází stejným objektivem na dichromatické zrcadlo. Jeho úkolem je odstínění excitačního záření a emitované záření tak může pokračovat dál přes emisní filtr do tzv. pinhole. Zde dochází k blokadě fluorescenčního světla, které nepochází z ohniskové oblasti. Tímto dochází k vytvoření velmi malého pozorovacího objemu, díky čemuž se výrazně zvyšuje poměr signálu k šumu, a také se zkracuje doba měření potřebná k získání korelační křivky [66]. Detekce se provádí pomocí rychlého a citlivého detektoru, typicky se jedná o fotonásobiče nebo jednofotonové lavinové diody (SPAD), přičemž SPAD jsou preferovány díky jejich vyšší detekční účinnosti [67].

Běžnou součástí FCS instrumentace je také software, který je schopen vypočítat autokorelační funkci [67,69].

### 2.6.3.5 Fluorescenční sondy

Pro zobrazování fluorescenčních jevů je zapotřebí látek reagujících na světlo. Takovéto látky jsou známy pod názvem fluorescenční molekuly nebo také jako fluorofory. Fluorofory jsou schopny absorbovat fotony energie jedné vlnové délky a následně emitovat energii na jiné vlnové délce. Díky svým odlišným vlastnostem nacházejí své uplatnění v celé řadě aplikací a experimentů. Obecně se rozdělují na dvě třídy – vnitřní, přirozeně fluoreskující a vnější, které jsou k analyzovaným systémům přidávány [70,71].

Mezi vnitřní, a tedy přirozeně fluoreskující fluorofory se řadí zejména některé proteiny a malé molekuly vyskytující se v buňkách. Takovéto molekuly tedy vykazují tzv. autofluorescenci. Jejich využití, zejména pak fluorescenčních proteinů, se nachází při biologickém zobrazování. Nejčastěji se jedná o monitorování aktivace genu, značení a analýzu určitých proteinů nebo buněčných organel či dokonce samotných buněk. Nejběžnějším fluorescenčním proteinem používaným při buněčném zobrazování je tzv. zelený fluorescenční protein (GFP z angl. *green fluorescent protein*) [70].

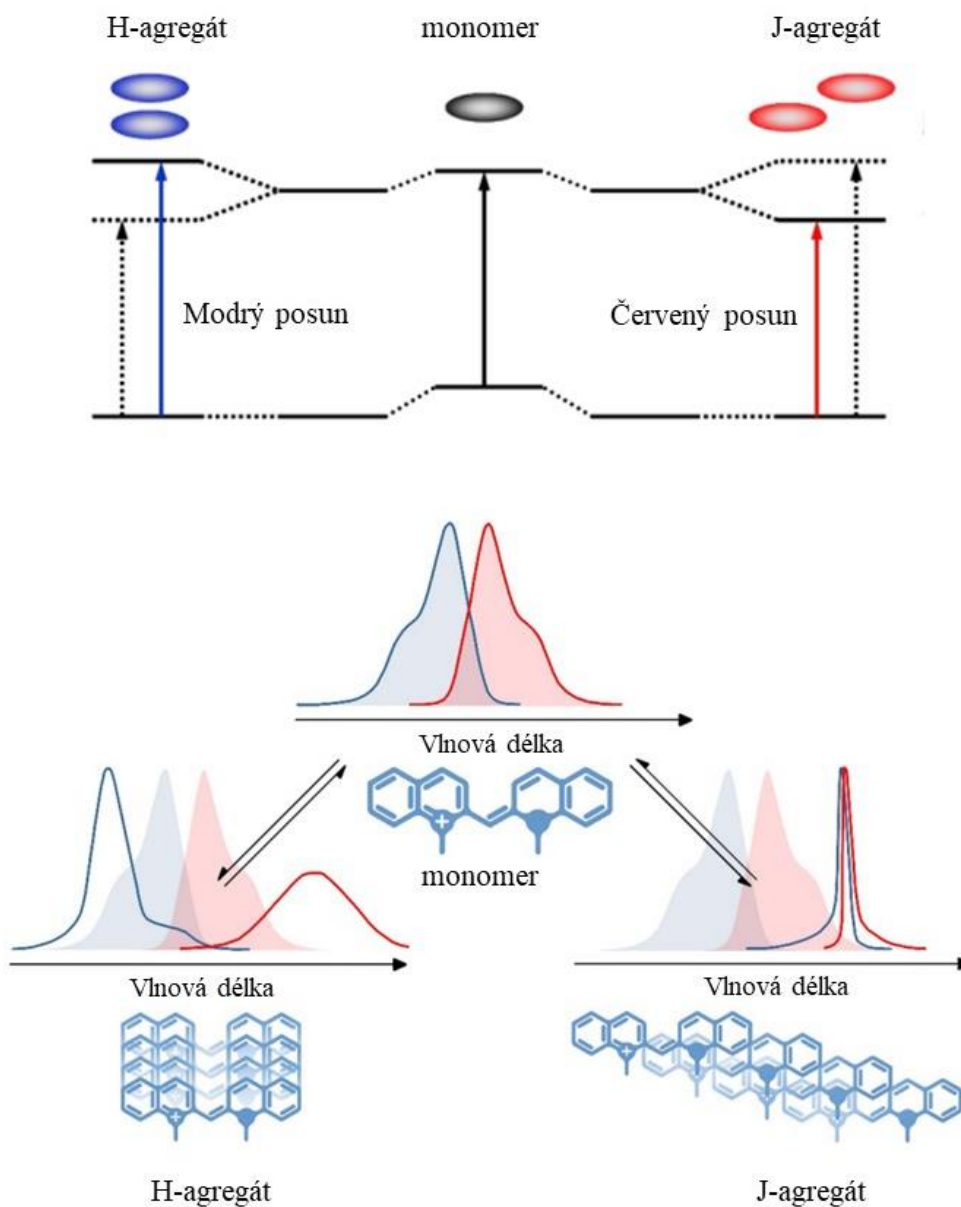
Na látky, které nevykazují autofluorescenci, mohou být připojeny vnější fluorofory. Ty se dále dělí na kovalentně vázané fluorofory neboli fluorescenční značky a nekovalentně vázané fluorofory neboli fluorescenční sondy [71]. V obou případech se jedná o relativně malá činidla, která se vážou na proteiny, nukleové kyseliny a další molekuly. Po navázání vznikají vysoce citlivá činidla využívaná pro četné testovací postupy *in vitro*. Například fluorescenčně značené protilátky mohou být použity k monitorování buněk a tkání na přítomnost konkrétních antigenů a následně mohou být detekovány pomocí technik fluorescenční mikroskopie [72].

Jak již bylo zmíněno výše, fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke zkoumané látce vážou pomocí nekovalentních vazeb. Existuje tisíce fluorescenčních sond, jejichž výběr je klíčový pro daný experiment, neboť právě vlastnosti dané sondy nám poskytují informace o zkoumaném systému. [73]. V této studii byly využity dva druhy fluorescenčních sond a tím jsou tzv. karbokyaninová a xanthenová barviva.

Kyaniny jsou sondy citlivé na napětí. Proto se původně začaly používat zejména v neurovědě, dnes již své uplatnění nacházejí zejména při studiu fluidity membrán [74]. Jedná se o sloučeniny se dvěma atomy dusíku spojenými lichým počtem methenových jednotek, přičemž atomy dusíku jsou součástí heterocyklicklů (indol, bezoxazol nebo benzthiazol) [75,76,77]. Vlnovou délku absorpce i emise kyaninů lze upravovat a posouvat směrem k delším vlnovým délkám. Tohoto lze dosáhnou buď pomocí změny počtu uhlíkových atomů v polymethinovém řetězci nebo rozšířením aromatické části koncových heterocyklických jednotek. Prodloužením polymethinového řetězce o dva atomy uhlíku dochází k bathochromnímu posunu až o 100 nm, zatímco fúzí aromatického kruhu jen o 30 nm [78,79].

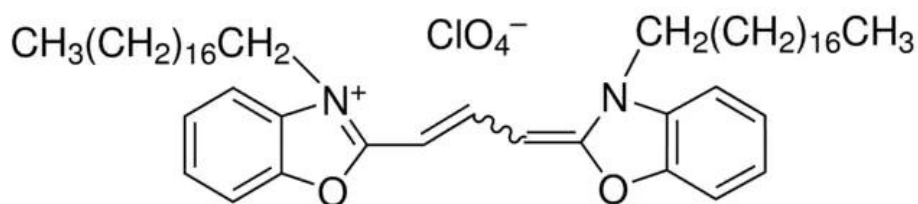
Hlavním problémem kyaninů je jejich chemická i fotochemická nestabilita. V roztoku jsou náchylné k fotovybělení, oxidaci nebo solvatochromním účinkům [76,77] a v biologických systémech nescificky interagují s biomolekulami [80]. Všechny výše zmíněné děje způsobují snížení kvantového výtěžku fluorescence a dochází i ke změnám absorpčních a emisních maxim. V posledních letech však došlo k vylepšení jejich stability, a to zejména pomocí jejich modifikace či enkapsulace do dendrimerů nebo nanočástic [81].

Kyaniny také ve vodných roztocích podléhají různým typům agregací. Molekuly barviva mohou agregovat dvojím způsobem – paralelně (vedle sebe), kdy dochází k tvorbě tzv. H-agregátu (nefluorescenčního) nebo uspořádáním „hlava k patě“, kdy se tvoří tzv. J-agregát (fluorescenční). H-typ agregátu se vyznačuje vyšším energetickým přechodem, kdy dochází k tzv. hypsochromnímu posunu spektra oproti monomeru neboli posunu absorpčního spektra ke kratším vlnovým délkám, zatímco emisní spektrum se posouvá k delším vlnovým délkám. J-agregát se naopak vyznačuje nižší přechodovou energií, kdy dochází k posunu jak absorpčního, tak emisního spektra k delším vlnovým délkám (Obrázek 21). Tvorbou H-agregátů tak dochází k samozhášení organických molekul [82,83].

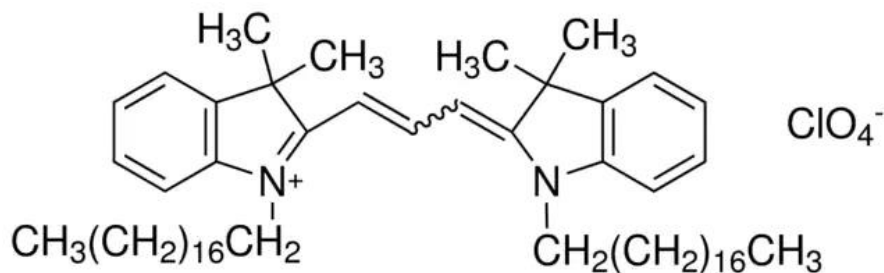


Obrázek 21: Ukázka energetických přechodů a posunů spekter pro H a J-typ agregace [82,83].

Mezi nejrozšířenější karbokyraninové membránové sondy patří například DiO (3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát) neboli DiOC<sub>18</sub>(3) (Obrázek 22) a DiI (1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindokarbokyanin perchlorát) (Obrázek 23) [85].

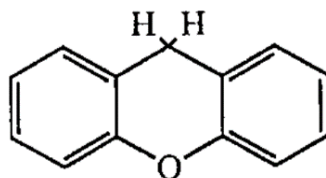


Obrázek 22: Struktura DiO (3,3'-Dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát) [84].



Obrázek 23: Struktura DiI (1,1'-Dioktadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindokarbokyanin perchlorát) [86].

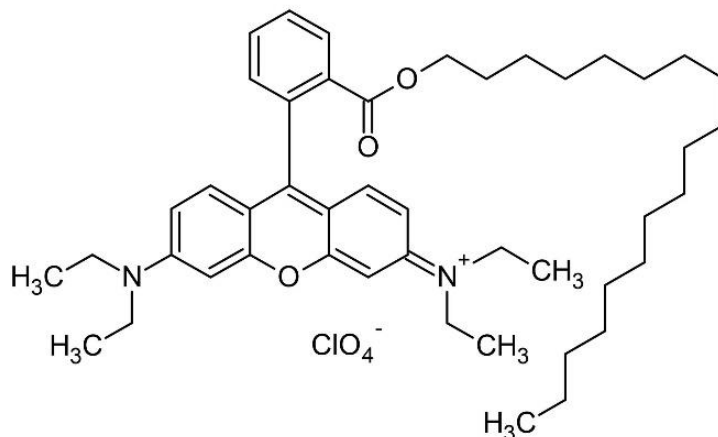
Xanthenová barviva jsou jedny z nejrozšířenějších tříd fluorescenčních sond a zahrnují širokou škálu barviv. Základní strukturou je xanthenové jádro (Obrázek 24). Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí zejména aminoderiváty (rhodaminy) a hydroxylderiváty (fluoresceiny) [87,88].



Obrázek 24: Struktura xanthenového jádra [87].

Xantheny jsou důležité zejména díky jejich široké škále odstínů, které sahají od zeleno žlutých přes tmavě fialové až po modré. Nejvýznamnější jsou však odstíny růžové a červené. V porovnání s jinými chromofory jsou však poměrně nestálé na světle, proto své uplatnění nacházejí zejména v odvětvích, kde je stálost na světle relativně nedůležitá. Používají se například k přímému barvení vlny či hedvábí nebo jako barviva pro papír, léčiva či kosmetiku [89]. Fluoresceiny a rhodaminy se dále používají jako fotosenzibilizátory v medicíně [90].

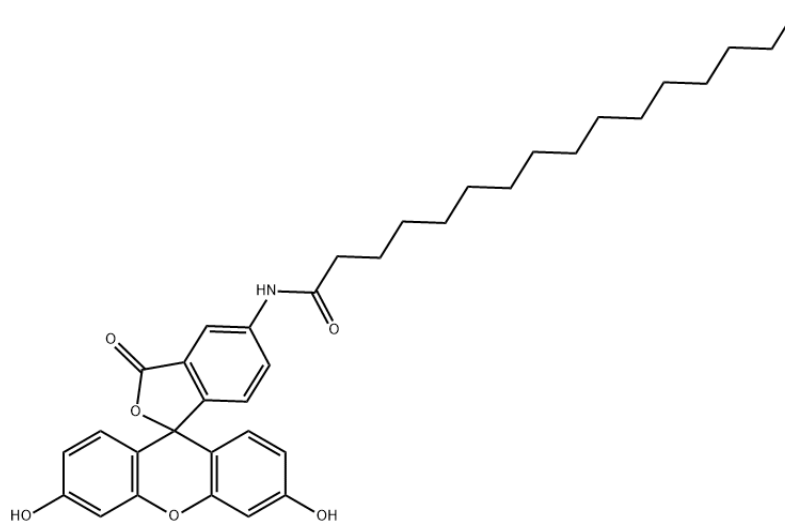
Prvním zástupcem xanthenových barviv, použitých v této studii je rhodamin B oktadecyl ester perchlorát (RBOE), jehož strukturu můžeme vidět na Obrázku 25. U rhodaminu, stejně jako u kyaninových barviv, můžeme také pozorovat vznik H a J-agregátů, způsobující změny spektrálních vlastností [91].



Obrázek 25: Struktura rhodaminu B oktadecyl ester perchlorátu [92].

Druhým použitým zástupcem je 5-hexadekanoylamino fluorescein (F16) na Obrázku 26. U fluoresceinu, na rozdíl od tří výše zmíněných sond, nedochází ke tvorbě H a J-agregátů, nicméně

i zde může docházet k samozhášecím procesům a to prostřednictvím tzv. homoFRET (Försterův rezonanční přenos energie z angl. *Förster resonance energy transfer*). FRET je proces, který popisuje přenos energie mezi dvěma fluorofory - akceptorem a donorem, za předpokladu, že dochází k překryvu jejich emisních a excitačních spekter. Jestliže pak mluvíme o homoFRET, jedná se o přenos energie mezi dvěma identickými molekulami fluoroforu. Molekula fluoroforu, která byla excitována (donor), pak přenáší energii na identický fluorofor (akceptor), který následně předanou energii vyzáří. Díky tomu, že nedochází k emisi fotonu donorem se jedná o tzv. nezářivý přechod. Díky tomuto ději pak může docházet například k analýze a kvantifikaci tvorby homodimerů a oligomerů stejného proteinu [93].

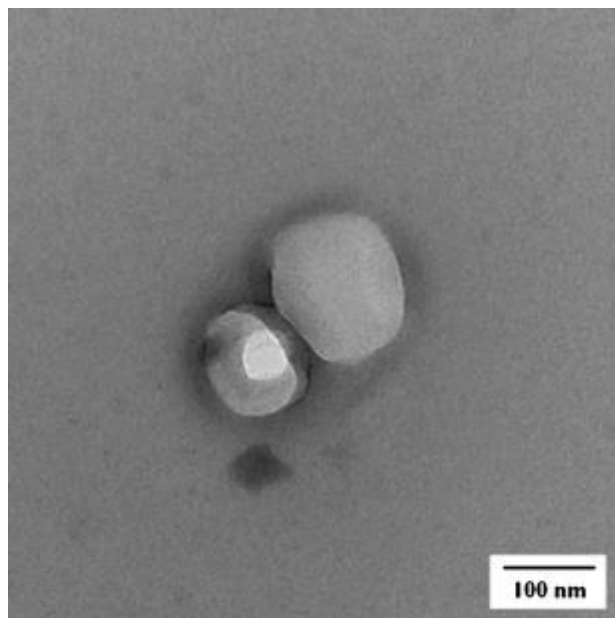


Obrázek 26: Struktura 5-hexadecanoylamino fluoresceinu [94].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Příprava a stabilizace kataniontových vezikulárních systémů

**Chih-Jung Wu a kol.** se zabývali přípravou kladně nabitých kataniontových vezikul složených z amfifilního iontového páru s přidavkem dvouřetězcového kladně nabitého tenzidu. Iontově amfifilní pár byl tvořen dvojicí tenzidů, a to kladně nabitým hexadecyltrimethylamonium bromidem (CTAB) a záporně nabitým dodecylsíránem sodným (SDS). Dvouřetězcové kladně nabité tenzidy byly vybrány celkem tři, každý s jinou délkou uhlovodíkového řetězce. Konkrétně se jednalo o ditetradecyldimethylamonium bromid (DTDAB), dihexadecyldimethylamonium bromid (DHDAB) a dioktadecyldimethylamonium bromid (DODAB). IPA prášek byl připraven smícháním vodných roztoků kationtového a aniontového tenzidu v jejich dostatečné koncentraci v ekvimolárním množství. Následně byl ponechán 1 den při pokojové teplotě za současného míchání do úplného vysrážení. Vzniklá sraženina byla oddělena od vodní fáze centrifugací při 5500 ot/min, promyta čistou vodou a sušena v sušárně při teplotě 50 °C po dobu 3 dnů. Vzniklý IPA prášek byl analyzován pomocí elementární analýzy, kde došlo k potvrzení toho, že se molekula IPA skládá ze dvou opačně nabitých tenzidů v ekvimolárním poměru. Samotné kataniontové vezikulární systémy byly připraveny smícháním vzniklého IPA prášku s danou koncentrací dvouřetězcového kladně nabitého tenzidu za využití mechanického rozrušení. Molární frakce dvouřetězcového tenzidu se pohybovala v rozmezí 0,1 do 0,5. Požadované množství směsi bylo rozpuštěno v chloroformu a následně vysušeno za účelem vytvoření tenkého filmu na skleněných kuličkách. Film byl následně hydratován 60 ml čisté vody a sonifikován po dobu 1 hodiny pomocí ultrazvukového procesoru s výkonem 60 W. Při procesu byla teplota udržována na hodnotě 70 °C. Po dokončení přípravy byly vezikuly proměřeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu, kde došlo ke zjištění jejich morfologie, která se podobala kouli (Obrázek 27). Zároveň byla také potvrzena dvouvrstvá struktura vezikul pomocí fluorescenční depolarizace, kdy došlo k zapouzdření hydrofobní sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu [95].



Obrázek 27: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující kataniontové vezikuly složené z IPA (SDS a CTAB) a DTDAB [95].



Dále byl zkoumán zeta potenciál a stabilita vzniklých systémů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Hodnoty zeta potenciálu a stability systémů IPA:DXDAB [95].

poměr IPA:DXDAB		9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
Zeta potenciál kataniontových vezikul [mV]	IPA/DTDAB	-	-	59	51	53±2
	IPA/DHDAB	-	-	55±5	56	61±1
	IPA/DODAB	-	-	58	59±7	58±1
Stabilita kataniontových vezikul [den]	IPA/DTDAB	-	-	14±4	26±4	31,53
	IPA/DHDAB	-	-	5±2	34	127,194
	IPA/DODAB	-	-	2	54±4	88,118

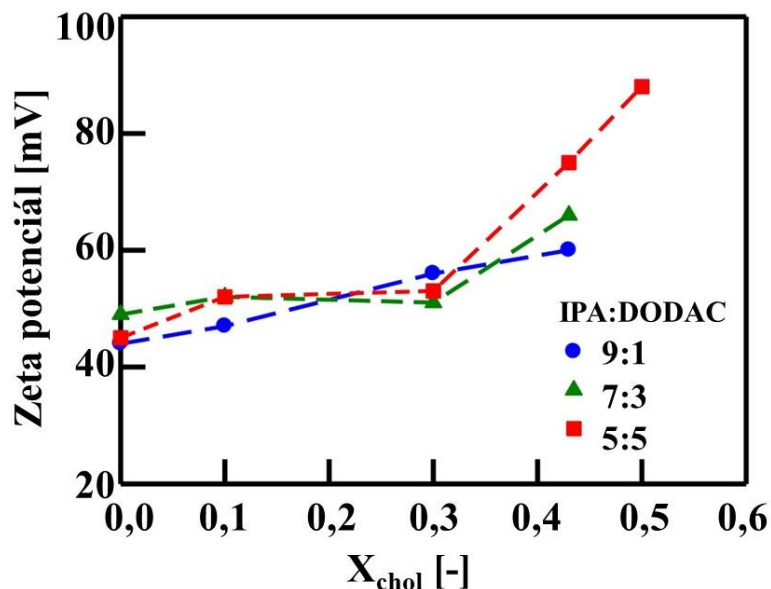
S koncentrací  $X_{DXDAB} < 0,3$  se tvořily vezikuly s nízkou stabilitou, proto nejsou k dispozici ani spolehlivá data zeta potencionálu. Naopak s koncentrací  $DXDAB$   $0,3 \leq X_{DXDAB} \leq 0,5$  byly hodnoty zeta potenciálu srovnatelné a stabilita rostla s rostoucí koncentrací  $DXDAB$ . Dále lze také říct, že systémy obsahující DTDAB, tedy systémy s kratším uhlovodíkovým řetězce, jsou méně stabilní v porovnání s DHDAB a DODAB, které mají uhlovodíkové řetězce delší. Dle výše zmíněných poznatků tak lze říci, že na stabilitu systémů IPA:DODAC má významný vliv nejen samotná koncentrace vybraného dvouřetězcového tenzidu, ale také délka jeho uhlovodíkového řetězce [95].

**An-Tsung Kuo a kol.** studovali vliv cholesterolu na fyzikální stabilitu kladně nabitých kataniontových vezikul tvořených z tenzidů SDS a CTAB s přídavkem dvouřetězcového tenzidu ditetradecyldimethylamonium bromid (DTDAB). Účinky cholesterolu byly zkoumány měřením velikosti a zeta potenciálu pomocí metody dynamického rozptylu světla s využitím He-Ne laseru o vlnové délce 632,8 nm. Celkem byly využity tři koncentrace cholesterolu, a to 10, 30 a 43 mol.%. Poměr IPA:DTDAB byl vybrán 9:1, 7:3 a 5:5. Data ukázala, že s rostoucí koncentrací cholesterolu docházelo ke značnému zvýšení fyzikální stability (s výjimkou systémů s poměrem IPA:DTDAB 5:5). S obzvláště vysokou stabilitou se ukázaly systémy obsahující 43 mol.% cholesterolu (Tabulka 2) [96].

Tabulka 2: Fyzikální stabilita systémů tvořených s různou koncentrací IPA:DODAC a cholesterolu [96].

	IPA:DTDAB		
	9:1	7:3	5:5
$X_{chol}$	Stabilita [den]	Stabilita [den]	Stabilita [den]
0	0	20±6	96±22
0,1	2±1	95±49	94±40
0,3	4±2	147±47	41±1
0,43	>270	>270	167±37

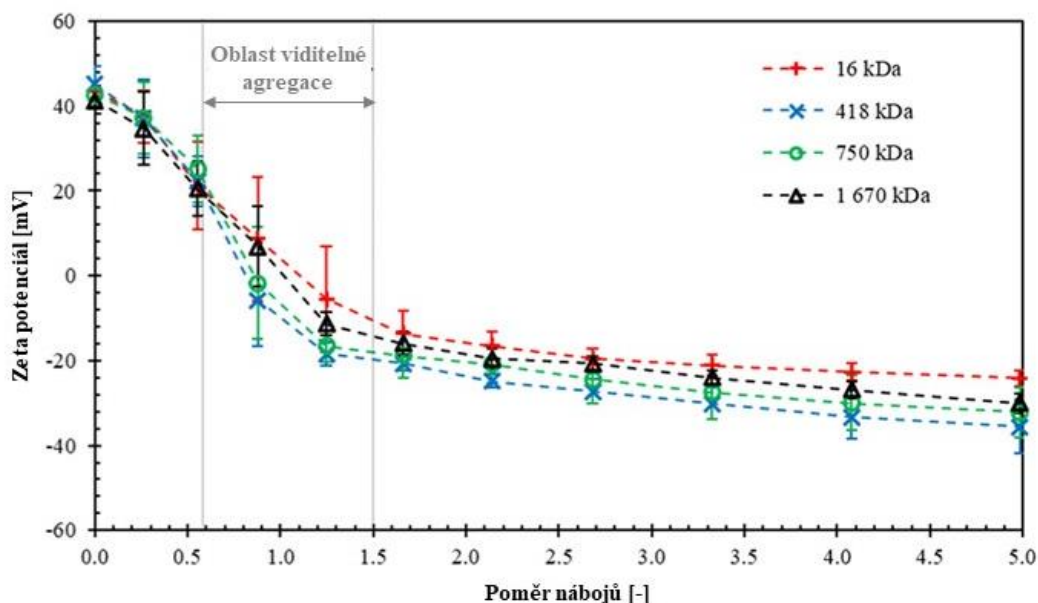
Dále byl zkoumán zeta potenciál (Obrázek 28). Se zvyšující se koncentrací cholesterolu obecně došlo také ke zvýšení zeta potenciálu. V nepřítomnosti cholesterolu nebyl nalezen žádný významný rozdíl hodnot pro různé směšovací poměry IPA:DTDAB. Naopak při koncentraci cholesterolu  $X_{\text{chol}} = 0,43$  byly zeta potenciály výrazně zvýšeny se zvýšeným obsahem DTDAB. Výsledky naznačují, že obsah cholesterolu má signifikantní vliv na fyzikální stabilitu vezikul [96].



Obrázek 28: Hodnoty zeta potenciálu pro různé poměry IPA:DTDAB a cholesterol [96].

### 3.2 Studium interakce kladně nabitých vezikul s opačně nabitým polymerem

**Martina Havlíková a kol.** zkoumali interakce mezi kationtovými vezikuly a hyaluronanem. Vezikulární systémy byly tvořeny z IPA (SDS a CTAB), DODC a cholesterolu (43 mol.%). Celkem byly využity čtyři molekulové hmotnosti hyaluronanu, a to 16, 418, 750 a 1670 kDa. Interakce mezi hyaluronanem a vezikuly byly kromě jiného zkoumány pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Bylo využito i vizuální pozorování. Z naměřených dat byl patrný pokles zeta potenciálu s rostoucím přídavkem hyaluronanu u všech použitých molekulových hmotností (Obrázek 29) [28].



Obrázek 29: Graf závislost zeta potenciálu na poměru náboje pro různé molekulové hmotnosti hyaluronanu [28].

Pomocí dynamického rozptylu světla byla také pozorována velikost vzniklých systémů. Obecně se velikost s přidáváním hyaluronanu zvětšovala, což bylo doprovázeno i zvyšujícím záněvem vzorků. Při poměru náboje 0,9–1,0 došlo ke vzniku viditelných agregátů. Tyto agregáty se s dalším přidáváním hyaluronanu (poměr nábojů 2,1) rozpadly, s výjimkou systémů obsahující 1670 kDa hyaluronan (Tabulka 3) [28].

Tabulka 3: Průměrná velikost částic hyaluronanu s různou molekulovou hmotností. \*OR (z angl. *out of the range*) – hodnoty mimo rozsah měřitelnosti přístroje [28].

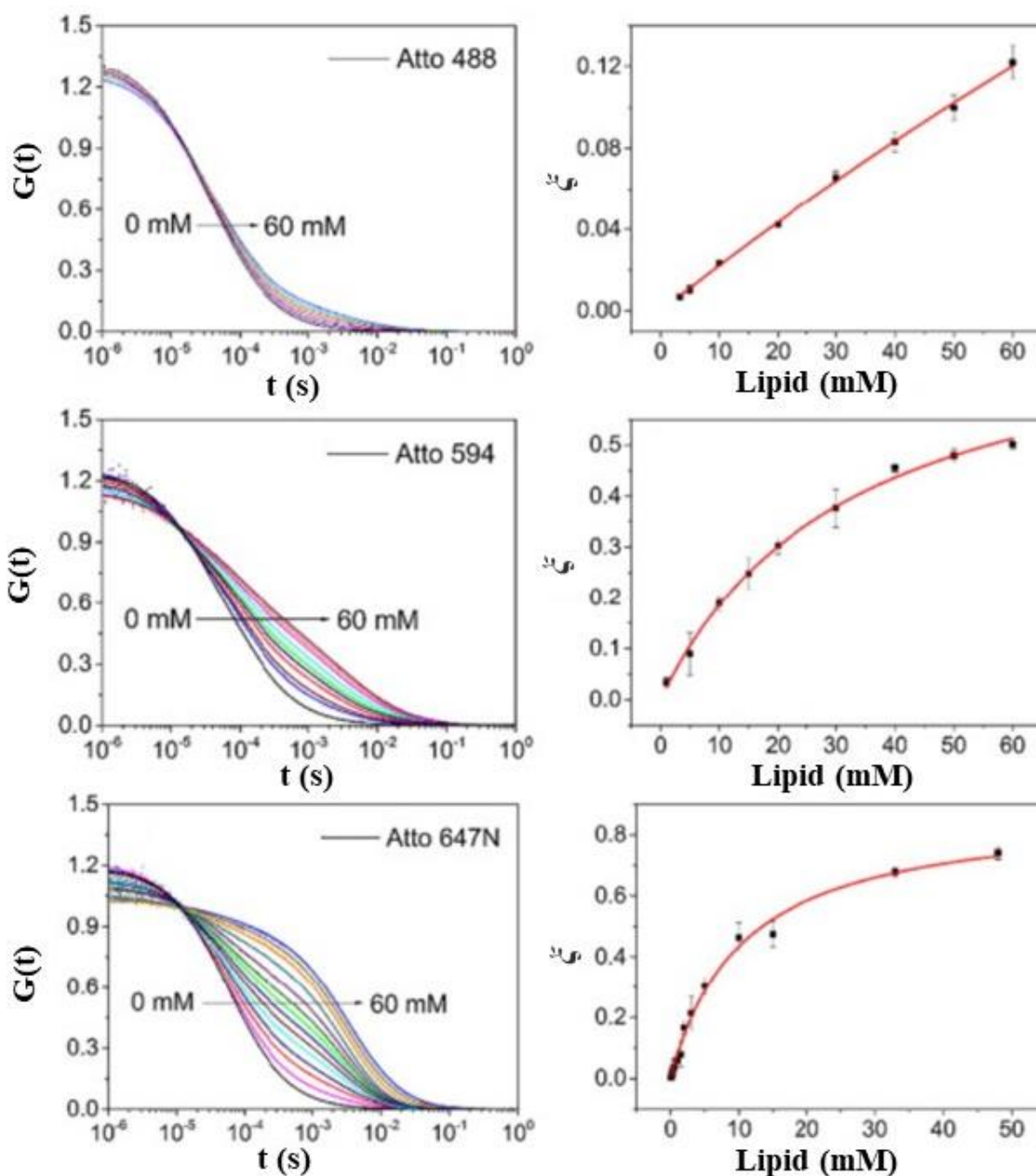
Poměr náboje	Průměrná velikost částic [nm]			
	16 kDa	418 kDa	750 kDa	1 670 kDa
0.0	91 ± 9			
0.3	100 ± 21	128 ± 54	111 ± 51	106 ± 5
0.6	1 534 ± 755	1 904 ± 2 819	625 ± 449	2 272 ± 3 643
0.9	*OR	*OR	*OR	*OR
1.2	*OR	*OR	*OR	*OR
1.7	*OR	*OR	*OR	*OR
2.1	*OR	*OR	8 720 ± 537	*OR
2.7	*OR	4 564 ± 3 359	4 254 ± 2 240	*OR
3.3	7 036 ± 1 905	3 369 ± 2 851	2 750 ± 1 449	*OR
4.1	5 378 ± 1 685	2 327 ± 1 938	2 231 ± 1 255	*OR
5.0	3 952 ± 1 351	1 527 ± 1 000	1 998 ± 1 190	*OR

### 3.3 Studium interakce lipidů s fluorofory pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Zhenfu Zhang a kol. zkoumali interakce mezi lipidovými vezikulami a fluorofory pomocí metody fluorescenční korelační spektroskopie. Pro studii byly vybrány lipidy s různým nábojem, hlavní skupinou nebo stupněm nasycení acylového řetězce (DOPC, DOPG, DOPS, POPS, POPC, DPPC, DOTAP). Použité fluorofory pak byly různé chemické povahy nebo se lišily v přítomnosti náboje

či hydrofobnosti (A488, A647, Atto 488, Atto 532, Atto 565, Atto594, Atto 647N, fluorescein, Cyanine 5) [97].

Autokorelační křivky byly získány měřením FCS při různých koncentracích lipidu (DOPC), a to 0 až 60 mM. Jako fluorescenční sondy byly vybrány Atto 488, Atto 595 a Atto 647N. Ve všech případech docházelo ke zpomalení rozpadu autokorelační křivky s rostoucí koncentrací lipidu, přičemž velikost posunu závisela na povaze páru lipid-fluorofor. K největšímu posunu docházelo u systému DOPC-Atto 647N, naopak k nejmenšímu u DOPC-Atto 488. S rostoucí koncentrací lipidu zároveň docházelo ke zvětšování frakce fluoroforů vázaných na lipid (Obrázek 30) [97].



Obrázek 30: V levé části FCS křivky měřené pro (A) Atto 488, (B) Atto 594 a (C) Atto 647N pro různé koncentrace DOPC od 0 až do 60 mM. V pravé části závislost frakce fluoroforu vázaného na lipidy na koncentraci lipidu - (D) Atto 488, (E) Atto 594, (F) Atto 647N [97].

Dále byla měřena doba života fluorescence, která byla použita na stanovení relativní změny kvantového výtěžku fluoroforu vyvolané přítomností LUV (velké unilamelární vezikuly, z angl. *large unilamellar vesicles*). Data však ukázala, že doba života fluorescence, a tedy kvantový výtěžek barviva

navázaného na LUV, je velmi podobná životnosti volného barviva ve vodném roztoku. Toto zjištění tedy ukázalo, že u sledovaných systémů není molekulární jas barviva významně ovlivněn jeho interakcí s lipidovou dvouvrstvou, proto lze jeho účinek při FCS analýze zanedbat. Delší korelační časy tak mohly být způsobeny změnou viskozity či indexem lomu, nicméně data později ukázala, že tyto změny byly minimální, a že posuny k pomalejším rozpadům v přítomnosti LUV byly primárně způsobeny slabou interakcí fluorofor-lipid [97].

Síla vazby fluorofor-lipid byla získána měřením rozdělovacího koeficientu  $K_p$ . Vysoké hodnoty  $K_p$  odpovídají velkému zastoupení fluoroforu v lipidové části, a tím tak naznačují silnou interakci mezi fluoroforem a lipidem. Data ukázaly, že modře a zeleně excitované fluorofory obecně vykazovaly nižší hodnoty  $K_p$ , tedy slabší vazby než červeně excitované fluorofory. Nejsilnější vazby k lipidové dvojvrstvě vykazovaly fluorofory Atto 647N a Cy5 [97].

K potvrzení existence elektrostatických sil mezi nabitými hlavami lipidů a fluoroforu byly pomocí FCS provedeny experimenty při různých koncentracích NaCl (14 mM a 140 mM). V nepřítomnosti soli se kladně nabitá sonda Atto 647N a stejně nabitě hlavy lipidu vzájemně odpuzují, podíl adsorbovaného barviva je tak zanedbatelný. Se zvyšující se koncentrací soli se korelační křivka posouvala k delším dobám rozpadu a frakce sondy Atto 647N vázaná na lipidy se zvýšila z 5 % (v 14 mM) na 10 % (ve 140 mM). Elektrostatické účinky byly také sledovány mezi záporně nabitým fluoroforem Alexa 647 a kladně nabitým DOTAP. Zde docházelo naopak k podstatně rychlejšímu poklesu korelačních dat v přítomnosti 300 mM NaCl, než v přítomnosti 140 mM [97].

Účinek hlavních skupin lipidů byl sledován využitím DOPG a DOPS. Hlavní rozdíl mezi nimi představuje právě rozdílné složení hydrofilní hlavy. Zatímco DOPG obsahuje dvě hydroxylové skupiny, DOPS má jednu karboxylovou skupinu a druhou amino skupinu. K rozpadu korelačních dat docházelo později u DOPG, jak u DOPS, využitě fluorofory tedy vykazují větší afinitu právě k DOPG. Dále bylo také zjištěno, že modře a zeleně excitované fluorofory vykazovaly nižší vazebnou afinitu k lipidům, jak červeně excitované fluorofory [97].

Efekt nasycení řetězce byl studován za využití nenasyčeného DOPC, napůl nasyceného POPC a plně nasyceného DOOC. Data ukázala relativně malou závislost interakce fluorofor-lipid na nasycení řetězce, s výjimkou Atto 647N, kde bylo patrné, že se vazba fluoroforu na lipidové vezikuly stávala slabší se zvyšující se saturací acylového řetězce [97].

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Použité chemikálie**

#### **Hexadecyltrimethylamonium bromid**

$M_w=364,45$  g/mol, CAS: 57-09-0, Sigma Aldrich

#### **Dodecylsírán sodný**

$M_w=288,38$  g/mol, CAS: 151-21-3, Sigma Aldrich

#### **Dimethyldioktadecylamonium chlorid**

$M_w=586,64$  g/mol, CAS: 107-64-2, Sigma Aldrich

#### **Cholesterol**

$M_w=386,65$  g/mol, CAS: 57-88-5, Sigma Aldrich

#### **Hyaluronan**

$M_w=418$  kDa, Contipro Group, Ltd., Dolní Dobrouč, Česká republika, č. šarže: 230215-E1,  
vlhkost 7,863 %

#### **Chloroform**

$M_w=119,38$  g/mol, CAS: 67-66-3, Sigma Aldrich

#### **Aceton**

$M_w=58,08$  g/mol, CAS: 67-64-1, Sigma Aldrich

#### **3,3'-Dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát (DiO)**

$M_w=881,70$  g/mol, CAS: 34215-57-1, Sigma Aldrich

#### **1,1'-Dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindokarbokyanin perchlorát (DiI)**

$M_w=933,87$  g/mol, CAS: 41085-99-8, Sigma Aldrich

#### **Rhodamin B oktadecyl ester perchlorát (RBOE)**

$M_w=795,49$  g/mol, CAS: 142179-00-8, Sigma Aldrich

#### **5-hexadekanoylamino fluorescein**

$M_w=585,74$  g/mol, CAS: 73024-80-3, ThermoFisher Scientific

#### **Deionizovaná voda**

System ELGA

## Fluorescenční silikátové částice

sicastar®-greenF, MicroMod, velikost 100 nm, číslo produktu: 42-00-102

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava zásobního prášku IPA

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky tenzidů CTAB a SDS tak, aby výsledná koncentrace činila 2 mM. Tyto roztoky byly následně míchány přes noc. Druhý den došlo k jejich smíchání v poměru 1:1 a opět došlo k jejich promíchávání přes noc. Během procesu se teplota udržovala na 30 °C. Po 24 hodinách došlo k vytvoření sraženiny, která byla podrobena centrifugaci při 3500 ot/min po dobu 30 minut a následné filtraci za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky. Získaný IPA prášek byl ponechán v Petriho misce v sušárně při 50 °C po dobu 3 dnů. Hotový prášek byl skladován ve vialce překryté parafilmem.

### 4.2.2 Příprava kataniontových vezikulárních systémů s cholesterolem

Ze zásobního roztoku IPA bylo odváženo příslušné množství prášku a zalito vypočteným objemem chloroformu. Podobným způsobem byl také připraven roztok tenzidu DODAC. Do čisté, suché pyrexky bylo naváženo vypočtené množství cholesterolu, tak aby jeho výsledná koncentrace činila 43 mol.%. K naváženému množství cholesterolu byly přidány roztoky IPA a DODAC v poměru 9:1 (výsledná koncentrace cIPA činila 2 mM). Následně byly přidány skleněné kuličky, tak aby pokryly dno pyrexky. Vše bylo zvortexováno a za občasného promíchání ponecháno v digestoři do úplného odpaření chloroformu. Do druhého dne došlo na kuličkách k vytvoření tenkého filmu, který byl rehydratován 60 ml deionizované vody. Takto připravené vzorky byly opět zvortexovány a následně podrobeny sonifikaci pomocí tyčového dispergátoru při 50 % amplitudě do dosažení požadované energie 25 kJ (model HD 3 200, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG). Takto připravené systémy byly ponechány v sušárně při 30 °C do dalších experimentů.

### 4.2.3 Příprava vzorků s fluorescenční sondou pro měření FCS a DLS

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých sond (DiI, DiO, F16 a RBOE), a to smícháním příslušného množství sondy v acetonu. Výsledné koncentrace zásobních roztoků činily  $10^{-4}$  M.

Z připravených kataniontových vezikulárních systémů s cholesterolem bylo vždy do suchých vialek odpipetováno po 4 ml roztoku (výsledná koncentrace cIPA činila 2 mM), ke kterému bylo přidáno příslušné množství sondy. Výsledná koncentrace sondy vždy činila  $10^{-6}$  M. Po promíchání došlo k odstranění víčka a systémy byly takto ponechány po dobu 5 minut, aby došlo k odpaření acetonu. Následně byly vzorky opět zavíčkované a solubilizovány do druhého dne v sušárně při teplotě 30 °C za současného míchání. Takto připravené vzorky byly následně proměřeny pomocí metody DLS a FCS.

### 4.2.4 Příprava koncentrační řady hyaluronanu pro měření FCS a DLS

Z připravených vezikulárních systémů bylo vždy odpipetováno po 2 ml do čistých, suchých vialek, ke kterým bylo přidáno příslušné množství sondy DiI (výsledná koncentrace činila  $10^{-6}$  M), vše bylo promícháno. Stejně jako v předchozím případě i zde byly odstraněny víčka pro vypaření acetonu. Po 5 minutách byla víčka opět nasazena a vzorky byly solubilizovány do druhého dne v sušárně při teplotě 30 °C za současného míchání.

Dále byly připraveny dva zásobní roztoky hyaluronanu smícháním jeho příslušného množství v deionizované vodě, tak aby výsledná koncentrace činila 1 a 2 g/l. Druhý den bylo ze zásobního roztoku odebráno dané množství a přidáno k připraveným vezikulám obsahujícím fluorescenční sondu. Hyaluronan byl ke vzorkům přidáván po kapkách za současného míchání. Takto připravené systémy byly opět ponechány v sušárně při 30 °C do druhého dne za současného míchání. Celkem bylo připraveno 7 vzorků obsahujících dané koncentrace hyaluronanu. Výsledné koncentrace můžeme

vidět v Tabulce 4. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky s fluorescenčními sondami DiO a F16. Celkem tedy bylo připraveno 21 vzorků, které byly následně proměřeny pomocí DLS a FCS.

Tabulka 4: Příprava vzorků s příslušnou koncentrací hyaluronanu pro systém obsahující fluorescenční sondu DiI.

Systém	Koncentrace HyA [g/l]	Koncentrace sondy [M]	Koncentrace cIPA [mM]	Celkový objem [ml]
cIPA+DiI	1,000	$1 \cdot 10^{-6}$	1	4
	0,750			
	0,500			
	0,050			
	0,010			
	0,005			
	0,001			
	0,000			

#### 4.2.5 Příprava fluorescenčních silikátových částic s hyaluronanem

Fluorescenční silikátové částice sicastar®-F byly dodány od firmy Micromod. Jedná se o částice, které jsou vyráběny hydrolýzou orthosilikátů. Mají hydrofilní povrch s koncovými skupinami Si-OH. Obsahují velké množství fluorescenčních barviv kovalentně vázaných v silikátové matici a jsou stabilní v organických médiích a vodných pufrech. Konkrétně byly využity částice sicastar®-greenF, tedy se zelenou fluorescencí s excitací při 485 nm a emisí při 510 nm s velikostí 100 nm.

Po přípravě zásobního roztoku hyaluronanu s koncentrací 1 g/l byla připravena jeho koncentrační řada. Výsledné koncentrace můžeme vidět v Tabulce 5. K takto připraveným vzorkům byly přidány silikátové částice, a to tak, aby došlo k jejich naředění 1000x (dodané částice obsahovaly koncentraci 50 mg/ml). Připravené vzorky byly ponechány na magnetických míchačkách při laboratorní teplotě do dalšího měření.

Tabulka 5: Výsledné koncentrace hyaluronanu.

Koncentrace HyA [g/l]	Celkový objem [ml]
1,000	10
0,750	
0,500	
0,050	
0,010	
0,005	
0,001	
0,000	

#### 4.2.6 Měření optických vlastností vybraných fluorescenčních sond

##### 4.2.6.1 Příprava vzorků

Z hotových vezikulárních systémů byly odpipetovány 4 ml a vpraveny do suché, čisté vialky. Poté bylo přidáno dané množství sondy DiI tak, aby výsledná koncentrace sondy činila  $10^{-6}$  M a vezikul 2 mM. Vialka byla zavíčkovaná a vše bylo zvortexováno. Následně bylo víčko odstraněno a vzorek byl takto ponechán po dobu 5 minut do úplného vytěkání acetonu. Následně byla vialka opět



zavíčkovaná a dána do sušárny, kde byla ponechána k solubilizaci do druhé dne při teplotě 30 °C. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky obsahující fluorescenční sondu DiO, F16 a RBOE.

#### 4.2.6.2 Měření spektrálních vlastností

Druhý den byly všechny připravené vzorky proměřeny pomocí spektrofluorimetru Edinburgh Instruments FS5. Před samotným měřením byly podrobeny sonifikaci ve vodní lázni při 70 °C po dobu 20 minut. Jednotlivé vzorky byly postupně dány do křemenné kyvety a vpraveny do měrné cely spektrofluorimetru. Pomocí programu Fluoracle byly postupně proměřeny emisní a excitační spektra. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Šířka štěrbin byla volena tak, aby byla intenzita fluorescence optimální. Nastavení jednotlivých parametrů pro emisní skeny můžeme vidět v Tabulce 6 **Chyba! N nalezen zdroj odkazů.** a pro excitační skeny v Tabulce 7.

Tabulka 6: Nastavení parametrů pro emisní skeny.

Systém	Maximální $\lambda_{em}$ [nm]	Maximální $\lambda_{ex}$ [nm]	Rozsah emisních vlnových délek [nm]
cIPA+DiI	567	550	555 — 700
cIPA+DiO	501	460	490 — 560
cIPA+F16	520	495	500 — 700
cIPA+RBOE	584	554	560 — 700

Tabulka 7: Nastavení parametrů pro excitační skeny.

Systém	Maximální $\lambda_{em}$ [nm]	Maximální $\lambda_{ex}$ [nm]	Rozsah excitačních vlnových délek [nm]
cIPA+DiI	567	550	460 — 560
cIPA+DiO	540	484	450 — 513
cIPA+F16	520	495	420 — 515
cIPA+RBOE	584	554	500 — 580

#### 4.2.7 Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla

Pomocí přístroje Zetasizer (ZetaSizer Nano Series, Malvern Instruments, s He-Ne laserem) byl proměřen dynamický a elektroforetický rozptyl světla. Před samotným měřením byly vzorky podrobeny sonifikaci ve vodní lázni po dobu 30 minut při teplotě 70 °C. Vzorky byly následně dány do kyvety a vpraveny do držáku přístroje. Před zapnutím samotného měření byly nastaveny následující parametry pro měření dynamického rozptylu světla (Tabulka 8):

Tabulka 8: Nastavení přístroje pro měření DLS – velikosti částic.

Teplota	25 °C
Stabilizační čas	120 s
Prostředí	Vodné
Typ kyvety	Skleněná (PCS 1115)
Měřicí úhel	173°
Počet měření jednoho opakování	12
Čas jednoho měření	10 s
Počet měření	3
Pozice měření v kyvetě	Pevná pozice 1 nm

a elektroforetického rozptylu světla (Tabulka 9):

Tabulka 9: Nastavení přístroje pro měření ELS – zeta potenciálu.

Teplota	25 °C
Stabilizační čas	120 s
Prostředí	Vodné
Model	Smoluchowski
Typ kyvety	Ponorná cela pro zeta potenciál (ZEN1002)
Minimální počet měření jednoho opakování	10
Maximální počet měření jednoho opakování	15
Počet opakování	5

#### 4.2.8 Měření fluorescenční korelační spektroskopie

FCS byla proměřena pomocí fluorescenčního korelačního mikroskopu MicroTime 200 s konfokální štěrbinou Olympus IX71. Data byla získána za využití softwaru SynPho Time64 (PicoQuant). Objektív byl použit s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2.

Před jednotlivým měřením muselo nejprve dojít ke kalibraci FCS. K tomuto kroku byly využity roztoky fluorescenčních sond o známém difuzním koeficientu. Výstupem kalibračních měření byla velikost konfokálního objemu, která byla následně dosazována do matematického modelu použitého pro proložení samotných FCS dat. Před samotným měřením došlo vždy u každého vzorku k sonifikaci pomocí vodní lázně po dobu 30 minut při teplotě 70 °C.

Měření vzorku bylo provedeno následovně. Na střed čistého podložního sklíčka byla vždy nanášena kapka vzorku pomocí kapátka. Sklíčko bylo umístěno do držáku a dáno na stolek mikroskopu. Poté byl kápnut imerzní roztok a vše bylo přikryto černým krytem. Pomocí makrošroubu byla nalezena rovina ostrosti, vše bylo doostřeno mikrošroubem. Intenzita přicházející do vzorku byla upravena pomocí nastavení pozice filtrů (výběr dichroických zrcadel a emisních filtrů byl volen na základě spektrálních charakteristik jednotlivých fluorescenčních sond). Doba záznamu fluorescenčních dat se pohybovala v rozmezí 5 až 10 minut. Získané křivky byly proloženy vhodným matematickým modelem. U vybraných vzorků byla také provedena FLCS analýza (z angl. *Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy*).

Lasery byly využity celkem dva, a to s vlnovou délkou 470 a 510 nm s konstantní frekvencí 40 MHz. Dichromatické zrcadlo bylo zvoleno 405/467 a jako emisní filtry pro zelenou 520/35, respektive pro žlutou oblast 550/49.

## 5 PŘEDMLUVA K VÝSLEDKŮM

Před samotným zhodnocením dosažených výsledků je potřeba zmínit několik faktů, které mají významný vliv na zkoumané systémy a jejich následné vyhodnocení pomocí metody FCS.

První z nich odkazuje na obecnou rovnici autokorelační funkce využitou ve studii anomální difuze **Tomasze Kalwarczyka a spol.** [98], ze které vyplývá, že autokorelační funkce závisí celkem na 3 parametrech – velikost částic, jejich translační pohyb a molekulární jas (5.1):

$$G(\tau)=1+\frac{1}{\langle N \rangle} \frac{\int_0^\infty P(\tau_D)M(\tau;\tau_D)B(\tau_D)^2 d\tau_D}{\left(\int_0^\infty P(\tau_D)B(\tau_D) d\tau_D\right)^2} \quad (5.1)$$

Molekulární jas je zároveň ovlivněn polydisperzitou systému a závisí na počtu fluoroforů navázaných na částici. Čím více molekul fluoroforu bude na částici navázáno, tím větší bude molekulární jas, což negativně ovlivní hodnotu autokorelační funkce. Jestliže máme tedy polydisperzní systém, větší částice (částice obsahující více molekul fluoroforu) budou svítit intenzivněji, než částice menší (s menším nebo žádným počtem fluoroforů). Intenzita větších částic tak může částečně zastínit intenzitu částic menších, a to i v případě, že se jich v systému bude vyskytovat zanedbatelné množství. Tento fakt se pak projeví na autokorelační funkci, a jelikož jsou všechny teoretické modely autokorelační funkce odvozeny za předpokladu monodisperzního systému, bude tak pravděpodobně docházet ke zkreslování naměřených dat [99]. Některé studie se zabývaly korekcí tohoto artefaktu, a sice zavedením funkce distribuce velikostí a molekulárního jasu daných frakcí s určitou velikostí, a tedy s daným difuzním koeficientem a jasností (**Schaeffel David a spol.** [100]), nicméně k tomuto bylo zapotřebí využití již pokročilého matematického zpracování a velmi sofistikovaných výpočetních programů. Někteří autoři se navíc odvolávali na použití již nedostupných programů.

Dalším důležitým faktorem je existence anomální difuze. V rovnici (5.1) se vyskytuje parametr  $\alpha$ , což je tzv. parametr anomaly. V nejjednodušším případě, kdy je  $\alpha=1$ , se molekuly pohybují Brownovým pohybem a difuze je tak lineární. V některých případech ale může nastat situace, kdy se  $\alpha$  nebude rovnat 1 a difuze bude tedy tzv. anomální. Jestliže je  $\alpha > 1$  jedná se o superdifuzi, naopak jestliže je  $\alpha < 1$ , jedná se o subdifuzi. K subdifuzi pak dochází tehdy, když se molekula nachází v nehomogenním prostředí a její pohyb je tak brzděn [98]. Biologické systémy, značené polymery a pravděpodobně také značené vezikuly patří mezi heterogenní systémy, proto u nich bude s největší pravděpodobností docházet k anomální difuzi. Při jejich analýze pomocí metody FCS by pak bylo zapotřebí proložit křivky s využitím více difuzních časů, nebo jednodušší variantou, proložením právě výše zmíněného parametru alfa.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Příprava zásobního IPA prášku

Po přípravě byly zásobní roztoky tenzidů CTAB a SDS čiré, nicméně po 24 hodinách, kdy došlo k jejich smíchání v poměru 1:1 se vytvořil zákal, který se po dalších 24 hodinách proměnil v bílou sraženinu. Po centrifugaci, filtraci a následném usušení byl vytvořen finální prášek IPA, jehož hmotnost činila 3,9634 g. Výťažnost vzniklého prášku IPA tak činila 72 %.

Důvodem nižší výtěžnosti prášku IPA může být to, že zde nedochází ke 100% precipitaci dvou opačně nabitých tenzidů. Použitý tenzid CTAB je poměrně náchylný na teplotu, přičemž hodnota jeho Kraftovy teploty je velmi blízká laboratorní. Snížená výtěžnost také může být způsobena tím, že vzniklá sraženina je velmi jemná, proto při filtraci mohlo dojít k jejímu částečnému protečení přes použitý filtr.

### 6.2 Příprava kataniontových vezikul s cholesterolem

Po smíchání získaného IPA prášku s tenzidem DODAC a cholesterolem byly přidány skleněné kuličky. Po 24 hodinách došlo k odpaření chloroformové fáze, díky čemuž se na kuličkách vytvořil tenký film. Po rehydrataci 60 ml deionizované vody byly systémy značně zakaleny. Následovala sonifikace pomocí tyčového dispergátoru při 50 % amplitudě. Poté, co byla dosažena energie 25 kJ byly systémy čiré a vykazovaly opalescenci (Obrázek 31).



Obrázek 31: Připravené vezikulární systémy s koncentrací cholesterolu 43 mol.%. Vlevo systémy před sonifikací, vpravo po sonifikaci.

### 6.3 Vizuální pozorování

#### 6.3.1 Systémy s fluorescenčními sondami

Zásobní roztoky vybraných sond byly připraveny jejich smícháním v acetonu. Za současného míchání byly ponechány do druhého dne, kdy došlo k jejich úplnému rozpuštění.

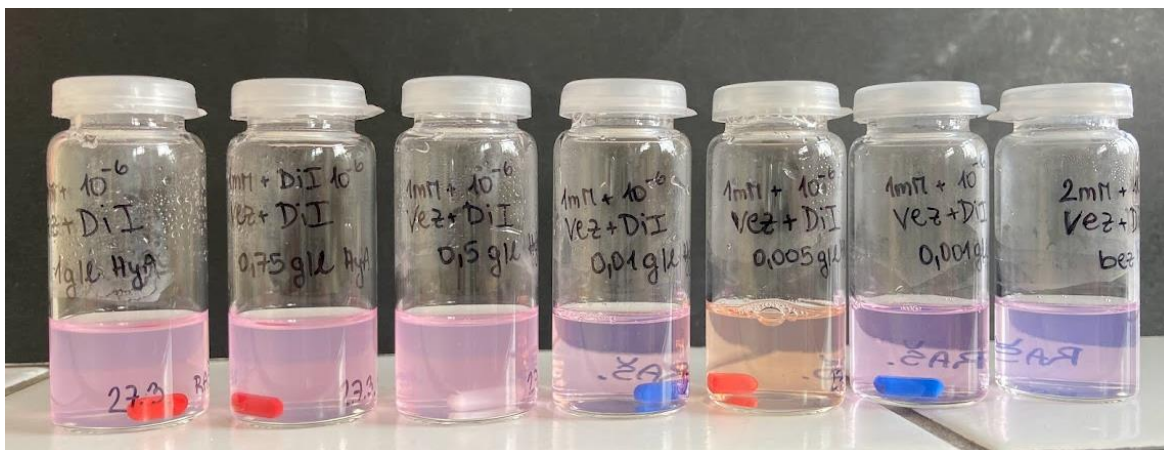
Ihned po sonifikaci systémů cIPA s cholesterolem byly vždy připraveny vzorky obsahující fluorescenční sondy. Ze zásobních roztoků bylo odebráno příslušné množství a přidáno k vezikulám, přičemž došlo k charakteristickému zbarvení roztoků. Po několika minutách byla acetonová fáze zcela odpařena a vzorky mohly být zavíčkovány a ponechány v sušárně. Ani po 24 hodinách nedošlo k zakalení vzorků, což indikuje značnou stabilitu systémů.

### 6.3.2 Systémy s hyaluronanem

Zásobní roztok hyaluronanu byl připraven smícháním předem určeného množství v deionizované vodě. Ihned po přidavku vody došlo k utvoření malých sraženin. Vše bylo ponecháno na magnetických míchačkách do druhého dne. Po 24 hodinách došlo k úplnému rozpuštění hyaluronanu. Takto připravený roztok mohl být použit pro další experimenty.

Po solubilizaci systémů cIPA obsahující fluorescenční sondu DiI, DiO a F16 byla ke vzorkům přidána daná koncentrace připraveného hyaluronanu. Ten byl přidáván postupně po kapkách, aby nedošlo k jeho vysrážení, a to za současného míchání. S rostoucím přídávkem hyaluronanu se vzorky postupně zakalovaly. Systémy s nejvyšší koncentrací hyaluronanu vykazovaly největší zakalení. Se snižující se koncentrací byl zákal méně viditelný. Takto připravené vzorky byly ponechány v sušárně za současného míchání do dalších experimentů.

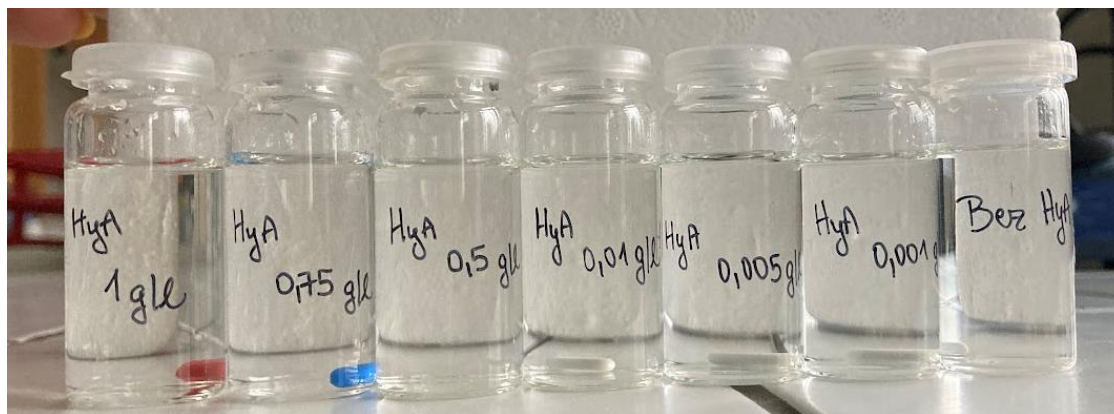
Na Obrázku 32 můžeme vidět ukázkou připravených systémů cIPA s fluorescenční sondou DiI, 24 hodin od jejich přípravy. Můžeme si všimnout zvyšujícího se zakalení s rostoucí koncentrací hyaluronanu (zprava doleva). Dále také můžeme vidět odlišné zbarvení vzorku obsahující 0,005 g/l hyaluronanu. Po 24 hodinách od jeho přidavku došlo u tohoto vzorku ke změně barvy z růžové do oranžova. Tato změna může být způsobena vysrážením přidaného hyaluronanu spolu se systémy. U vzorků obsahující fluorescenční sondy DiO a F16 nebyla tato změna zbarvení pozorována.



Obrázek 32: Koncentrační řada hyaluronanu s cIPA a fluorescenční sondou DiI po 24 hodinách od přípravy. Od nejvyšší koncentrace HyA (1 g/l), po nejnižší (bez HyA). Pozn.: barevné předměty na dně vialek představují magnetická míchadélka.

### 6.3.3 Fluorescenčně značené křemenné kuličky s hyaluronanem

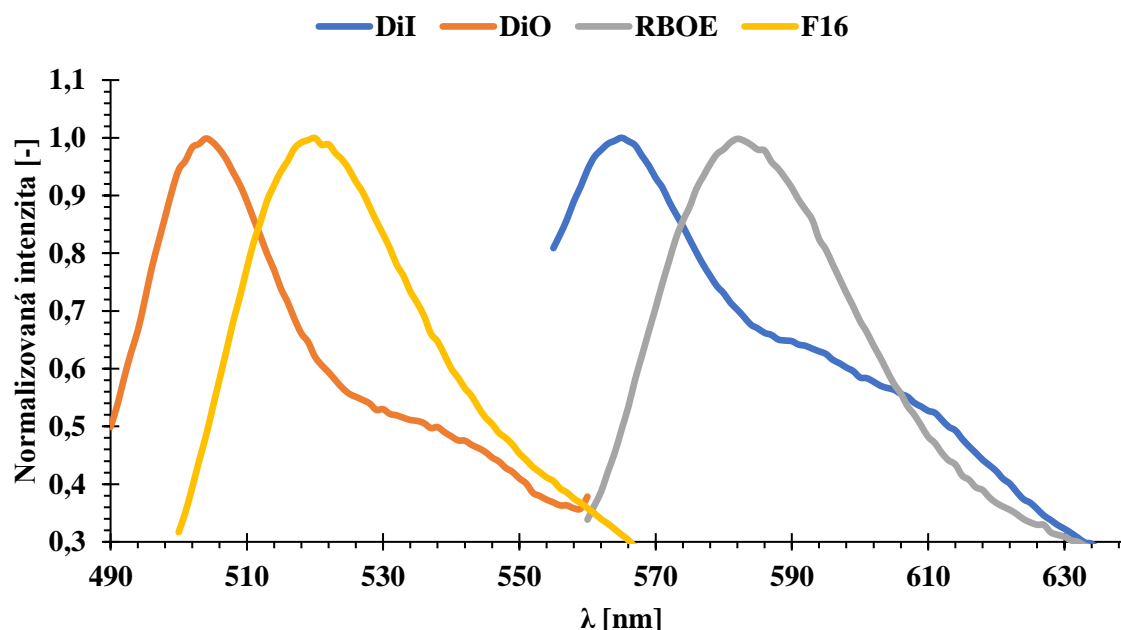
Po přípravě zásobního roztoku hyaluronanu o koncentraci 1 g/l došlo po 24 hodinách k jeho úplnému rozpuštění. Ze zásobního roztoku byly následně připraveny roztoky se silikonovými částicemi a koncentrační řadou hyaluronanu. Silikonové částice byly přidány k roztoku hyaluronanu tak, aby došlo k jejich 1000násobnému zředění, díky čemuž byly výsledné vzorky bezbarvé (Obrázek 33). Po 24 hodinách nedošlo k zakalení vzorků, vzniku sraženin ani změně barvy.



Obrázek 33: Koncentrační řada hyaluronanu s fluorescenčně značenými silikonovými částicemi. Pozn.: barevné předměty na dně vialek představují magnetická míchadélka.

## 6.4 Měření spektrálních vlastností

U vzorků obsahující cIPA s koncentrací cholesterolu 43 mol. % a fluorescenční sondy DiO, DiI, F16 nebo RBOE s koncentrací  $10^{-6}$  M byly proměřeny spektrální vlastnosti. Na Obrázku 34 můžeme vidět emisní spektrum pro všechny použité sondy. U všech vzorků je pozorovaný charakteristicky prudký nárůst intenzity při dané vlnové délce, značící emisní maximum. Po dosažení maxima se intenzita opět snižuje. Při měření excitačních vlastností, došlo k posunu maxim ke kratším vlnovým délkám. Excitační spektra jsou uvedena v kapitole 10 v Příloze.



Obrázek 34: Emisní spektrum pro systémy obsahující cIPA s koncentrací cholesterolu 43 mol. % a  $10^{-6}$  M sondy DiI, DiO, F16 nebo RBOE.

V Tabulce 10 jsou zobrazeny dosažené hodnoty maximálních emisních a excitačních vlnových délek. Naměřené hodnoty emisní vlnových délek se pohybují v rozmezí 504 až 582 nm. Největších hodnot dosahuje systém obsahující fluorescenční sondu RBOE s hodnotou 582 nm, naopak nejmenší byly pozorovány u sondy DiO s hodnotou 504 nm. Stejně tomu tak je i u excitačních maxim s hodnotami 558 a 489 nm. Naměřené spektrální vlastnosti daných sond byly dále využity pro optimalizaci měření FCS.

Tabulka 10: Emisní a excitační maxima vybraných fluorescenčních sond.

Sonda	max $\lambda_{em}$ [nm]	max $\lambda_{ex}$ [nm]
DiI	565	550
DiO	504	489
F16	520	497
RBOE	582	558

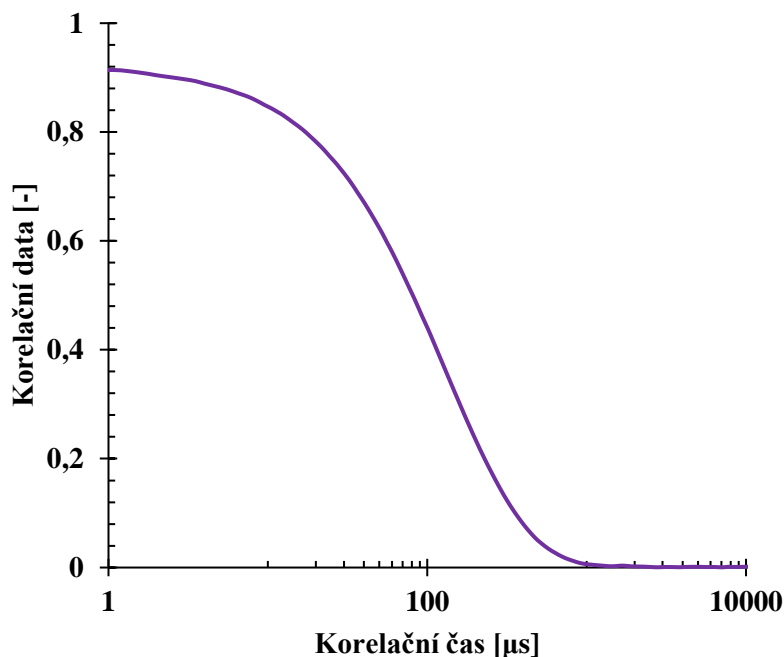
## 6.5 Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla

### 6.5.1 Velikost a stabilita systémů cIPA s přidavkem fluorescenčních sond

K potvrzení vhodnosti čtyř vybraných sond pro barvení systémů byly provedeny experimenty pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Analýza byla provedena celkem 3x pro měření velikosti a 5x pro měření zeta potenciálu.

Nejprve byly zkoumány samotné systémy tvořené pouze z cIPA se 43 mol. % cholesterolu. Přístroj zaznamenal naměřená data do tzv. korelačních křivek, které následně sám převedl do distribučních dat. Při samotném měření byly kontrolovány hodnoty korelačních dat. Na Obrázku 35 můžeme vidět korelační křivku pro systém cIPA + cholesterol 43 mol. %. Můžeme si všimnout, že korelační data nepřesahují hodnotu 1. Pokud by se tak stalo, značilo by to nesprávně připravený vzorek. Naopak pokud by se dosahovalo hodnot značně menších, než 1, jednalo by se o systém s malým počtem částic či nízkou intenzitou.

Další parametr, který byl sledován, je samotný tvar korelační křivky, která by měla utvářet esovitý tvar. Zároveň platí, že čím menší jsou částice, tím rychleji se pohybují, a tím větší budou fluktuace intenzity.

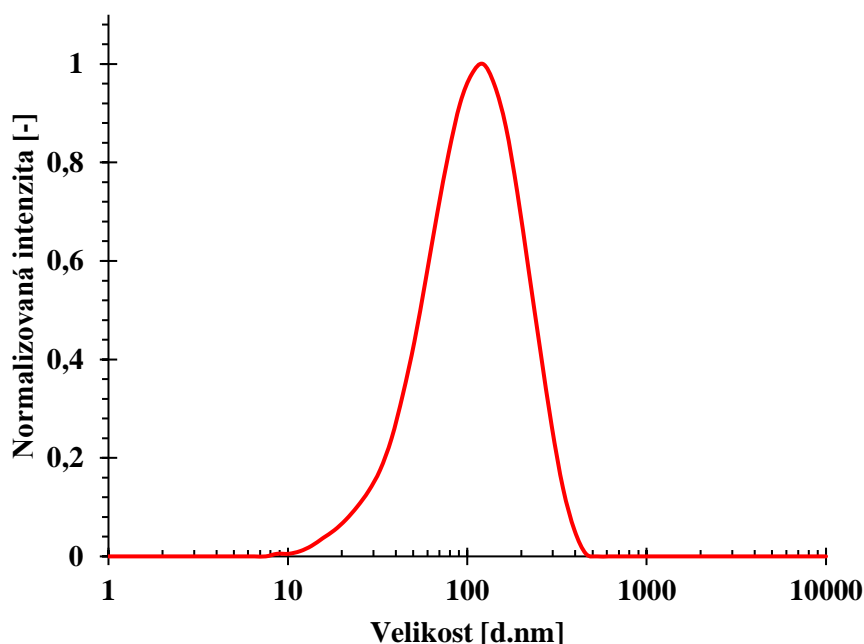


Obrázek 35: Korelační křivka pro systém obsahující cIPA se 43 mol.% cholesterolu.

Korelační křivky byly následně převedeny přístrojem do tzv. distribučních křivek, zaznamenávající nejpočetnější zastoupení velikosti částic analyzovaného systému. Jestliže se v systému nachází pouze jedna frakce, bude na distribuční křivce viditelný pouze jeden pík. Pokud se jich ale v systému bude nacházet více, budou se tvořit píky s různou intenzitou. V tomto případě je však potřeba brát v úvahu fakt, že pík s největší procentuální hodnotou intenzity nutně nemusí znamenat, že se tato frakce vyskytuje v systému nejpočetněji. Větší částice (částice s větším poloměrem) rozptylují světlo ve větší

míře než částice menší. Intenzita rozptylu je pak u rozměrnějších částic zdatnější. Tímto může docházet ke zkreslování výsledků, jelikož větší částice mohou zastínit rozptyl částic malých.

Na Obrázku 36 můžeme vidět distribuční křivku cIPA se 43 mol. %. Na grafu si můžeme všimnout pouze jednoho ostrého píku, což naznačuje přítomnost pouze jedné frakce částic s průměrnou velikostí okolo 100 nm. Kromě distribuční křivky nám přístroj také poskytne hodnotu tzv. Z-Average neboli průměrnou velikost částic. Rozměry vezikulárních systémů připravených z opačně nabitých tenzidů CTAB a SDS s přidavkem dvouřetězcového tenzidu DODAC by se měly pohybovat okolo 80 až 100 nm. Hodnota Z-Average u analyzovaných systémů byla zjištěna na  $88,6 \pm 0,4$  nm.



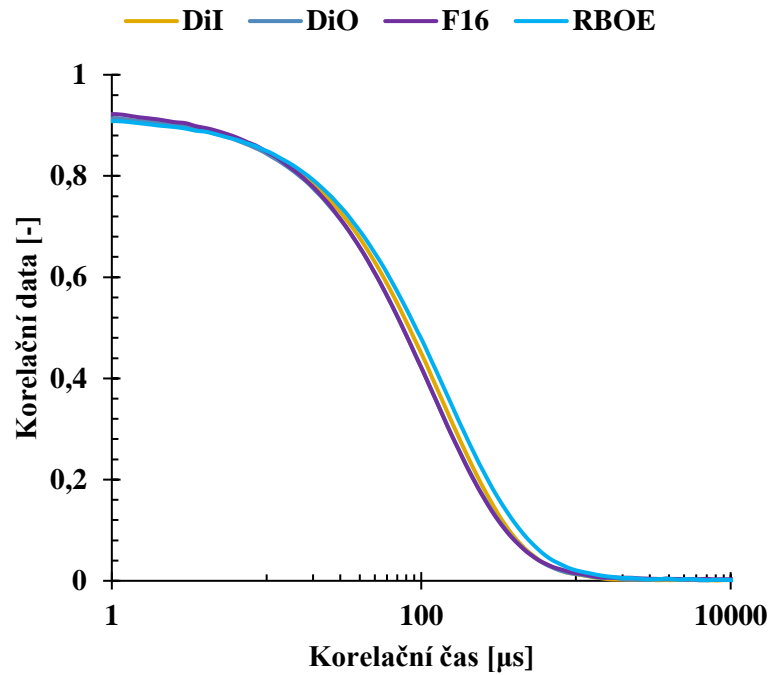
Obrázek 36: Distribuční křivka pro systémy cIPA s cholesterolem 43 mol.%.

Dalším parametrem, který nám analýza dynamického rozptylu poskytne je hodnota PDI neboli polydisperzní index. Jedná se o bezrozměrnou veličinu vypovídající o polydisperzitě systému. Obecně se uvádí, že pokud PDI nepřesahuje hodnotu 0,3, jedná se o monodisperzní systém, a tedy systém tvořený částicemi o stejné velikosti. Pokud se ovšem přesáhne hodnota 0,3, systém se považuje za polydisperzní. U analyzovaného systému byla hodnota PDI stanovena na  $0,267 \pm 0,002$ , a proto lze říct, že vzniklé systémy jsou monodisperzní. Kromě PDI se také můžeme podívat na šířku píku distribuční křivky. Obecně platí, že čím více je systém monodisperzní, tím užší pík by měl být pozorován. Z distribuční křivky analyzovaného systému pozorujeme úzký pík, což potvrzuje přítomnost monodisperzního systému.

Dále byl u systémů měřen elektroforetický rozptyl světla, pomocí analýzy zeta potenciálu. Zeta potenciál vypovídá o stabilitě vzniklých systémů. Jestliže se jeho hodnota pohybuje v intervalu od  $-30$  do  $+30$  mV, systém je považován za nestabilní. Jakékoliv jiné hodnoty nespádající do tohoto intervalu označují systém za stabilní. Ideální hodnota analyzovaných systémů by se měla pohybovat okolo 50 mV. U analyzovaných systémů bylo dosaženo hodnoty  $59,8 \pm 3,5$  mV. Lze tedy říct, že vzniklé systémy jsou vysoce stabilní.

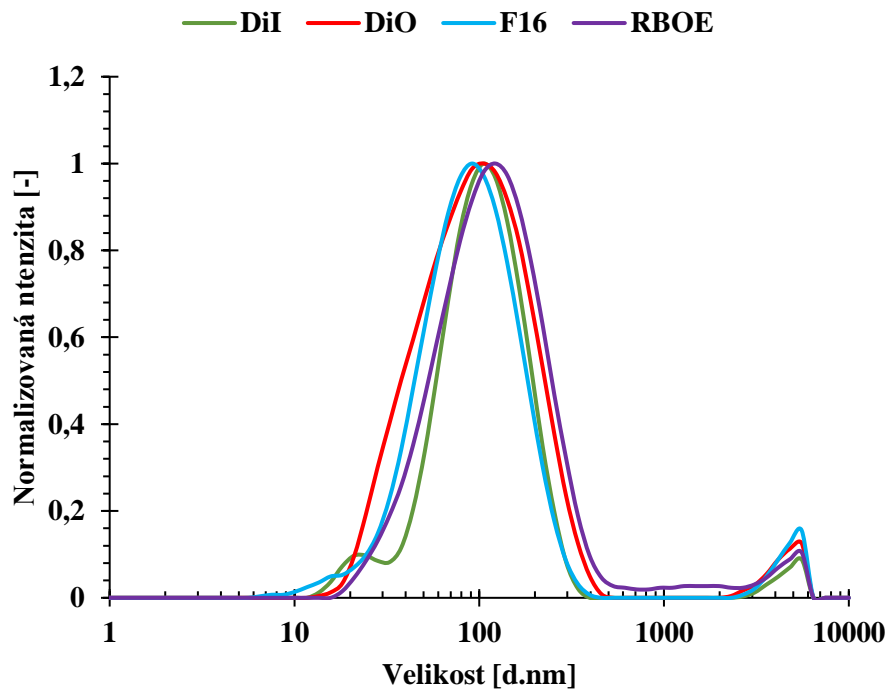
Po proměření čistých cIPA systémů s cholesterolem došlo k analýze vzorků obsahující příslušné množství fluorescenční sondy. Na Obrázku 37 pak můžeme vidět naměřená distribuční data pro systémy cIPA a příslušnou fluorescenční sondou. Z výsledků je patrné, že korelační časy jsou pro všechny využití fluorescenční sondy stejné. Z těchto zjištění lze usuzovat, že i velikost vzniklých vezikul bude stejná. Korelační data se blíží hodnotě 1 a zároveň křivka vykazuje esovitý tvar.





Obrázek 37: Distribuční data pro systémy cIPA pro vybrané fluorescenční sondy.

Poté byly získány distribuční křivky pro jednotlivá měření. Výsledky můžeme vidět na Obrázku 38.



Obrázek 38: Distribuční křivky pro systémy cIPA s vybranými fluorescenčními sondami.

Na grafu si můžeme všimnout jednoho ostrého píku u všech analyzovaných systémů, značící pouze jednu frakci částic s velikostí okolo 100 nm. Při použití fluorescenční sondy DiI si také můžeme všimnout náznaku druhého píku u velikosti zhruba 10 nm. Tento pík může být způsoben přítomností nečistot v analyzovaném systému, či shluk samotných molekul sondy.

V následující tabulce (Tabulka 11) pak můžeme vidět naměřené parametry průměrné velikosti částic, PDI a zeta potenciálu pro všechny analyzované systémy. Můžeme si všimnout, že průměrná velikost analyzovaných systémů se lehce mění s použitím různých druhů sond. Přídavkem sond také dochází k nárůstu PDI oproti systémům obsahující pouze čisté vezikuly, čímž se systémy stávají polydisperzní. Můžeme si také všimnout, že k největší změně velikosti došlo při použití fluorescenční sondy RBOE, což je také zároveň systém vykazující nejvyšší polydisperzitu. Nárůst polydisperzity přidáním fluoroforu může být vysvětlen nehomogenní distribucí barviva mezi jednotlivé vezikuly. Dále se můžeme podívat na hodnoty zeta potenciálu, které se pohybují okolo 50 až 60 mV. Všechny připravené systémy tak můžeme považovat za stabilní.

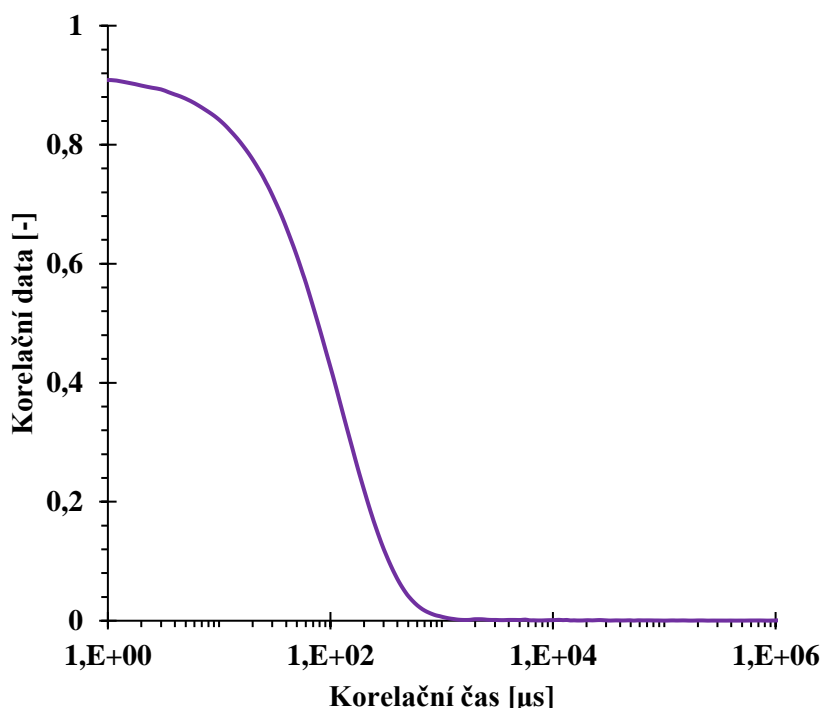
Tabulka 11: Naměřené parametry Z-Average, PDI a zeta potenciálu u analyzovaných systémů.

Systém	Z-Average [d.nm]	PDI	ZP [mV]
<b>cIPA</b>	88,62 ± 0,38	0,267 ± 0,002	59,8 ± 3,5
<b>cIPA+DiI</b>	90,98 ± 1,00	0,287 ± 0,039	57,1 ± 2,9
<b>cIPA+DiO</b>	80,91 ± 0,21	0,350 ± 0,014	55,5 ± 1,2
<b>cIPA+F16</b>	79,90 ± 1,21	0,352 ± 0,014	53,5 ± 2,0
<b>cIPA+RBOE</b>	99,68 ± 1,23	0,354 ± 0,016	62,5 ± 2,6

## 6.5.2 Velikost a stabilita vezikulárních systémů s přídavkem hyaluronanu

### 6.5.2.1 Čisté systémy cIPA s cholesterolem

Velikost čistých vezikulárních systémů se 43 mol. % cholesterolu (bez fluorescenční sondy a hyaluronanu) byla proměřena ihned po sonifikaci pomocí přístroje Zetasizer. Na Obrázku 39 můžeme vidět závislost naměřených korelačních dat na korelačním čase. Vidíme, že se korelační data pohybují okolo hodnoty 1, což značí dostatečnou intenzitu systému i optimální počet částic.



Obrázek 39: Korelační křivka pro systém cIPA + cholesterol 43 mol. %.

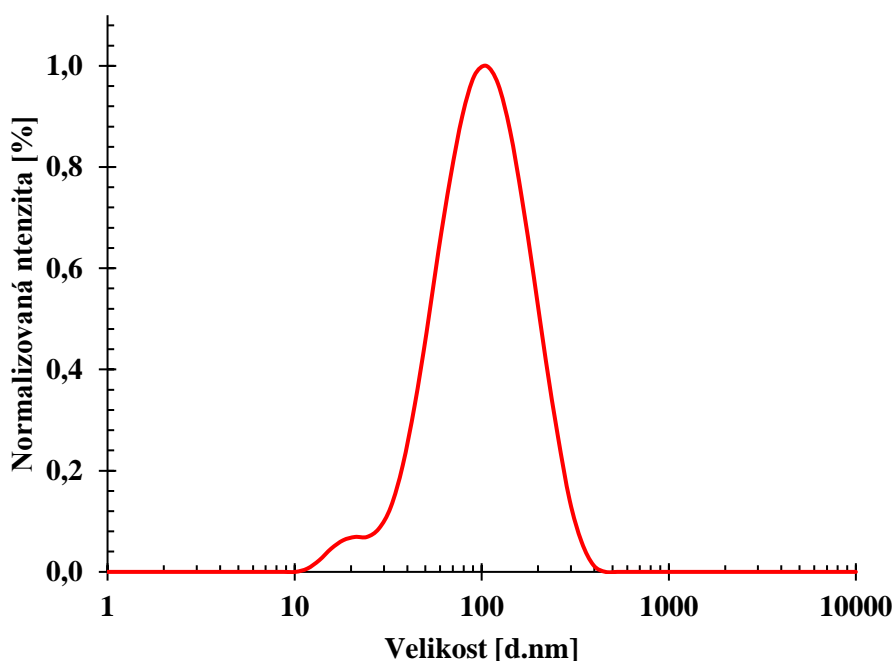
Z korelačních dat byly následně získány distribuční křivky. Následující obrázek (Obrázek 40) zobrazuje distribuční křivku, a tedy závislost intenzity na velikosti částic. Můžeme si všimnou jednoho

ostrého píku okolo 100 nm. Dále také můžeme pozorovat náznak druhého píku okolo 10 nm. Tento jev může být způsobem přítomností nečistot v analyzovaném systému či vnikem sraženin.

Průměrná velikost vzniklých částic pak byla získána pomocí Z-Average, jejíž hodnota byla stanovena jako  $85,0 \pm 0,7$  nm.

Dalším sledovaným parametrem byl polydisperzní index vypovídající o polydisperzitě vzniklých systémů. Jeho hodnota byla stanovena na  $0,251 \pm 0,004$ . Hodnota PDI je tedy nižší než 0,3, což naznačuje přítomnost monodisperzního systému. Monodisperzní systém pak také potvrzuje i úzký pík distribučních dat.

Posledním zkoumaným parametrem byl zeta potenciál měřený díky elektroforetickému rozptylu světla. Hodnota ZP byla stanovena na  $63,4 \pm 9,3$  mV. Z výsledků lze tedy říct, že vzniklé vezikulární systémy jsou stabilní a lze je použít pro další experimenty.

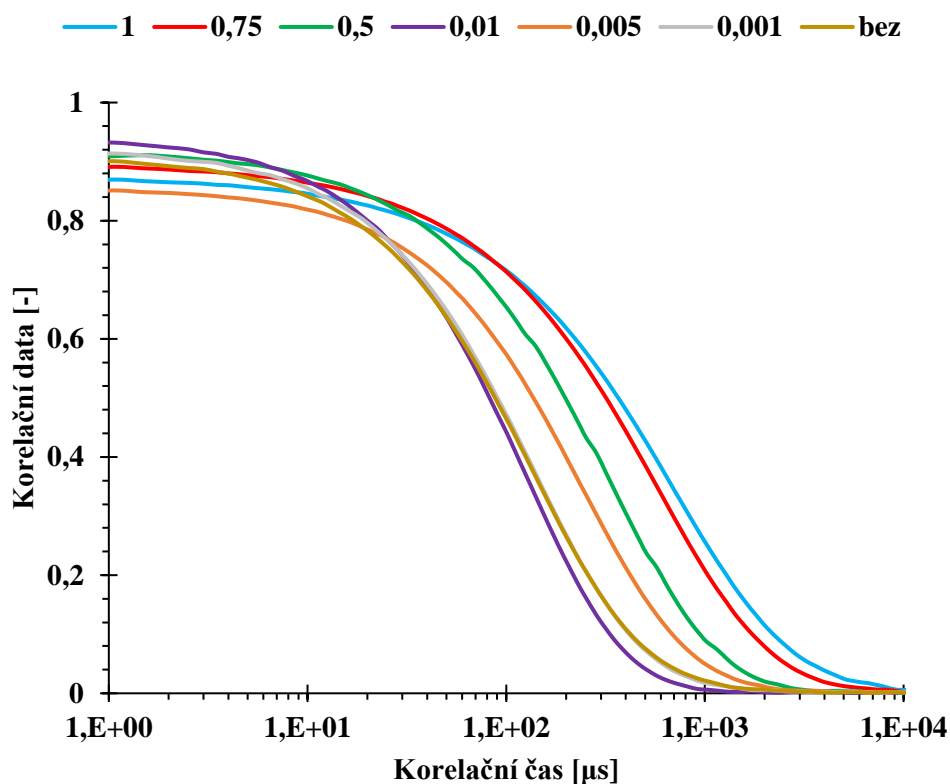


Obrázek 40: Distribuční křivka pro systémy obsahující cIPA se43 mol. % cholesterolu.

### 6.5.2.2 Využití fluorescenční sondy DiI

Následně byla zkoumána velikost a stabilita vezikul s různým přídatkem hyaluronanu. K měření byly vybrány celkem 3 fluorescenční sondy, a to DiI, DiO a F16 s koncentrací  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Výsledná koncentrace vezikul pak činila 2 mM. Celkem bylo vybráno 6 koncentrací hyaluronanu, a to 1; 0,75; 0,5; 0,01; 0,005 a 0,001 g/l. Současně také došlo k proměření systémů neobsahujících hyaluronan.

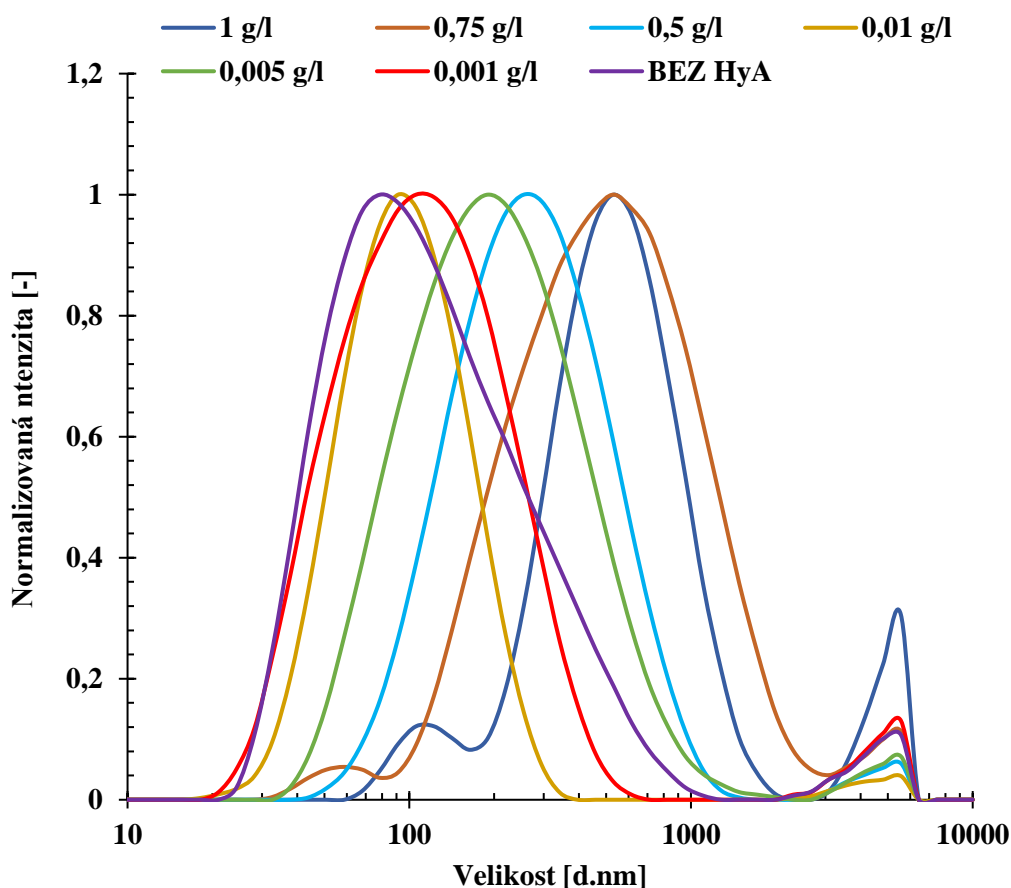
Nejprve byly proměřeny systémy obsahující fluorescenční sondu DiI. Korelační data pro všechny vybrané koncentrace hyaluronanu byly blízké hodnotě 1. Zároveň vykazovaly esovitý tvar. Na Obrázku 41 můžeme vidět závislost korelačních dat na čase pro systémy obsahující fluorescenční sondu DiI s různou koncentrací hyaluronanu. Čím delší jsou korelační časy, tím větší částice by v systému měly být přítomny. Ze závislosti je patrné, že nejvyšších korelačních časů dosahoval systém obsahující 1 g/l hyaluronanu. Z těchto dat lze tedy usuzovat, že tento systém bude tvořen největšími částicemi. S klesající koncentrací postupně klesaly i korelační časy, proto by se měla zmenšovat i velikost vzniklých částic. Výjimkou byl systém obsahující 0,01 g/l hyaluronanu, který dosahoval nejnižších časů. Tento systém by tedy měl obsahovat nejmenší částice.



Obrázek 41: Korelační křivka pro systémy obsahující různé koncentrace fluorescenční sondy DiI.

Dále byly analyzovány distribuční křivky pro připravené systémy, které můžeme vidět na Obrázku 42. Z grafu je patrné, že se s měnící koncentrací hyaluronanu měnila také velikost vzniklých částic. U všech křivek můžeme pozorovat vznik ostrého píku, napovídající o průměrné velikosti přítomných vezikul. Dále si můžeme všimnout druhého píku v levé části grafu, odkazující na artefakt přístroje. U systémů s vyšší koncentrací hyaluronanu, konkrétně 1 a 0,75 g/l také graf poukazuje i na vznik píku třetího s nižší procentuální intenzitou.

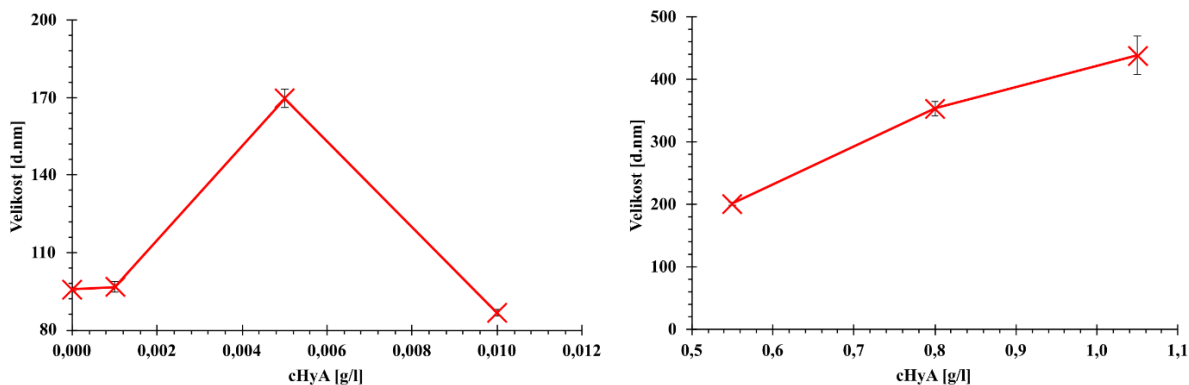
Z distribučních křivek také můžeme pozorovat šířku píku. U většiny jsou pozorovány píky širší, což naznačuje vznik polydisperzních systémů. Nejužší pík je zobrazen u vzorku obsahující 0,01 g/l hyaluronanu. Tento systém jako jediný vykazuje znaky monodisperze.



Obrázek 42: Distribuční křivka pro systémy obsahující fluorescenční sondu DiI.

Ze získaných dat Z-Average byla sestavena závislost průměrné velikosti částic na koncentraci hyaluronanu. Výsledky můžeme vidět na Obrázku 43. V pravé části vidíme závislost pro rozpětí koncentrací hyaluronanu od 0 do 0,01 g/l. S prvním přidavkem hyaluronanu zůstala velikost vzniklých částic v podstatě stejná. Z hodnoty  $95,81 \pm 0,72$  nm při nulové koncentraci, tedy pouze v přítomnosti sondy DiI, na hodnotu  $96,74 \pm 2,06$  nm s koncentrací hyaluronanu 0,001 g/l. Po větším přidavku hyaluronanu (0,005 g/l) již došlo k výraznému zvětšení velikosti částic, a to na hodnotu  $169,67 \pm 3,65$  nm. Toto zjištění může poukazovat na fakt, že při této koncentraci dochází k precipitaci, což by potvrdzovalo i výsledky zjištěné při vizuálním pozorování, kdy u koncentrace 0,005 g/l došlo ke změně zbarvení z růžové do oranžova. Při dalším přidavku, kdy koncentrace činila 0,01 g/l, došlo opět k rapidnímu snížení velikosti na hodnotu  $86,7 \pm 1,4$  nm. Tato hodnota zároveň odpovídá velikosti systémů tvořených pouze z čistých vezikul, tedy bez přidavku hyaluronanu a fluorescenční sondy.

V levé části můžeme vidět závislost průměrné velikosti částic na vyšších koncentracích hyaluronanu, tedy 0,5 až 1 g/l. Můžeme si všimnout, že s rostoucí koncentrací dochází také ke zvyšování průměrné velikosti. U systému obsahující koncentraci 0,5 g/l byla průměrná velikost zjištěna na hodnotu  $201,60 \pm 2,51$  nm. S přidavkem hyaluronanu na koncentraci 0,75 g/l se velikost zvýšila na hodnotu  $353,57 \pm 11,91$  nm. U nejvyšší koncentrace, tedy 1 g/l, velikost vystoupala až k hodnotě  $438,70 \pm 31,40$  nm. U dvou posledních systémů si také můžeme povšimnout vysokých odchylek, což poukazuje na vznik dvou frakcí částic o dvou velikostech pozorovaných na distribučních křivkách.



Obrázek 43: Závislost průměrné velikosti částic na koncentraci hyaluronanu pro systém obsahující fluorescenční sondu DiI. Vpravo koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo koncentrace 0,5 až 1 g/l hyaluronanu.

Dále byla sledována polydisperzita připravených systémů. V Tabulce 12 můžeme vidět hodnoty PDI pro systémy s různou koncentrací hyaluronanu. Můžeme si všimnout, že vzorky s vyšší koncentrací dosahovaly i vyšších hodnot polydisperzního indexu. Zejména se pak jedná o systémy s 1 a 0,75 g/l hyaluronanu s hodnotami  $0,499 \pm 0,054$  a  $0,488 \pm 0,015$ . Tyto vzorky tedy vykazují největší polydisperzní vlastnosti a potvrzují tak výsledky předchozích pozorování. Nejmenší polydisperzity naopak dosáhl systém s 0,01 g/l hyaluronanu s  $0,216 \pm 0,015$ , což ukazuje přítomnost monodisperzního systému. Tato hodnota je navíc opět velmi podobná hodnotě pro systém pouze s čistými vezikuly. Hraniční hodnoty PDI dosáhl systém s 0,005 g/l hyaluronanu, kdy bylo PDI zjištěno na  $0,306 \pm 0,039$ . Nicméně po bližším přezkoumání distribuční křivky byl pozorován širší pík, proto lze říct, že se jedná spíše o polydisperzní systém. Z naměřených dat tedy vyplývá, že s přidávkem hyaluronanu dochází ke zvýšení hodnot PDI, a tedy ke zvýšené tvorbě systémů o různé velikosti částic (výjimkou koncentrace 0,01 g/l). Přidaný hyaluronan tak interaguje s opačně nabitými vezikuly a pravděpodobně tak vytváří celky o různých velikostech, kdy dochází k nárůstu nehomogenní distribuce velikostí.

Také u systému neobsahující hyaluronan (pouze se sodou DiI) došlo ke značnému nárůstu polydisperzního indexu oproti čistým vezikulám z hodnoty  $0,251 \pm 0,004$  (čisté vezikuly) na  $0,369 \pm 0,004$  (cIPA + DiI). Toto zjištění tedy potvrzuje pozorování zjištěné z předchozích měření, kdy přidávkem sondy pravděpodobně dochází k její nehomogenní distribuci mezi jednotlivé vezikuly.

Tabulka 12: Polydisperzní index pro různé koncentrace hyaluronanu pro systém obsahující sondu DiI.

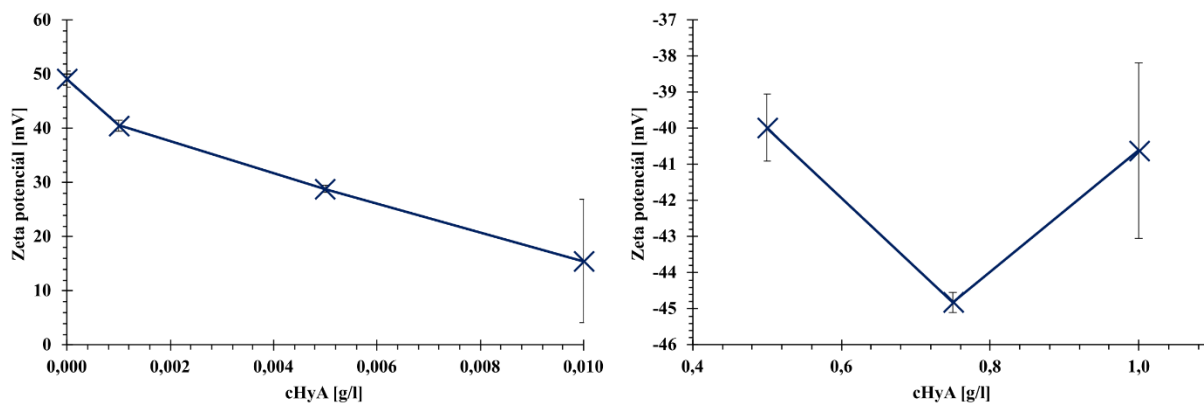
cHyA [g/l]	PDI [-]
1,000	$0,499 \pm 0,054$
0,750	$0,488 \pm 0,015$
0,500	$0,427 \pm 0,007$
0,010	$0,216 \pm 0,015$
0,005	$0,306 \pm 0,039$
0,001	$0,340 \pm 0,004$
0,000	$0,369 \pm 0,021$

Posledním měřením bylo měření zeta potenciálu související se stabilitou vzniklých systémů. Na Obrázku 44 můžeme vidět závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu. Již při prvním pohledu na graf je patrné, že s rostoucí koncentrací hyaluronanu dochází k poklesu zeta potenciálu. Jev souvisí s faktem, že hyaluronan, jakožto záporně nabitý polysacharid, vnáší do systému záporný náboj.

S jeho rostoucí koncentrací se záporný náboj zvyšuje na úkor kladně nabitého DODACu, čímž také dochází k poklesu zeta potenciálu. V Tabulce 13 pak můžeme vidět vypočtený poměr nábojů záporně nabitého hyaluronanu a kladně nabitého DODACu. Výpočet byl proveden na základě znalosti molekulové hmotnosti hyaluronanu ( $401,229 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a koncentrace kladného náboje, odpovídající 10 % (z poměru IPA:DODAC rovna 9:1), za předpokladu, že bude docházet k úplné disociaci karboxylových skupin postranních řetězců hyaluronanu, a že distribuce kladného náboje bude uniformní na obou stranách vezikulární membrány.

Je patrné, že první čtyři koncentrace, a tedy od 0,001; 0,005; 0,01 a 0,05 g/l mají kladné hodnoty zeta potenciálu, stejně jako systém neobsahující hyaluronan. Vypočtené hodnoty charge ratio neboli poměru nábojů jsou menší než 1. U systému je tedy přebytek DODACu oproti hyaluronanu a poměr kladného náboje tak převládá. Se zvýšením koncentrace na 0,5 g/l hyaluronanu a výše dojde k signifikantnímu snížení hodnot zeta potenciálu, a to až k záporným hodnotám. Poměr nábojů je zde signifikantně větší než 1. V systémech tak převládá záporný náboj hyaluronanu nad kladným DODACem, což způsobuje snížení hodnot zeta potenciálu.

Hodnoty zeta potenciálu u systému s koncentrací 0,001 g/l hyaluronanu a systému neobsahující hyaluronan byly větší než 30 mV. Toto zjištění poukazuje na vznik stabilních systémů. Naopak vzorky s 0,005 a 0,01 g/l hyaluronanu již dosahují hodnot menší než 30 mV, čímž se považují za nestabilní. Toto zjištění tak opět potvrzuje výsledky předchozí analýzy, kdy u systému s 0,005 g/l hyaluronanu pravděpodobně došlo k precipitaci. U vyšších koncentrací hyaluronanu (0,5; 0,75 a 1 g/l) byly dosažené hodnoty zeta potenciálu menší než  $-30 \text{ mV}$ . Všechny tyto systémy se tedy vyznačují svojí stabilitou. Zároveň u posledního vzorku (1 g/l) došlo k opětovnému zvýšení zeta potenciálu z hodnoty  $-44,8 \pm 0,3$  na  $-40,6 \pm 2,4 \text{ mV}$ .



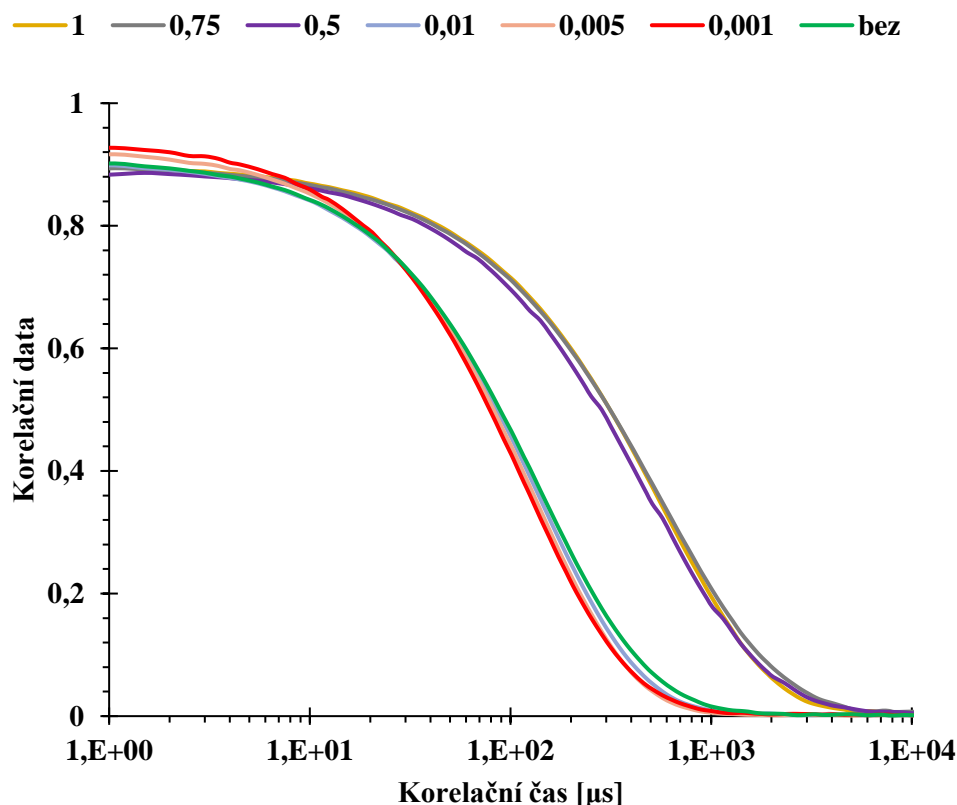
Obrázek 44: Závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu pro systémy obsahující fluorescenční sondu DiI. Vpravo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo pro 0,5 až 1 g/l hyaluronanu.

Tabulka 13: Poměr nábojů hyaluronanu ku DODAC.

cHyA [g/l]	poměr nábojů	ZP [mV]
1,000	49,838	$-40,6 \pm 2,4$
0,750	37,379	$-44,8 \pm 0,3$
0,500	24,919	$-40,0 \pm 0,9$
0,010	0,498	$23,0 \pm 7,1$
0,005	0,249	$28,9 \pm 0,6$
0,001	0,050	$40,6 \pm 1,0$
0,000	0,000	$49,2 \pm 1,5$

### 6.5.2.3 Využití fluorescenční sondy DiO

Dále byla pro proměření koncentrační řady hyaluronanu využita fluorescenční sonda DiO. I zde byly nejprve analyzovány korelační křivky, které můžeme vidět na Obrázku 45. Můžeme vidět, že u všech vzorků se nejvyšší hodnoty pohybovaly okolo 1, což naznačuje optimální intenzitu i počet přítomných částic ve vzorku. Dále také můžeme pozorovat, že se korelační data rozdělila do dvou celků – s delším a kratším korelačním časem. Delší korelační časy byly zjištěny u vzorků obsahující vyšší koncentraci hyaluronanu a napovídají tak o větší velikosti vzniklých vezikul. Nižších korelačních dat, a tedy menších rozměrů vzniklých částic bylo dosaženo u vzorků s nižší koncentrací hyaluronanu (0,01 g/l a nižší).



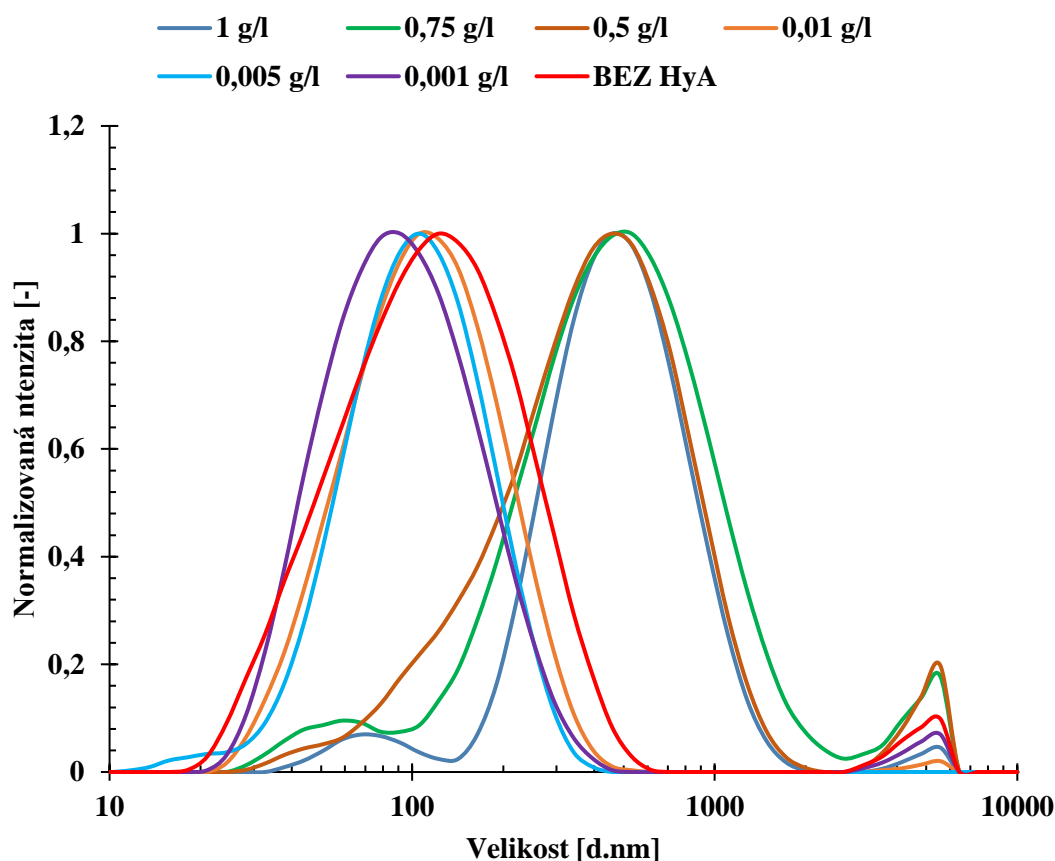
Obrázek 45: Korelační křivky pro systémy obsahující cIPA s fluorescenční sondou DiO pro různé koncentrace hyaluronanu.

Po převedení korelačních dat a normalizaci byla získána závislost normalizované intenzity na velikosti vzniklých částic. Na Obrázku 46 můžeme vidět distribuční křivky pro systémy obsahující cIPA a fluorescenční sondu DiO pro různé koncentrace hyaluronanu. U všech naměřených dat si můžeme všimnout přítomnosti jednoho významného píku. I zde, stejně jako v případě korelačních křivek, je patrné rozdělení distribucí do dvou celků, a to na systémy obsahující menší částice a systémy s větší velikostí částic. Píky pohybující se okolo 100 nm odpovídají roztokům s nižší koncentrací hyaluronanu, zatímco píky u větších velikostí patří vyšším koncentracím hyaluronanu.

U systémů obsahující 1 a 0,75 g/l hyaluronanu se objevil i třetí pík, značící přítomnost druhé frakce částic o menší velikosti. Toto zjištění opět může znamenat, že s vyšší koncentrací hyaluronanu dochází ke tvorbě sraženin, což potvrzuje data zjištěná z předchozího měření pomocí sondy DiI.

Dále si můžeme všimnout, že distribuční křivky systémů obsahující vyšší koncentrace hyaluronanu jsou širší než u systémů s koncentrací nižší. Toto naznačuje větší polydisperzitu.





Obrázek 46: Distribuční křivka pro systémy obsahující cIPA s fluorescenční sondou DiO a vybranými koncentracemi hyaluronanu.

Vznik polydisperzních systémů se pak potvrdil také analýzou polydisperzního indexu, jehož hodnoty můžeme vidět v Tabulce 14. Z naměřených dat je patrné, že vzorky obsahující koncentraci hyaluronanu vyšší než 0,5 g/l značně přesahují hodnotu 0,3. Nejvyšších hodnot pak dosahoval systém s 0,75 g/l hyaluronanu, který překročil i PDI 0,5.

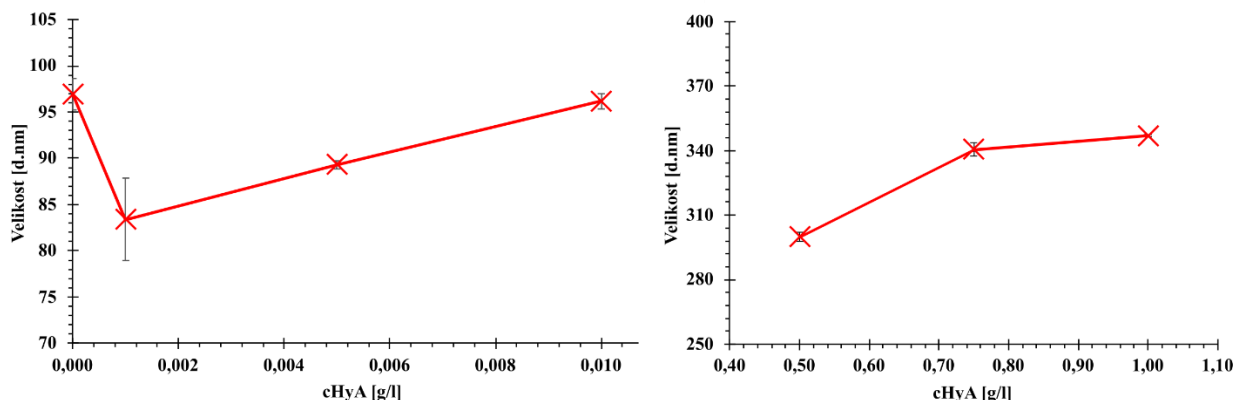
Naopak systémy s nižší koncentrací hyaluronanu obecně dosahovaly nižších hodnot PDI. Nejnižšího polydisperzního indexu pak ukázal systém s 0,005 g/l hyaluronanu s PDI  $0,216 \pm 0,015$  a dále s 0,010 a 0,001 g/l s hodnotami  $0,240 \pm 0,007$  a  $0,261 \pm 0,019$ .

U vzorku neobsahující hyaluronan (cIPA + DiO) došlo opět k nárůstu PDI oproti čistým vezikulám, a to na hodnotu  $0,351 \pm 0,023$ .

Tabulka 14: Hodnoty PDI pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu pro systémy s fluorescenční sondou DiO.

cHyA [g/l]	PDI [-]
1,000	$0,438 \pm 0,031$
0,750	$0,541 \pm 0,014$
0,500	$0,498 \pm 0,010$
0,010	$0,240 \pm 0,007$
0,005	$0,216 \pm 0,015$
0,001	$0,261 \pm 0,019$
0,000	$0,351 \pm 0,023$

Na Obrázku 47 můžeme vidět závislost průměrné velikosti částic na koncentraci hyaluronanu pro systémy obsahující fluorescenční sondu DiO. V pravé části je graf pro nižší koncentrace (0 až 0,01 g/l), v levé pro vyšší (0,5 až 1 g/l). Z naměřených dat je patrné, že s rostoucí koncentrací hyaluronanu, dochází ke zvětšování vzniklých částic.

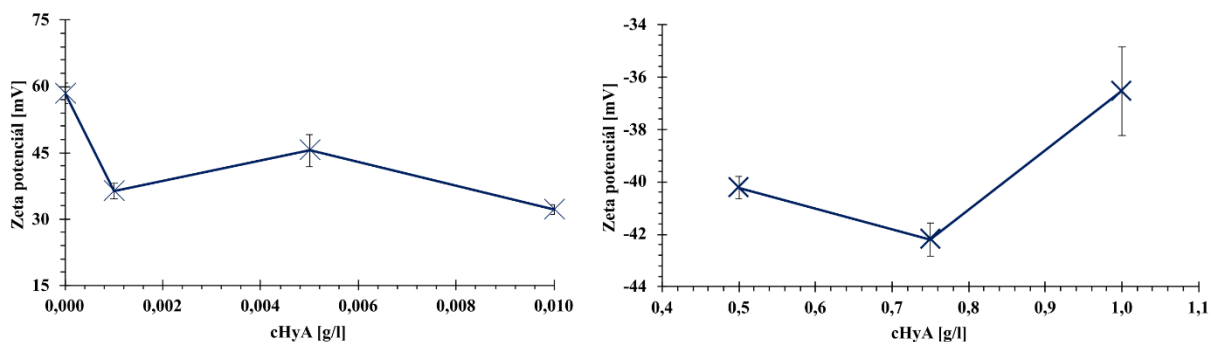


Obrázek 47: Závislost velikosti částic na koncentraci hyaluronanu u systémů obsahující fluorescenční sondu DiO. Vpravo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo pro 0,5 až 1 g/l.

Pomocí elektroforetického rozptylu světla byl měřen zeta potenciál vzniklých částic. Závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu pak můžeme vidět na Obrázku 48. V pravé části opět pro nízké koncentrace (0 až 0,01 g/l), v levé pro vyšší (0,5 až 1 g/l).

Pro nízké koncentrace hyaluronanu se zeta potenciál opět pohyboval v kladných hodnotách. Se zvyšující se koncentrací docházelo ke snižování zeta potenciálu s výjimkou systému obsahující 0,005 g/l, kdy došlo ke zvýšení z hodnoty  $36,36 \pm 1,84$  na  $45,50 \pm 3,54$  mV. Po zvýšení koncentrace hyaluronanu na 0,01 g/l se zeta potenciál opět snížil na  $32,24 \pm 1,13$  mV. Z naměřených dat je patrné, že všechny analyzované systémy se považují za stabilní, díky hodnotě potenciálu větší než 30 mV.

V levé části můžeme pozorovat průběh zeta potenciálu s přidávkem vyšší koncentrací hyaluronanu. Můžeme si všimnout, že všechny naměřené hodnoty se pohybují v záporných číslech. Rápidní snížení zeta potenciálu k záporným hodnotám opět souvisí s poměrem nábojů hyaluronan ku DODAC, kdy při vyšších koncentracích hyaluronanu převládá v systému jeho záporný náboj nad kladným nábojem DODACu, čímž se zeta potenciál snižuje k záporným hodnotám. S přidávkem hyaluronanu z 0,5 na 0,75 g/l nejprve dojde k mírnému snížení hodnot zeta potenciálu z  $-40,22 \pm 0,41$  na  $-41,20 \pm 0,63$  mV. Po dalším přidávku, kdy je koncentrace rovna 1 g/l, zeta potenciál opět mírně vzroste na hodnotu  $-36,54 \pm 1,69$  mV. Z naměřených dat vyplývá, že všechny analyzované systémy můžeme považovat za stabilní, jelikož všechny hodnoty zeta potenciálu jsou nižší, než  $-30$  mV.

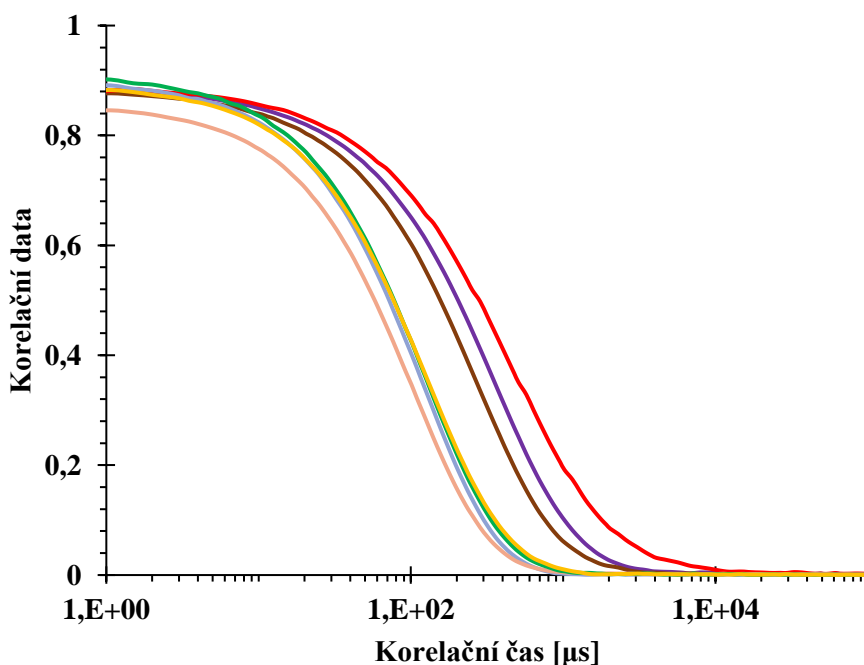


Obrázek 48: Závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu pro systémy obsahující fluorescenční sondu F16. Vpravo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo 0,5 až 1 g/l hyaluronanu.

#### 6.5.2.4 Využití fluorescenční sondy F16

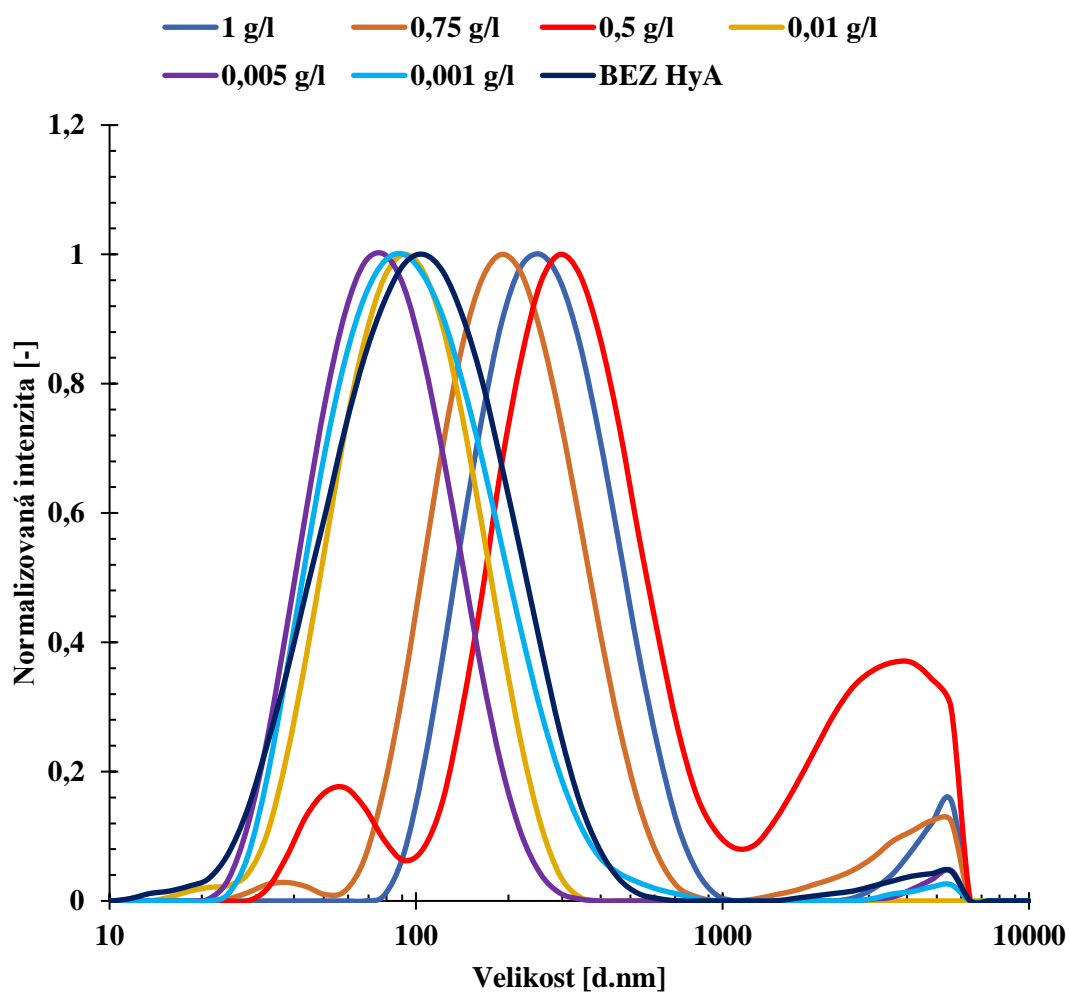
Jako poslední byla zkoumána koncentrační řada hyaluronanu pomocí sondy F16. Na Obrázek 49 můžeme vidět korelační křivky pro systémy cIPA obsahující fluorescenční sondu F16 a různé koncentrace hyaluronanu. Můžeme si všimnout, že se hodnoty korelačních dat pro všechny systémy pohybují okolo hodnoty 1. Zároveň křivky vykazují esovitý tvar. Dále si můžeme všimnout rozdělení dat do dvou celků, stejně jako v případě použití fluorescenční sondy DiO. Nicméně zde není rozdělení tak patrné jako v předchozím případě. Delších korelačních časů dosahují systémy s vyšší koncentrací hyaluronanu, naopak kratších korelačních časů vzorky s nižší koncentrací hyaluronanu. Nejdelších časů dosahuje systém obsahující 0,5 g/l hyaluronanu. Můžeme tedy předpokládat, že u tohoto systému se objeví největší částice. Naopak nejkratších časů, a tedy nejmenších částic, vykazuje systém s 0,005 g/l hyaluronanu.

— 1 — 0,75 — 0,5 — 0,01 — 0,005 — 0,001 — bez



Obrázek 49: Korelační křivky pro systém cIPA s fluorescenční sondou F16 pro různé koncentrace hyaluronanu.

Na Obrázku 50 pak můžeme vidět distribuční křivky pro systémy s fluorescenční sondou F16 pro různé koncentrace hyaluronanu. Z grafu je patrné, že s měnící se koncentrací dochází také ke změně velikosti částic. Dále, stejně jako u korelačních křivek, i zde došlo k rozdělení dat na dva celky. Můžeme si všimnout, že vzorky s vyšším obsahem hyaluronanu mají píky při větších velikostech než vzorky s nižší koncentrací. Z grafu je dále patrné, že u koncentrací hyaluronanu 0,75 g/l a 0,5 g/l došlo kromě jednoho ostrého píku i k vytvoření druhého, při menších velikostech, značící přítomnost druhé frakce částic. Podobné výsledky byly pozorovány i pomocí dvou předchozích fluorescenčních sond DiI a DiO. Data tedy potvrzují teorii o vzniku sraženin s použitím vyšší koncentrace hyaluronanu.



Obrázek 50: Distribuční křivky pro systémy obsahující cIPA s fluorescenční sondou F16 pro různé koncentrace hyaluronanu.

Dále byla analyzována polydisperzita systémů pomocí polydisperzního indexu viditelného v Tabulce 15.

Tabulka 15: Hodnoty polydisperzního indexu pro různé koncentrace hyaluronanu pro systémy cIPA s fluorescenční sondou F16.

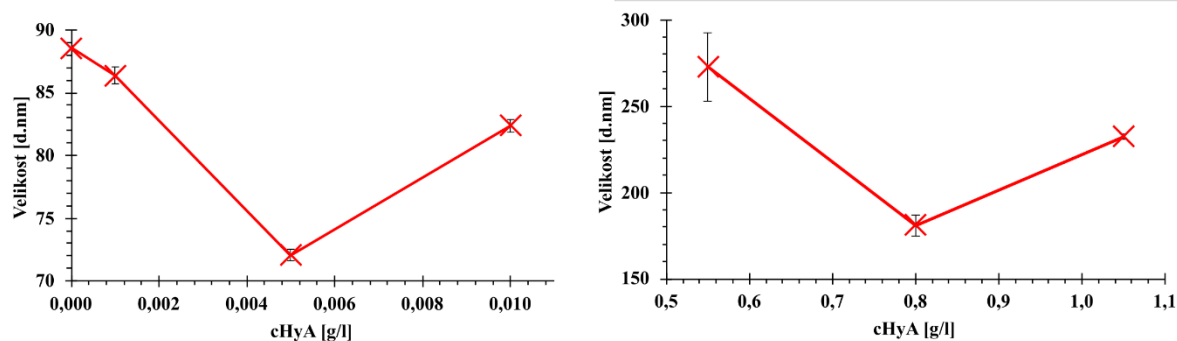
cHyA [g/l]	PDI [-]
1,000	0,393 ± 0,028
0,750	0,359 ± 0,023
0,500	0,784 ± 0,166
0,010	0,189 ± 0,008
0,005	0,215 ± 0,014
0,001	0,245 ± 0,010
0,000	0,290 ± 0,023

Můžeme si všimnout, že hodnoty PDI pro systémy s nízkou koncentrací hyaluronanu dosahují velmi nízkých hodnot. Nejnižší hodnoty dosáhl vzorek obsahující 0,01 g/l hyaluronanu s PDI  $0,189 \pm 0,008$ . Všechny naměřené hodnoty spadají pod PDI 0,3 což naznačuje monodisperzní systémy. Polydisperzitu také můžeme zkontrolovat u šířky píků distribučních křivek.

Naopak systémy s vysokou koncentrací hyaluronanu (0,5 g/l a výš) vykazovaly vysoké hodnoty PDI, které zřejmě byly způsobeny přítomností druhého píku u menších velikostí. U systém obsahující 0,5 g/l hyaluronanu bylo dosaženo obzvláště vysoké hodnoty, a to  $0,784 \pm 0,166$ .

Na Obrázku 51 pak můžeme vidět závislost průměrné velikosti částic na rostoucí koncentraci hyaluronanu pro systémy obsahující fluorescenční sondu F16. V levé části je zobrazena závislost pro nízké koncentrace (0 až 0,1 g/l). Zde si můžeme všimnout, že s rostoucí koncentrací dochází ke zmenšení průměrné velikosti částic. Po dosažení 0,005 g/l dojde k opětovnému zvýšení hodnot ze  $72,06 \pm 0,47$  na  $82,36 \pm 0,51$  nm.

Stejný trend můžeme také pozorovat v pravé části, kde jsou zobrazeny hodnoty pro vyšší koncentrace (0,5 až 1 g/l), kdy s rostoucí koncentrací hyaluronanu dojde nejprve k poklesu velikosti z  $272,75 \pm 19,66$  nm na  $180,90 \pm 5,82$  nm a následně k opětovnému zvýšení na hodnotu  $232,37 \pm 1,30$  nm. Vyšší odchylky mohou být způsobeny vysokou polydisperzitou, zejména pak u systému s 0,5 g/l.

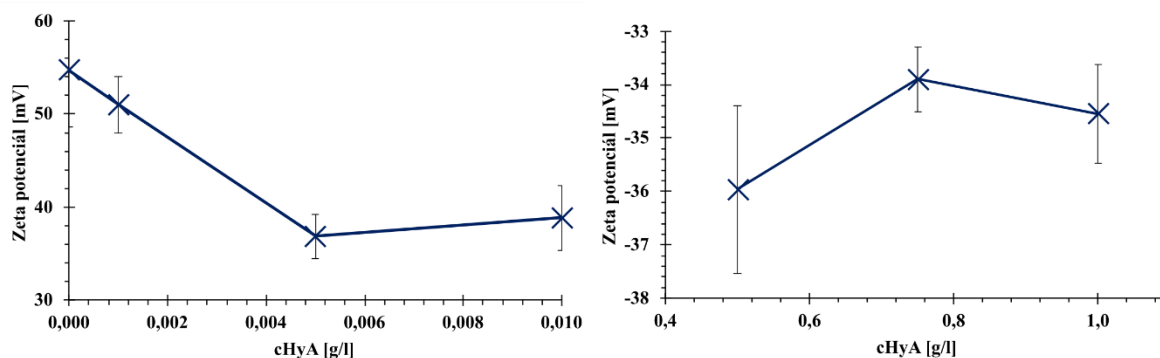


Obrázek 51: Závislost průměrné velikosti částic na koncentraci hyaluronanu pro systémy cIPA s fluorescenční sondou F16. Vpravo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo pro koncentrace 0,5 až 1 g/l hyaluronanu.

Stabilita systémů byla sledována pomocí elektroforetického rozptylu světla měřením zeta potenciálu. Závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu pro systémy obsahující fluorescenční sondu F16 můžeme vidět na Obrázku 52. V pravé části si můžeme všimnou závislosti pro nízké koncentrace hyaluronanu (0 až 0,01 g/l), kdy s rostoucí koncentrací hyaluronanu nejprve dochází k postupnému snižování hodnot zeta potenciálu. Po překročení koncentrace 0,005 g/l došlo k mírnému navýšení hodnot z  $36,86 \pm 2,40$  mV na  $38,84 \pm 3,51$  mV. Všechny naměřené hodnoty nicméně

dosahovaly hodnot větších než 30 mV, díky čemuž můžeme vzniklé systémy považovat za stabilní. Nejvyšší zeta potenciál měl systém s nulovou koncentrací hyaluronanu, a to  $54,72 \pm 6,09$  mV.

Hodnoty pro vyšší koncentrace hyaluronanu pak můžeme vidět v levé části. Opět si můžeme všimnout výrazného poklesu potenciálu oproti systémům s nižší koncentrací, a to až k záporným hodnotám. Pokles opět souvisí se změnou poměru záporně nabitého hyaluronanu a kladně nabitého DODACu. Nejprve zde dochází k růstu zeta potenciálu s rostoucí koncentrací hyaluronanu, a po překročení koncentrace 0,75 g/l dojde k mírnému poklesu z  $-33,90 \pm 0,60$  na  $-34,54 \pm 0,93$  mV. Ačkoliv se všechny naměřené hodnoty pohybují nad  $-30$  mV, jedná o hraniční hodnoty, a proto lze říct, že jsou systémy méně stabilní.



Obrázek 52: Závislost zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu pro systémy cIPA s fluorescenční sondou F16. Vpravo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l. Vlevo 0,5 až 1 g/l hyaluronanu.

#### 6.5.2.5 Srovnání měření pomocí fluorescenčních sond

Z výše uvedených dat lze shrnout několik poznatků. Měřením zeta potenciálu došlo ke zjištění, že při vyšší koncentraci hyaluronanu dochází k jeho rapidnímu poklesu až k záporným hodnotám. Tento pokles souvisí s poměrem náboje mezi záporně nabitým hyaluronanem a kladně nabitým tenzidem DODAC. Při vysokých koncentracích hyaluronanu je poměr nábojů mnohonásobně větší než 1. V systému tak bude převládat záporný náboj, což se také projeví na záporných hodnotách zeta potenciálu.

Dále docházelo s přidavkem fluorescenční sondy k systémům ke zvýšení polydisperzity. Tento fakt může naznačovat nehomogenní rozdělení sondy do jednotlivých vezikul a vznik heterogenního prostředí.

S přidavkem hyaluronanu také dochází nejen ke zvětšování velikosti vzniklých systémů, ale také ke zvyšování jejich polydisperzity. Tyto data tedy mohou naznačovat to, že záporně nabitý hyaluronan interaguje s kladně nabitými vezikuly, přičemž se tvoří útvary o větších velikostech. Zároveň některé vezikuly mohou interagovat s hyaluronanem méně než jiné a mohou se tak utvářet částice o různých velikostech, což by vysvětlovalo zvyšování polydisperzity.

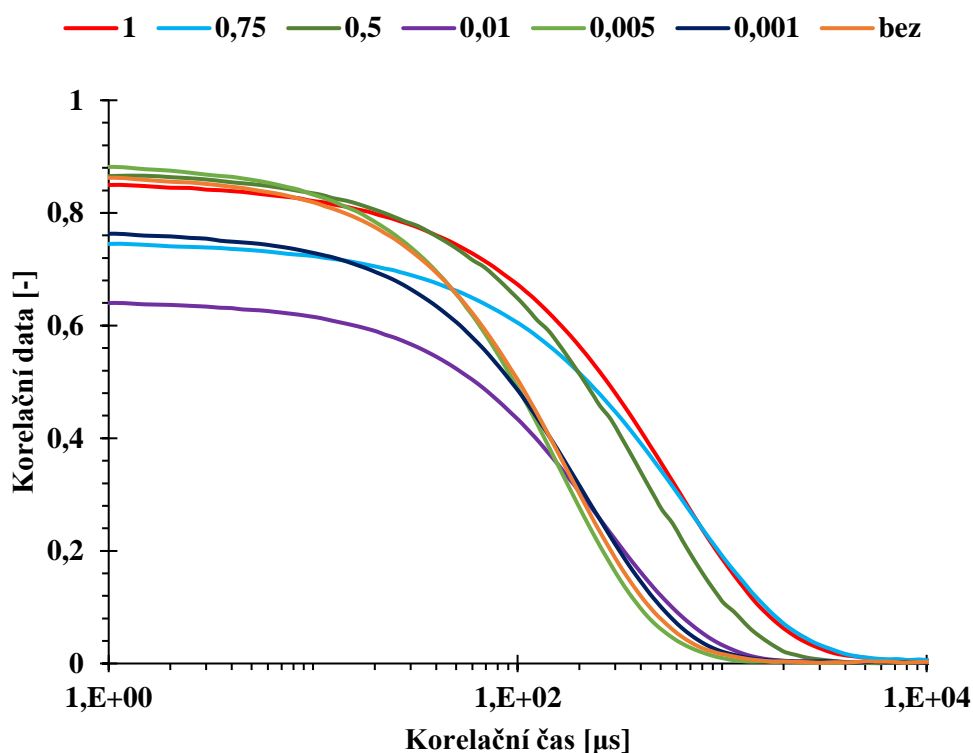
Zároveň však s rostoucí koncentrací hyaluronanu pravděpodobně dochází ke zvyšování viskozity připravených roztoků. Zvyšující se velikost tak nemusí nutně znamenat opravdu se zvětšující částice. Může pouze poukazovat na fakt, že v roztoku s vyšší viskozitou se částice pohybují pomaleji, tím pádem dosahují kratších korelačních časů, což se odrazí na větší velikosti částic. Pro budoucí experimenty se tedy navrhuje proměření viskozity analyzovaných vzorků.

### 6.5.3 Měření koncentrační řady hyaluronanu s fluorescenčně značenými silikátovými částicemi

Pro získání informací o samotném prostředí v přítomnosti hyaluronanu byla provedena studie za využití fluorescenčně značených silikátových částic. Použité částice tak mají částečně simulovat vezikulární částice. Rozdíl je v tom, že oproti kladně nabitým vezikulám neobsahují žádný náboj

a nemohou tak interagovat se záporně nabitým hyaluronanem. Díky těmto vlastnostem tak může dojít k prozkoumání okolního prostředí, ve kterém se nacházejí. Tyto částice se zároveň vyznačují svojí úzkou distribucí velikostí.

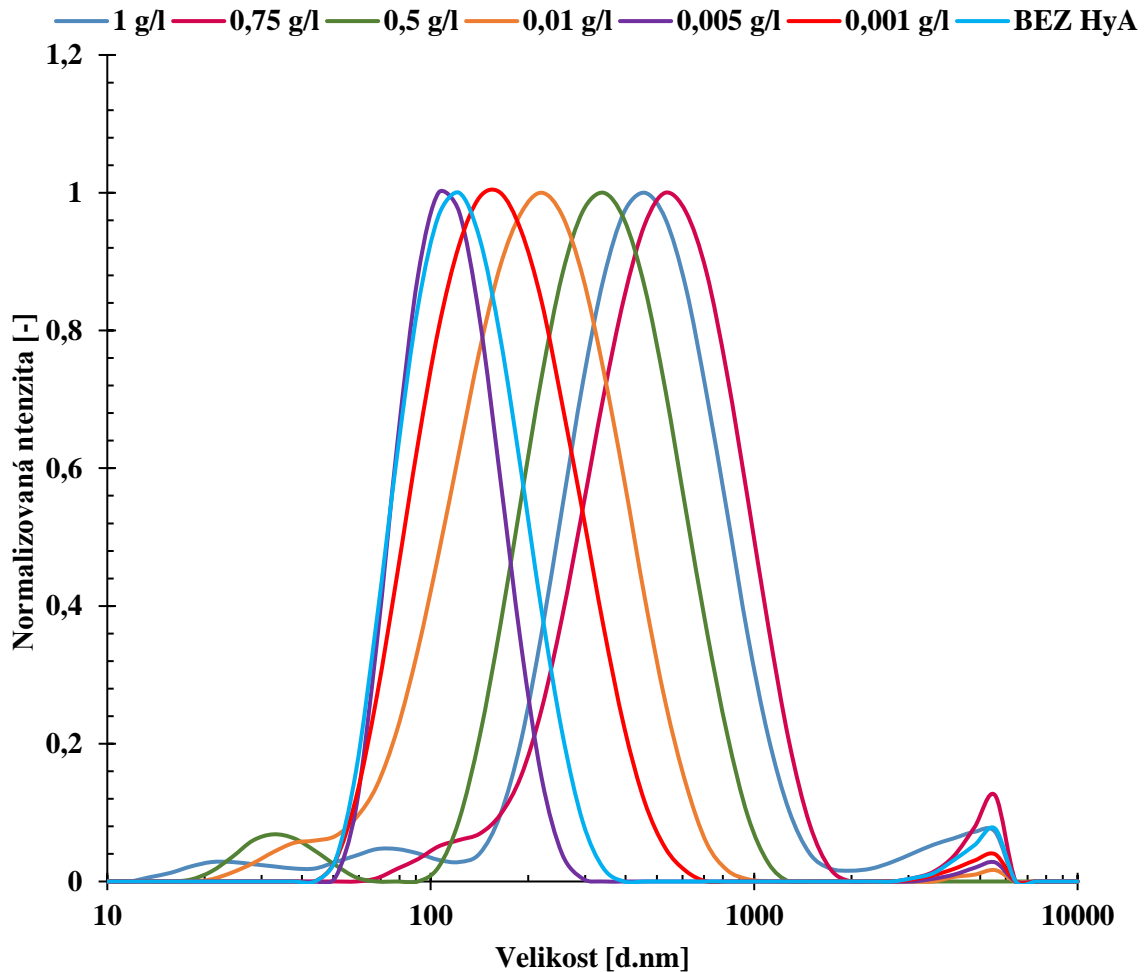
Pomocí měření dynamického rozptylu světla opět nejprve došlo k vytvoření korelačních křivek, které můžeme vidět na Obrázku 53. Z naměřených dat si můžeme všimnout, že korelační data byla nižší než hodnota 1, a to zejména u systému s 0,01 g/l hyaluronanu, kde se pohybovala lehce nad hodnotou 0,6. O něco vyšších hodnot dosahovaly systémy s 0,75 a 0,001 g/l s daty blížíci se hodnotě 0,8. U ostatních systémů se pak pohybovala okolo hodnoty 0,9. Nízká korelační data naznačují nedostatečnou intenzitu vzorku či malý počet částic.



Obrázek 53: Korelační data pro systémy obsahující fluorescenčně značené silikátové kuličky s různou koncentrací hyluronanu.

Dále si můžeme všimnout, že se data rozdělila na dva celky. Vzorky s vyšší koncentrací hyaluronanu, které dosahovaly delších korelačních časů a systémy s nízkou koncentrací hyaluronanu, vykazující naopak nižší korelační časy. Z naměřených dat by se tedy dalo usuzovat, že s delšími korelačními časy se budou v systému vyskytovat částice s většími rozměry než u systémů s kratšími časy, nicméně, jak již bylo zmíněno, využití silikátové částice neobsahují žádný náboj a nemohou tak interagovat se záporně nabitým hyaluronanem. Proto budou naměřená data odkazovat spíše na rostoucí viskozitu roztoků. Se zvyšující se koncentrací hyaluronanu, pravděpodobně dochází ke zvětšování viskozity roztoků, částice se tak pohybují pomaleji a korelační časy jsou delší.

Z korelačních dat byly dále získány distribuční křivky. Závislost normalizované intenzity na velikosti vzniklých silikátových částic s různou koncentrací hyaluronanu pak můžeme vidět na Obrázku 54.

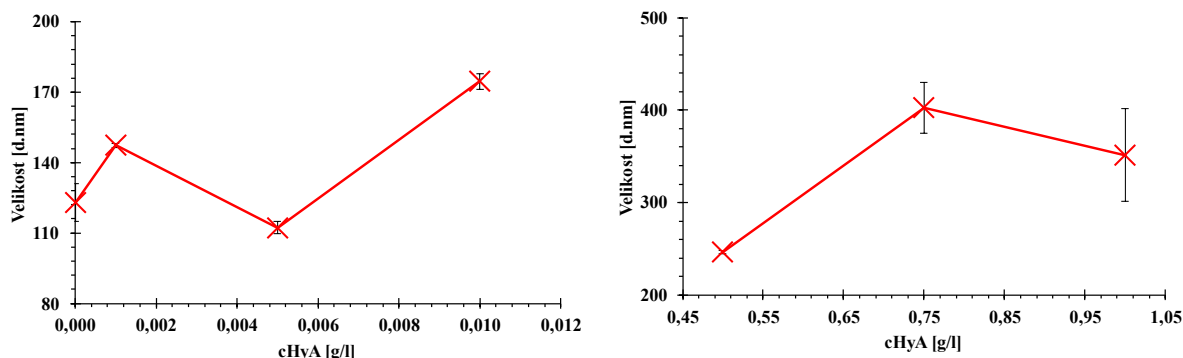


Obrázek 54: Distribuční křivky pro fluorescenčně značené silikátové částice s různou koncentrací hyaluronanu.

Z naměřených dat si můžeme všimnout, že s různou koncentrací hyaluronanu se tvoří píky u různé velikosti, což naznačuje fakt, že se rostoucí koncentrací mění viskozita. Dále je také z grafu patrný vznik druhého píku u menších velikostech, a to téměř u všech koncentrací (s výjimkou systémů s 0,001 g/l a systému bez hyaluronanu). Tyto data naznačují, že po přidání hyaluronanu k systémům obsahujícím silikátové částice, může docházet ke vzniku menších shluků samotného hyaluronanu. Kromě výše zmíněného si také můžeme všimnout úzké distribuce velikosti částic, zejména pak u systémů s nižšími koncentracemi hyaluronanu (do 0,01 g/l).

Získané průměrné velikosti částic byly vyneseny do grafu v závislosti na rostoucí koncentraci hyaluronanu. Jak můžeme vidět na Obrázku 55, s rostoucí koncentrací opravdu dochází k nárůstu průměrné velikosti částic. Nicméně jak již bylo řečeno na začátku této kapitoly, hyaluronan se silikonovými částicemi neinteraguje a rostoucí velikost částic tak poukazuje na zvyšující se viskozitu roztoků. Výjimkou jsou systémy 0,005 a 1 g/l kde došlo k poklesu dat.

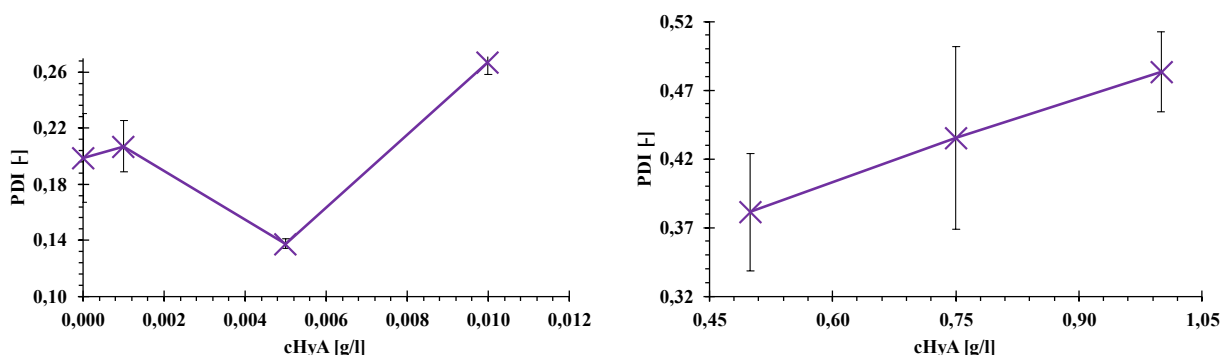




Obrázek 55: Závislost průměrné velikosti fluorescenčně značených silikátových částic na koncentraci hyaluronanu. Vlevo pro koncentrace 0 až 0,1 g/l hyaluronanu. Vpravo pro 0,5 až 1 g/l.

Dále byla zkoumána polydisperzita vzniklých systémů. Kromě sledování šířky distribučních dat byl také hodnocen polydisperzní index pro jednotlivé systémy. Jeho závislost na rostoucí koncentraci hyaluronanu můžeme vidět na Obrázku 56.

Fluorescenčně značené silikonové částice se vyznačují svoji nízkou polydisperzitou. Ta byla při experimentech dokázána naměřením PDI čistých fluorescenčních částic (bez přídavku hyaluronanu), kdy hodnota dosahovala  $0,199 \pm 0,032$ . Po přídavku hyaluronanu na koncentraci 0,001 g/l došlo k nepatrnému nárůstu PDI, a to na  $0,207 \pm 0,018$ . Po dalším přídavku na koncentraci 0,005 g/l došlo k signifikantnímu snížení PDI na hodnotu  $0,138 \pm 0,004$  a po dosažení koncentrace 0,01 g/l PDI vystoupalo na  $0,267 \pm 0,009$ . Všechny naměřené hodnoty se pohybovaly pod 0,3, díky čemuž můžeme tvrdit, že se jednalo o monodisperzní systémy.



Obrázek 56: Závislost polydisperzního indexu na koncentraci hyaluronanu. Vlevo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l hyaluronanu. Vpravo 0,5 až 1 g/l.

U vyšších koncentrací hyaluronanu již můžeme pozorovat signifikantní nárůst hodnot polydisperzního indexu. V levé části obrázku můžeme vidět, že s rostoucí koncentrací hyaluronanu dochází k nárůstu PDI. Všechny naměřená data již přesahovaly hodnotu 0,3. Můžeme tedy říct, že i tyto systémy se již považují za stabilní. Zároveň tak došlo k potvrzení dat získaných měření kataniontových vezikulárních systémů, kdy bylo zjištěno, že s vysokým přídavkem hyaluronanu (0,5 g/l a výš) dochází ke značnému zvýšení polydisperzity systému.

## 6.6 Měření fluorescenční korelační spektroskopie a její porovnání s DLS

Pro porovnání výsledků získaných metodou DLS bylo také provedeno simultánní měření za využití fluorescenční korelační spektroskopie.

### 6.6.1 Měření koncentrační řady hyaluronanu s vezikulárními systémy

Nejprve došlo k ověření vhodnosti použití vybraných sond, kdy došlo k proměření vzorků obsahující cIPA s příslušnou fluorescenční sondou (DiI, DiO, F16 a RBOE) – tj. bez hyaluronanu. Vhodnost byla

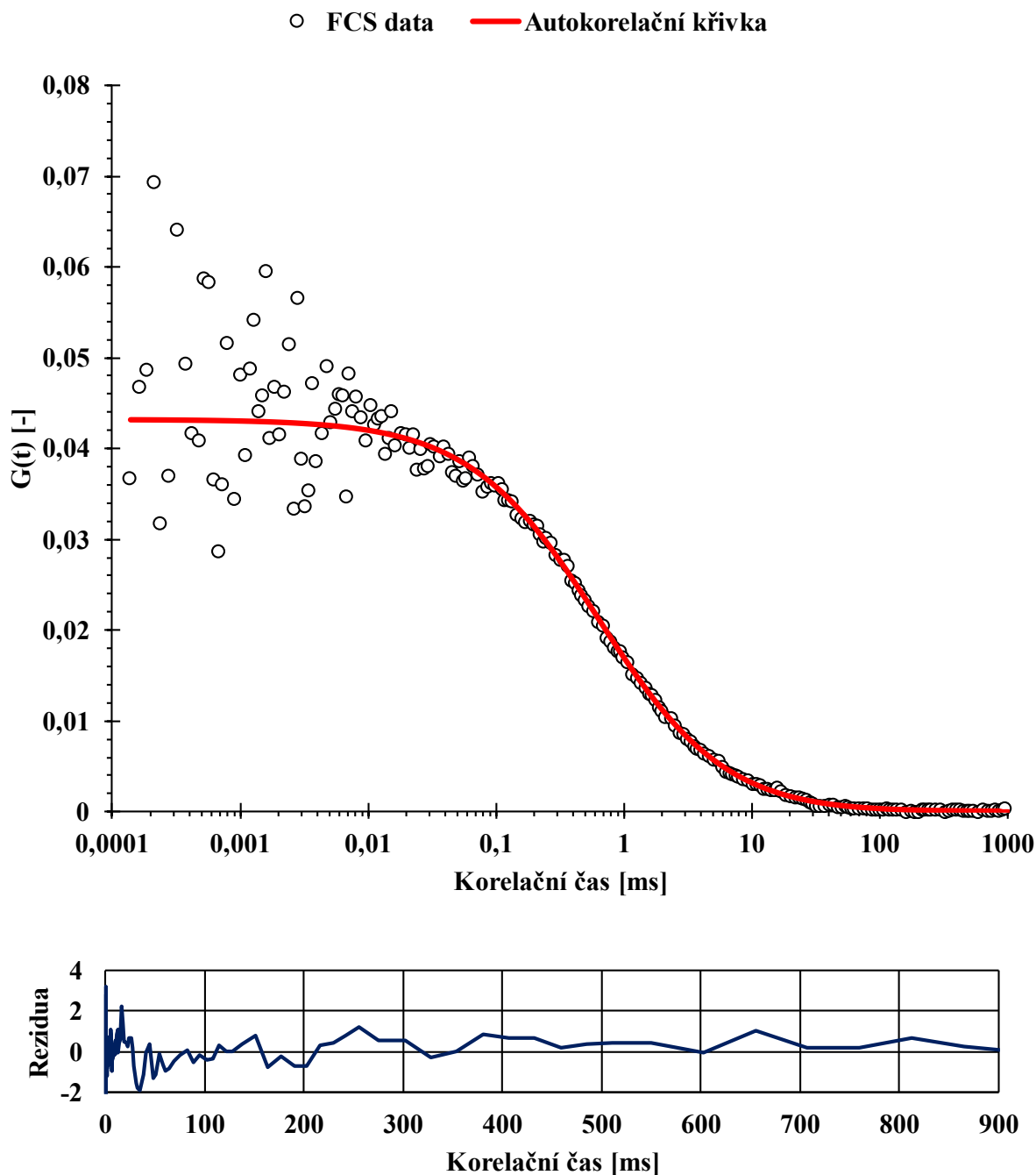
potvrzena u fluorescenčních sond DiI, DiO a F16, naopak sonda RBOE byla vyhodnocena jako nevhodná pro zobrazování vezikulárních systémů. Následující data tak zobrazují výsledky analýzy fluorescenční sondy RBOE, na základě kterých došlo k jejímu vyřazení.

Po provedení analýzy FCS, musela být získaná data proložena vhodným matematickým modelem, kterým byl Triplet Extended 3D (TEx3D), zahrnující tzv. parametr anomality alfa. V Tabulce 16 pak můžeme vidět získané hodnoty z FCS analýzy pro systém obsahující cIPA s fluorescenční sondou RBOE.

Tabulka 16: Hodnoty z FCS měření pro systém obsahující fluorescenční sondu RBOE.

<b>Triple extended 3D</b>		
	<b>Model 1</b>	<b>Model 2</b>
<b>N (počet molekul)</b>	23,00 ± 0,20	21,00 ± 0,14
<b>D<sub>1</sub> [μm<sup>2</sup>/s]</b>	33,00 ± 0,86	38,00 ± 4,80
<b>D<sub>2</sub> [μm<sup>2</sup>/s]</b>	–	4,00 ± 1,90
<b>ρ<sub>1</sub> [-]</b>	0,04318 ± 0,00037	0,0399 ± 0,0026
<b>ρ<sub>2</sub> [-]</b>	–	0,0073 ± 0,0029
<b>α<sub>1</sub></b>	0,86 ± 0,01	1,00 ± 0,00
<b>α<sub>2</sub></b>	–	1,00 ± 0,00
<b>cpm [cnts/s/molekul]</b>	1121,00 ± 9,60	1549,00 ± 10,00

Naměřená data byla nejprve proložena prvním modelem, a to zmíněným triplet extended 3D s jedním difuzním časem a uvolněným parametrem alfa, kdy byla zjištěna hodnota difuzního koeficientu  $33,00 \pm 0,86 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}$ . Získaný difuzní koeficient by následně pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice (2.5) přepočten na hydrodynamický průměr částice, jejíž hodnota činila  $14,86 \pm 0,39 \text{ nm}$ . Naměřené hodnoty tedy neodpovídaly hodnotám získaným analýzou DLS, kdy se velikost částic pohybovala okolo 100 nm. Z tohoto důvodu byl poté vybrán druhý model uvažující dva difuzní časy s pevnou alfou. Jeho výsledky opět můžeme vidět v tabulce. Hodnota prvního difuzního času se velmi podobala hodnotě naměřené s využitím prvního modelu a byla stanovena na  $38,00 \pm 4,80 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , což odpovídá velikosti částice o  $12,91 \pm 1,66$ . Druhý difuzní čas činil  $4,00 \pm 1,90 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}$ . Tato hodnota odpovídá velikosti zhruba  $122,63 \pm 78,00 \text{ nm}$ . Využitím druhého modelu jsme tedy získaly difuzní čas částice o velikosti zhruba 100 nm, proto můžeme říct, že druhý model odpovídal měření lépe. Nicméně po bližším přezkoumání bylo zjištěno, že nejenom že frakce s velikostí  $122,63 \pm 78,00 \text{ nm}$  částic dosahuje opravdu vysoké odchylky, ale zároveň tato frakce odpovídá pouze zhruba 7 %, zatímco druhá frakce s velikostí  $12,91 \pm 1,66$  odpovídá 40 %. Na Obrázku 57 pak můžeme vidět autokorelační křivku analyzovaného systému cIPA se 43 mol. % cholesterolu a fluorescenční sondou RBOE.



Obrázek 57: FCS analýza systému cIPA se 43 mol.% cholesterolu a fluorescenční sondou RBOE.

U fluorescenční sondy RBOE tedy nebyla pomocí metody FCS ověřena vhodnost jejího použití pro barvení vezikulárních systémů. Z následujících měření byla tedy vyřazena na základě zjištění, že jsou pravděpodobně viditelné pouze molekuly samotného barviva (odpovídající naměřené velikosti 14,86 nm). Dalším důvodem bylo také to, že byl detekovaný pouze malý signál ( $1121,00 \pm 9,60$  cpm).

Následně bylo u vzorků obsahující systémy cIPA se 43 mol. % cholesterolu s koncentrací sondy  $10^{-6}$  M byly proměřeny koncentrační řady hyaluronanu pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Koncentrace hyaluronanu byly, stejně jako u měření DLS, použity 1; 0,75; 0,5; 0,01; 0,005; 0,001 g/l a bez hyaluronanu. Jako fluorescenční sondy byly vybrány pouze 3, a to DiI, DiO a F16. Fluorescenční sonda RBOE byla pro experimenty vyřazena na základě výsledků z důvodu jejího neoptimálního chování při barvení připravených systémů.

### 6.6.1.1 Využití fluorescenční sondy DiI

Nejprve byly proměřeny systémy cIPA s fluorescenční sondou DiI a různou koncentrací hyaluronanu při teplotě 25 °C. Naměřená data byla proložena nejjednodušším matematickým modelem pure diffusion (prostá difuze) s jedním difuzním časem, díky čemuž došlo k získání informace o velikosti detekčního objemu, který činil 0,781 fl, dále o počtu částic (N) a o difuzním koeficientu (D). Z difuzního koeficientu byl následně vypočten hydrodynamický průměr ( $d_H$ ) pomocí rovnice ((2.5)), který byl porovnán s průměrnou velikostí částic získanou z DLS analýzy. Z Tabulky 17 si můžeme všimnout, že nejlépe se shodovala data u vzorku obsahujícího 0,01 g/l hyaluronanu. Tento vzorek zároveň vykazoval nejnižší hodnotu PDI a jediný byl prohlášen za monodisperzní. Dále si můžeme všimnout, že vzorky s nižší koncentrací hyaluronanu korelovaly mnohem lépe než ty s vyšší koncentrací, kde byly hodnoty průměrné velikosti naměřeny pomocí DLS více než 2x větší oproti hodnotám naměřeným pomocí FCS.

Tabulka 17: Data získaná proložením matematického modelu pure diffusion.

c HyA [g/l]	Pure diffusion			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	0,317 $\pm$ 0,001	4,19 $\pm$ 0,08	117,07 $\pm$ 2,24	95,81 $\pm$ 0,72	0,369 $\pm$ 0,021
0,001	1,260 $\pm$ 0,004	4,23 $\pm$ 0,08	115,96 $\pm$ 2,17	96,74 $\pm$ 2,06	0,340 $\pm$ 0,004
0,005	2,410 $\pm$ 0,002	4,50 $\pm$ 0,08	109,00 $\pm$ 1,94	169,67 $\pm$ 3,65	0,306 $\pm$ 0,039
0,010	5,220 $\pm$ 0,019	5,80 $\pm$ 0,18	84,57 $\pm$ 2,63	86,71 $\pm$ 1,37	0,216 $\pm$ 0,015
0,500	13,200 $\pm$ 0,020	5,05 $\pm$ 0,10	97,13 $\pm$ 1,92	201,60 $\pm$ 2,51	0,427 $\pm$ 0,007
0,750	6,450 $\pm$ 0,010	3,26 $\pm$ 0,03	150,46 $\pm$ 1,48	353,57 $\pm$ 11,91	0,488 $\pm$ 0,015
1,000	5,170 $\pm$ 0,006	1,97 $\pm$ 0,02	248,99 $\pm$ 2,91	438,70 $\pm$ 31,40	0,499 $\pm$ 0,054

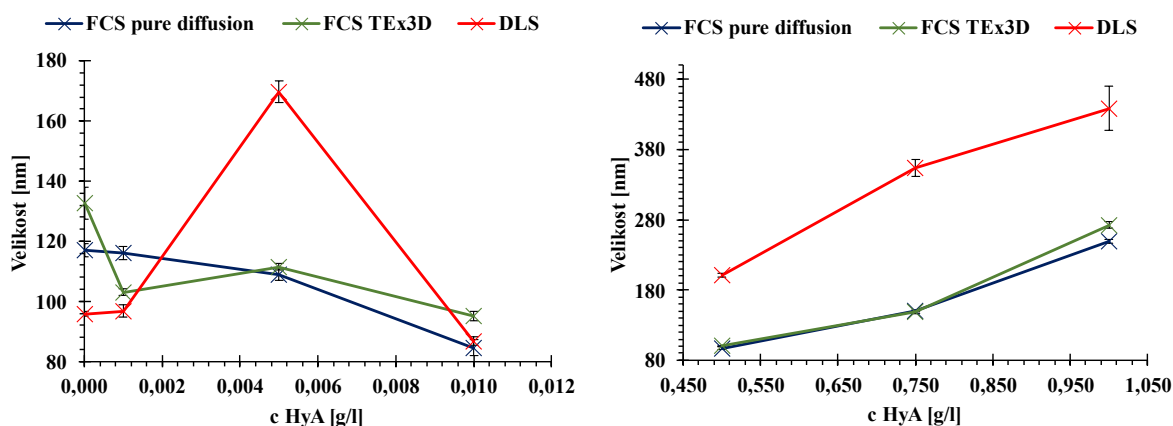
Díky nízké korelaci dat mezi DLS a FCS s využitím prosté difuze byla data proložena sofistikovanějším modelem, a to Triplet Extended 3D (TE<sub>x</sub>3D), který využívá již výše zmíněný parametrem alfa. Opět zde bylo počítáno pouze s jedním difuzním časem a zároveň došlo k uvolnění parametru alfa. Ze získaných difuzních koeficientů pro jednotlivé systémy byl opět vypočten hydrodynamický průměr a následně porovnán s hodnotou naměřenou pomocí DLS. Vše můžeme vidět v Tabulce 18.

Tabulka 18: Data získaná proložením matematického modelu triplet extended 3D.

c HyA [g/l]	TE <sub>x</sub> 3D			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	0,309 $\pm$ 0,002	3,70 $\pm$ 0,15	132,57 $\pm$ 5,38	95,81 $\pm$ 0,72	0,369 $\pm$ 0,021
0,001	1,226 $\pm$ 0,005	4,76 $\pm$ 0,05	103,05 $\pm$ 1,00	96,74 $\pm$ 2,06	0,340 $\pm$ 0,004
0,005	2,395 $\pm$ 0,004	4,40 $\pm$ 0,04	111,48 $\pm$ 1,01	169,67 $\pm$ 3,65	0,306 $\pm$ 0,039
0,010	5,040 $\pm$ 0,012	5,16 $\pm$ 0,08	95,06 $\pm$ 1,49	86,71 $\pm$ 1,37	0,216 $\pm$ 0,015
0,500	13,000 $\pm$ 0,042	4,90 $\pm$ 0,02	100,10 $\pm$ 0,47	201,60 $\pm$ 2,51	0,427 $\pm$ 0,007
0,750	6,410 $\pm$ 0,043	3,30 $\pm$ 0,05	148,64 $\pm$ 2,25	353,57 $\pm$ 11,91	0,488 $\pm$ 0,015
1,000	5,100 $\pm$ 0,030	1,80 $\pm$ 0,03	272,50 $\pm$ 4,54	438,70 $\pm$ 31,40	0,499 $\pm$ 0,054

Z Tabulky 18 je patrné že, s rostoucí koncentrací hyaluronanu dochází k nárůstu počtu částic N. Obzvláště viditelný nárůst můžeme pozorovat u systému s 0,5 g/l. Po dalším přidavku hyaluronanu se ale počet částic sníží a s dalším přidavkem zmenšování počtu částic stále pokračuje. To může značit precipitaci a tvorbu agregátů v přítomnosti vyšší koncentrace hyaluronanu.

Na Obrázku 58 můžeme vidět znázornění závislosti průměrné velikosti částic získané měřením metodou DLS a FCS s proložením modelu pure diffusion a TEx3D. Můžeme si všimnout, že oba využití modely FCS se svými výsledky značně liší od hodnot získaných z DLS, zejména pak při vyšších koncentracích hyaluronanu. Všimněme si, že systém obsahující 0,001 g/l nejlépe odpovídá model TEx3D, zatímco pro 0,010 g/l je vhodnější využít model pure diffusion. Pro ostatní systémy pak neodpovídá ani jeden z modelů. Toto zjištění naznačuje, že na analyzované systémy nelze obecně uplatnit ani jeden z použitých modelů.



Obrázek 58: Závislost průměrné velikosti částic pro systémy s různou koncentrací hyaluronanu pro měření FCS (pure diffusion), FCS (TEx3D) a DLS. Vlevo pro koncentraci hyaluronanu 0 až 0,010 g/l, vpavo pro 0,5 až 1 g/l.

V Tabulce 19 jsou pak zobrazeny naměřené hodnoty parametru alfa. Můžeme si všimnout, že se u všech systémů objevily vysoké hodnoty přesahující 0,9. Toto zjištění poukazuje na nízkou anomalitu systému a homogenní distribuci sondy. Na druhou stranu hodnoty PDI dosahují poměrně vysokých hodnot. Analyzované systémy byly tedy polydisperzní (kromě vzorku s koncentrací hyaluronanu 0,010 g/l), zejména pak u vyšších koncentrací hyaluronanu. Díky těmto datům tedy můžeme usuzovat, že nekorelující výsledky FCS analýzy s výsledky získanými pomocí DLS, byly pravděpodobně způsobeny vysokou polydisperzitou systémů, která ovlivňuje samotnou FCS analýzu.

Tabulka 19: Naměřené hodnoty parametru alfa pro systém s fluorescenční sondou DiI.

c HyA [g/l]	$\alpha$ [-]
0,000	0,910 ± 0,020
0,001	0,906 ± 0,011
0,005	0,920 ± 0,004
0,010	0,851 ± 0,010
0,500	0,904 ± 0,006
0,750	0,977 ± 0,013
1,000	0,904 ± 0,007

Pro získání bližších informací o analyzovaném systému byla následně provedena FLCS (z angl. *Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy*) analýza, sloužící k odseparování příspěvků různých intenzit s různou dobou života, a tedy k oddělení různých populací fluoroforu. Analýzou byly zjištěny

dvě doby života fluorescence – jedna s delším časem, zhruba 1,5 ns, a druhá, s kratším časem, zhruba 0,5 ns (výsledky jednotlivých měření najdeme v Příloze v kapitole 10.2). Kratší doba života pak odpovídá době života samotného barviva, zatímco delší doba života s největší pravděpodobností poukazuje na vznik J-agregátu sondy DiI.

### 6.6.1.2 Využití fluorescenční sondy DiO

Jako další byla využita fluorescenční sonda DiO. Systémy cIPA s přidavkem sondy a s danou koncentrací hyaluronanu byly proměřeny pomocí FCS při teplotě 25 °C. Naměřená data byla následně proložena autokorelační funkcí. I zde došlo nejprve k využití jednoduchého matematického modelu pure diffusion s jedním difuzním časem. Jednotlivé hodnoty počtu částic, difuzního koeficientu a k němu příslušnou velikost částic nalezneme v Tabulce 20. Hodnota detekčního objemu činila 0,791 fl.

Tabulka 20: Hodnoty z FCS analýzy za využití matematického modelu pure diffusion.

c HyA [g/l]	Pure diffusion			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	1,80 ± 0,02	14,00 ± 0,55	35,04 ± 1,38	96,93 ± 1,70	0,351 ± 0,023
0,001	11,00 ± 0,15	14,00 ± 0,44	35,04 ± 1,10	83,39 ± 4,47	0,261 ± 0,019
0,005	ND	ND	ND	89,29 ± 0,42	0,216 ± 0,015
0,010	30,00 ± 0,15	5,50 ± 0,10	89,18 ± 1,62	96,16 ± 0,86	0,240 ± 0,007
0,500	19,30 ± 0,08	5,10 ± 0,12	96,18 ± 2,26	299,80 ± 2,00	0,498 ± 0,010
0,750	24,00 ± 0,08	2,28 ± 0,08	215,13 ± 7,28	340,47 ± 3,05	0,541 ± 0,014
1,000	28,00 ± 0,10	2,26 ± 0,05	227,09 ± 4,42	346,87 ± 0,61	0,438 ± 0,031

U vzorků obsahující 0,005 g/l hyaluronanu nebylo možné získat analýzou FCS žádná data. Dále si můžeme všimnout, že počet částic s rostoucí koncentrací hyaluronanu nejprve narůstá, následně dochází ke zlomu, kdy se počet částic sníží zhruba na polovinu a poté se opět zvyšuje. Toto zjištění tedy naznačuje že u koncentrace 0,5 g/l hyaluronanu může docházet k precipitaci, což se projeví na sníženém počtu částic.

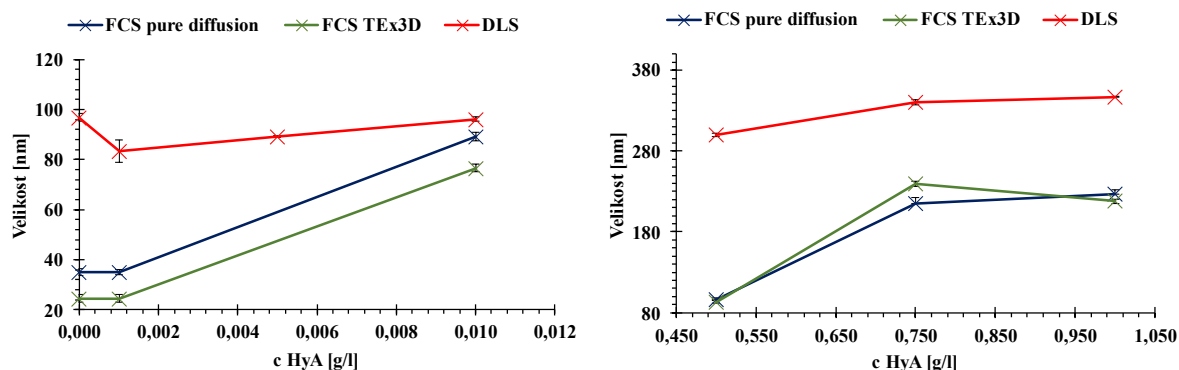
Pokud se dále podíváme na hodnoty Z-Average získaných pomocí DLS analýzy a na hydrodynamické průměry částic, získané výpočtem z difuzních koeficientů z FCS analýzy, zjistíme, že data téměř nekorelují. Nejvíce se svými hodnotami blížil vzorek obsahující 0,010 g/l. Velikost systémů obsahující vyšší koncentrace hyaluronanu (0,5 g/l a výš) opět dosahovala mnohem vyšších hodnot z DLS v porovnání s velikostí z FCS analýzy.

Právě díky malé korelaci dat, byl využit druhý způsob proložení, a to pomocí modelu TEx3D s jedním difuzním koeficientem a uvolněným parametrem alfa. V Tabulce 21 pak můžeme vidět výsledky FCS měření s tímto modelem. I zde si můžeme všimnout stejného trendu s narůstajícím počtem částic. Ze získaných difuzních koeficientů byly vypočteny hydrodynamické průměry a následně porovnány s hodnotami Z-Average z DLS analýzy. Můžeme si ale všimnout, že získané hydrodynamické průměry se moc neliší od hodnot získaných při proložení modelu pure diffusion.

Tabulka 21: FCS analýza pomocí TEx3D.

c HyA [g/l]	TEx3D			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	1,49 ± 0,03	20 ± 1,3	24,53 ± 1,60	96,93 ± 1,70	0,351 ± 0,023
0,001	10,00 ± 0,24	20 ± 1,3	24,53 ± 1,60	83,39 ± 4,47	0,261 ± 0,019
0,005	ND	ND	ND	89,29 ± 0,42	0,216 ± 0,015
0,010	27,00 ± 0,26	6,4 ± 0,12	76,64 ± 1,44	96,16 ± 0,86	0,240 ± 0,007
0,500	19,00 ± 0,13	5,28 ± 0,09	92,90 ± 1,58	299,80 ± 2,00	0,498 ± 0,010
0,750	22,00 ± 0,16	2,05 ± 0,029	239,27 ± 3,39	340,47 ± 3,05	0,541 ± 0,014
1,000	26,00 ± 0,24	2,25 ± 0,026	218,00 ± 2,52	346,87 ± 0,61	0,438 ± 0,031

Na Obrázku 59 je pak znázorněna závislost velikosti analyzovaných částic na koncentraci hyaluronanu pro DLS i FCS. Ze závislosti je patné, že velikost částic naměřená metodou DLS je značně větší pro všechny analyzované systémy než velikost získaná metodou FCS. Ze získaných dat tedy lze říct, že pro studium těchto systémů pravděpodobně nelze použít žádný z modelů analýzy FCS.



Obrázek 59: Závislost velikosti částic na koncentraci hyaluronanu získané analýzou DLS a FCS s fluorescenční sondou DiI. Vlevo pro koncentrace 0 až 0,01 g/l, vpravo 0,5 až 1 g/l.

V Tabulce 22 dále můžeme vidět získané parametry alfa. Můžeme si všimnout, že v porovnání se systémy obsahujícími fluorescenční sondu DiI došlo ke značnému poklesu hodnot, zejména pak u systémů s vyšší koncentrací hyaluronanu. Z těchto dat lze tedy usuzovat, že přidávkem hyaluronanu dochází k brzdění pohybu vezikul, které tak vykazují anomální difuzi. Systém obsahující sondu DiO, je tak na rozdíl od systému s DiI značně anomální.

Tabulka 22: Naměřené hodnoty alfa pro systémy s fluorescenční sondou DiO

c HyA [g/l]	$\alpha$ [-]
0,000	0,604 ± 0,020
0,001	0,801 ± 0,010
0,005	ND
0,010	0,804 ± 0,010
0,500	0,817 ± 0,020
0,750	0,770 ± 0,012
1,000	0,782 ± 0,013

Výše uvedená zjištění tedy naznačují, že v tomto případě má na autokorelační funkci vliv nejen polydispersita, ale také anomální difuze.

### 6.6.1.3 Využití fluorescenční sondy F16

Jako poslední proběhlo měření cIPA s využitím fluorescenční sondy F16 při teplotě 23,7 °C. I zde byla měřena koncentrační řada hyaluronanu. Po provedení analýzy byla získaná FCS data proložena modelem pure diffusion s jedním difuzním koeficientem. Hodnota efektivního objemu činila 0,781 fl. Další parametry pak můžeme vidět v následující tabulce (Tabulka 23). Zde si můžeme všimnout, že počet částic s rostoucí koncentrací hyaluronanu klesal. Toto zjištění mohlo být způsobeno zvyšující se precipitací s přidavkem hyaluronanu, kdy částice agregovaly a snižoval se tak jejich počet.

Dále byly z naměřených difuzních koeficientů vypočteny průměrné velikosti částic a porovnány s výsledky z DLS analýzy. Z naměřených hodnot můžeme vidět, že opět nedošlo ke korelaci dat získaných dvěma metodami.

Tabulka 23: Hodnoty získané z FCS analýzy po proložení modelem pure diffusion.

c HyA [g/l]	Pure diffusion			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	42,00 ± 0,40	8,20 ± 0,21	57,80 ± 1,48	88,6 ± 0,2	0,290 ± 0,023
0,001	32,00 ± 0,30	4,40 ± 0,15	107,72 ± 3,68	86,4 ± 0,6	0,245 ± 0,010
0,005	24,00 ± 0,16	5,60 ± 0,25	84,64 ± 3,79	72,1 ± 0,5	0,215 ± 0,014
0,010	19,00 ± 0,11	5,20 ± 0,12	91,15 ± 2,10	82,4 ± 0,5	0,189 ± 0,008
0,500	14,70 ± 0,09	1,92 ± 0,09	246,86 ± 11,08	272,8 ± 19,7	0,784 ± 0,166
0,750	12,50 ± 0,08	3,10 ± 0,17	152,90 ± 8,41	180,9 ± 5,8	0,359 ± 0,023
1,000	17,80 ± 0,09	3,11 ± 0,08	152,40 ± 4,07	232,4 ± 1,3	0,393 ± 0,028

FCS data byla tedy dále proložena modelem TEx3D s jedním difuzním koeficientem a uvolněným parametrem alfa, jehož výsledky můžeme vidět v Tabulce 24. I zde si můžeme všimnout klesajícího počtu částic s rostoucí koncentrací hyaluronanu, naznačující precipitaci. Po získání hydrodynamických průměrů bylo zjištěno, že ani v tomto případě data příliš nekorelují s výsledky DLS analýzy.

Tabulka 24: Hodnoty získané FCS analýzou pomocí modelu TEx3D obsahující fluorescenční sondu F16.

c HyA [g/l]	TEx3D			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	39,00 ± 0,50	9,9 ± 0,12	47,88 ± 0,58	88,56 ± 0,16	0,290 ± 0,023
0,001	27,00 ± 0,56	4,8 ± 0,14	98,75 ± 2,88	86,39 ± 0,64	0,245 ± 0,010
0,005	21,00 ± 0,17	6,8 ± 0,11	69,7 ± 1,13	72,06 ± 0,47	0,215 ± 0,014
0,010	18,00 ± 0,11	6,2 ± 0,07	76,45 ± 0,86	82,36 ± 0,52	0,189 ± 0,008
0,500	14,00 ± 0,25	1,97 ± 0,09	240,6 ± 11,02	272,75 ± 19,66	0,784 ± 0,166
0,750	12,00 ± 0,23	2,65 ± 0,062	178,86 ± 4,19	180,90 ± 5,82	0,359 ± 0,023
1,000	17,00 ± 0,21	2,97 ± 0,079	159,59 ± 4,25	232,37 ± 1,30	0,393 ± 0,028



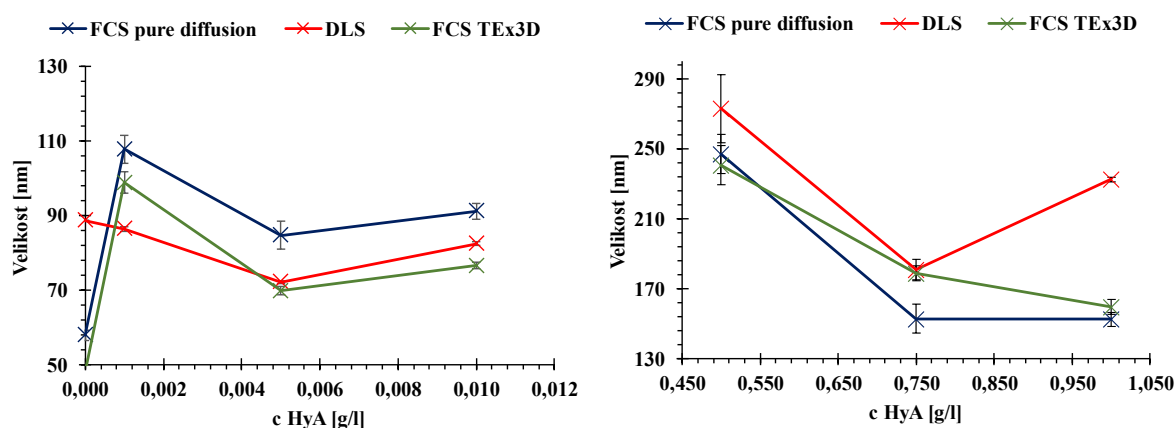
Dále v Tabulce 25 jsou pak zobrazeny naměřené hodnoty alfa parametru.

Tabulka 25: Získané hodnoty alfa parametru pro systém obsahující fluorescenční sondu F16.

c HyA [g/l]	$\alpha$ [-]
0,000	$0,850 \pm 0,020$
0,001	$0,690 \pm 0,024$
0,005	$0,719 \pm 0,013$
0,010	$0,853 \pm 0,016$
0,500	$0,672 \pm 0,021$
0,750	$0,670 \pm 0,023$
1,000	$0,743 \pm 0,025$

Můžeme si všimnout, že na začátku vykazoval systém poměrně nízkou anomalitu s hodnotou  $0,850 \pm 0,020$ . Po prvním přidavku hyaluronanu došlo k rapidnímu poklesu alfa na hodnotu  $0,690 \pm 0,024$ , a tedy ke značnému zvýšení anomalie. Toto zjištění může odkazovat na fakt, že po přidání hyaluronanu je pohyb jednotlivých molekul brzděn jeho přítomností a jejich difuze se tak stává anomální. Při dalším zvýšení koncentrace opět postupně dochází ke zvyšování parametru alfa a systém se tak vrací zpátky do výchozího stavu. Po přidání 0,5 g/l dochází ke zlomu, kdy se hodnota anomalie sníží a s dalším přidavkem hyaluronanu opět dochází k rostoucí homogenizaci systému. Díky těmto poznatkům tak můžeme říct, že se systém rozděluje do dvou oblastí – s nízkou koncentrací hyaluronanu a s vysokou koncentrací hyaluronanu. Mezi nimi se pak nachází oblast precipitace, přičemž s rostoucí koncentrací hyaluronanu v obou oblastech to vypadá, že má systém tendenci se opětovně homogenizovat.

Na Obrázku 60 je pak znázorněna závislost velikost částic na rostoucí koncentraci hyaluronanu. Na grafu tak můžeme vidět rozměry získané metodou DLS a FCS s proložení pomocí dvou modelů. Můžeme si všimnout, že naměřená data z FCS se sice blíží těm z DLS, zejména pak při použití modelu TEx3D, nicméně se nedá říct, že by některý z modelů na data pasoval.



Obrázek 60: Závislost velikosti částic na koncentraci hyaluronanu získané metodami DLS a FCS pro systémy obsahující sondu F16.

Po provedení FCS analýzy také došlo k prozkoumání FLCS. Pomocí FLCS byly zjištěny dvě doby života fluoroforu. Jeden delší, okolo 4 ns, a jeden kratší, okolo 1 ns. Kratší doba života pak naznačuje samozhášení sondy F16, u které dochází k tzv. homoFRETu, kdy dochází k přenosu energie z jedné molekuly fluoroforu (donoru) na druhou (akceptoru). Díky tomu tak dojde k excitaci molekuly

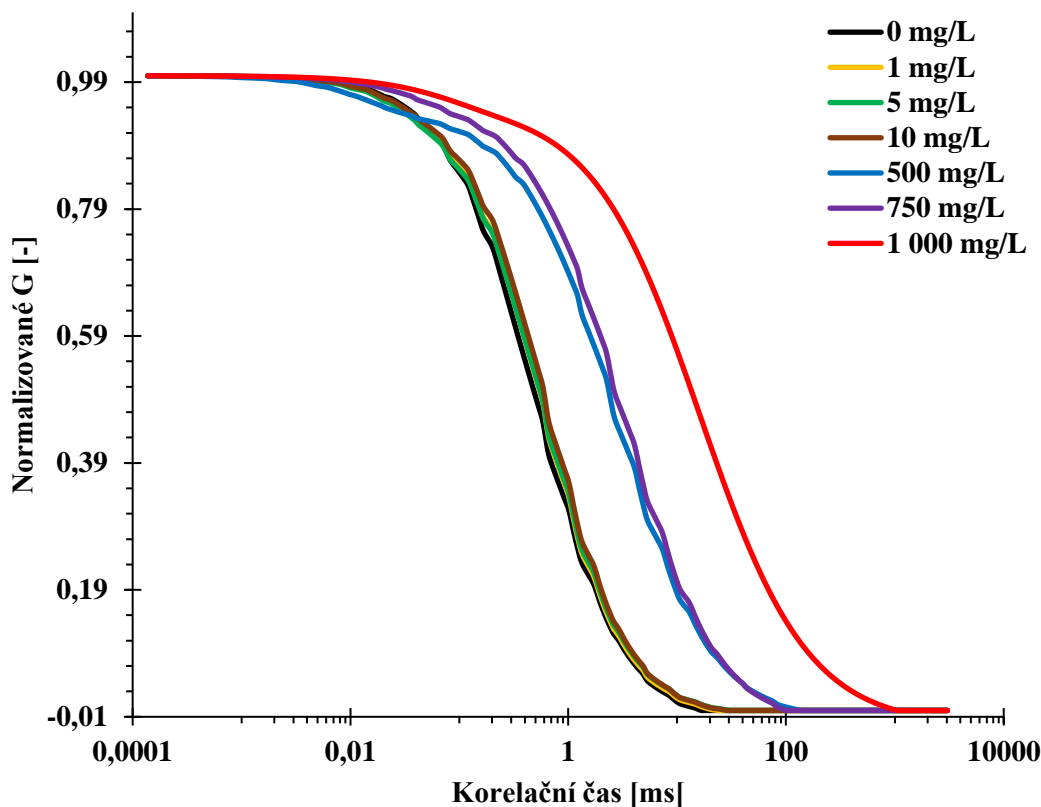
akceptoru. Ta pak přijatou energii vyzáří, a jelikož se jedná o nezářivý přechod energie, doba fluorescence fluoroforu se tak zkrátí.

Ze všech výše provedených experimentů se systémy cIPA a třemi různými fluorescenčními sondami můžeme shrnout několik poznatků. Analýza pomocí FCS závisí na mnoho parametrech, které následně ovlivní samotnou autokorelační funkci. Jedná se zejména o anomalitu systému. Přídavkem hyaluronanu k analyzovaným vzorkům se zvyšuje viskozita systému. Přibývajícím řetězcům hyaluronanu tak budou brzdit přítomné vezikuly v jejich pohybu, čímž dojde ke vzniku anomální difuze. Kromě toho bude také záporně nabitý hyaluronan interagovat s opačně nabitými vezikulami, čímž se budou vytvářet částice o větší velikosti. Některé vezikuly mohou s hyaluronanem interagovat více než jiné. Můžou tedy vznikat částice o různé velikosti, čímž bude docházet ke vzniku nehomogenní distribuce velikosti částic. Druhým parametrem ovlivňující autokorelační funkci je tedy samotné PDI. Posledním faktorem je přídavek fluorescenční sondy. Přídavkem sondy k analyzovaným systémům pravděpodobně dochází k jejímu nehomogennímu rozdělení do přítomných vezikul. Některé vezikuly tedy mohou obsahovat více molekul barviva než jiné, některé nemusí obsahovat barvivo žádné. Čím více bude na vezikulu přítomných molekul barviva, tím větší bude částice, a tím intenzivněji bude také svítit. Ze znalosti rovnice autokorelační funkce pak víme, že samotný molekulární jas ji ovlivňuje s druhou mocninou. Jestliže tedy máme systém s nehomogenní distribucí částic, větší částice budou intenzivněji svítit, čímž zastíní částice malé. K nekorelujícím výsledkům mezi dvěma použitými metodami (DLS a FCS) tak může docházet zejména neoptimalizací těchto parametrů, ovlivňujících hodnotu autokorelační funkce.

### **6.6.2 Měření koncentrační řady hyaluronanu se silikátovými částicemi**

Další měření bylo provedeno za využití fluorescenčně značených silikátových částic, u kterých by měla být distribuce velikosti homogenní. I zde bylo využito celkem 6 koncentrací hyaluronanu, spolu se vzorkem neobsahujícím hyaluronan. Analýza probíhala při teplotě 25 °C. Po provedení FCS analýzy byly data pro vzorek neobsahující hyaluronan proloženy autokorelační křivkou s modelem TEx3D s jedním difuzním časem a uvolněným parametrem alfa. Vzorkům obsahujícím hyaluronan nejlépe odpovídal model TEx3D s jedním difuzním časem, jedním tripletovým stavem a uvolněným parametrem alfa.

Na Obrázku 61 pak můžeme vidět autokorelační křivky pro jednotlivé systémy, kde s rostoucí koncentrací hyaluronanu docházelo k posunu dat k delším korelačním časům.



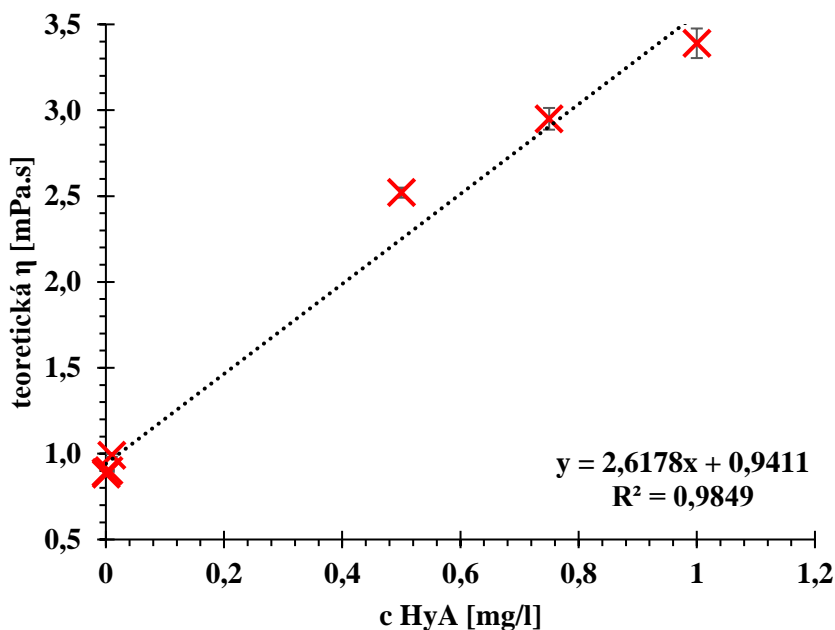
Obrázek 61: Korelační křivky pro systémy obsahující fluorescenčně značené silikátové částice pro různé koncentrace hyaluronanu.

V Tabulce 26 můžeme vidět naměřený počet částic, který se s rostoucí koncentrací hyaluronanu nijak zásadně neměnil, pouze u vyšších koncentrací mohou být pozorovány lehce zvýšené hodnoty. Naopak hodnoty difuzního koeficientu klesaly, což se také projevilo na rostoucích hodnotách hydrodynamického poloměru částic. Nicméně jelikož silikátové částice, na rozdíl od kataniontových vezikulárních systémů, neobsahují náboj, nemůže zde docházet k interakci mezi nimi a záporně nabitým hyaluronanem, čímž nemůže docházet k tvorbě částic o větších rozměrech. Snižující se difuzní koeficient pak nejspíše neodkazuje na zvyšující se velikost částic, ale na zvyšující se viskozitu s rostoucí koncentrací hyaluronanu. Velikost částic naopak zůstává stejná.

Tabulka 26: Hodnoty počtu částic, difuzních koeficientů a z nich vypočtené hodnoty hydrodynamického průměru pro systém obsahující fluorescenční značené silikátové částice spolu s DLS daty.

c HyA [mg/l]	TEx3D			DLS	
	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$d_H$ [nm]	Z-Average [nm]	PDI [-]
0,000	0,335 ± 0,002	4,64 ± 0,06	105,71 ± 1,28	122,90 ± 8,10	0,199 ± 0,032
0,001	0,411 ± 0,001	4,70 ± 0,03	104,36 ± 0,67	147,27 ± 0,91	0,207 ± 0,018
0,005	0,349 ± 0,001	4,57 ± 0,03	107,33 ± 0,68	112,20 ± 2,60	0,138 ± 0,004
0,010	0,446 ± 0,001	4,16 ± 0,04	117,91 ± 1,02	174,60 ± 3,26	0,267 ± 0,009
0,500	0,472 ± 0,002	1,64 ± 0,02	299,09 ± 3,47	246,27 ± 1,46	0,381 ± 0,043
0,750	0,482 ± 0,002	1,40 ± 0,03	350,36 ± 7,51	402,45 ± 27,37	0,435 ± 0,066
1,000	0,520 ± 0,004	1,22 ± 0,03	402,05 ± 10,22	351,50 ± 49,92	0,484 ± 0,029

Rostoucí viskozita pak byla vypočtena dosazením získaných hodnot difuzního koeficientu do Stokes-Einsteinovy rovnice (2.5). Měření probíhalo při teplotě 25 °C a jako poloměr částic byla dosazena hodnota 105,71 nm, což je naměřená velikost silikátových částic bez přítomnosti hyaluronanu. Následně byla vytvořena závislost vypočtené dynamické viskozity systémů na rostoucí koncentraci hyaluronanu. Z Obrázku 62 je patrné, že s přidávkem malých koncentrací hyaluronanu zůstávala viskozita stejná. Zlom nastal s přidávkem 0,5 g/l hyaluronanu, kdy se viskozita zvýšila více než dvojnásobně. S dalšími přidávkami hyaluronanu lineárně rostla.



Obrázek 62: Závislost teoretické dynamické viskozity na rostoucí koncentraci hyaluronanu.

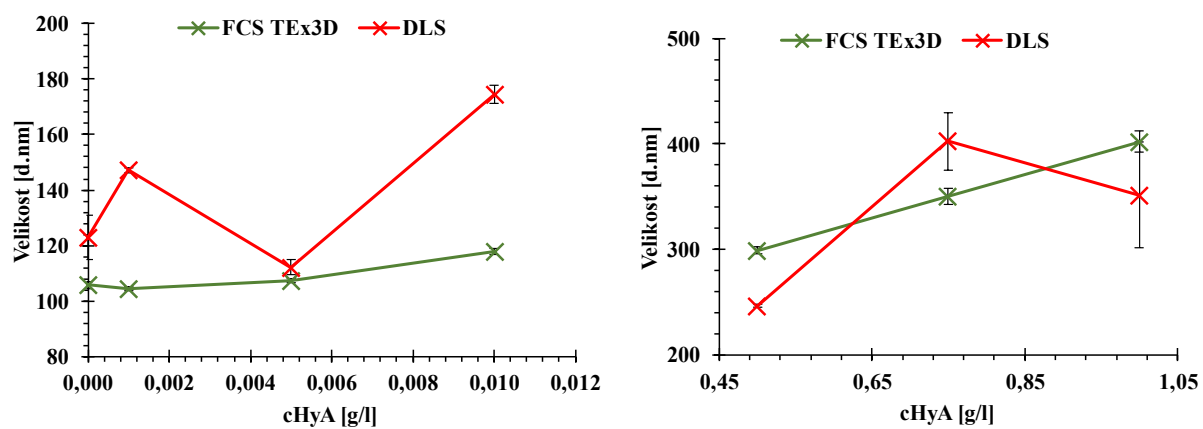
V Tabulce 27 jsou zobrazeny hodnoty parametru alfa a tripletu. Můžeme si všimnout, že parametr alfa dosahoval u všech systémů poměrně vysokých hodnot. Z těchto výsledků lze tedy usuzovat, že se jedná o systémy s nízkou anomalitou. Nejvyšší hodnoty alfa bylo dosaženo u vzorku s 0,01 g/l hyaluronanu. Po přidávku větší koncentrace došlo k jejímu snížení a s dalšími přidávkami se systém opět homogenizoval. Na hodnoty tripletního stavu pak rostoucí koncentrace hyaluronanu neměla značný vliv. Data zůstávala konstantní, pouze u systému s 0,5 g/l došlo k propadu dat.

Tabulka 27: Získané hodnoty parametru alfa a tripletu.

TEx3D			
c HyA [mg/l]	alfa	T	$\tau_{trip}$ [μs]
0,000	0,826 ± 0,015	-	-
0,001	0,899 ± 0,006	0,032 ± 0,004	80,0 ± 0,0
0,005	0,890 ± 0,005	0,038 ± 0,002	80,0 ± 0,0
0,010	0,911 ± 0,006	0,035 ± 0,003	80,0 ± 0,0
0,500	0,843 ± 0,008	0,053 ± 0,004	24,0 ± 3,6
0,750	0,859 ± 0,009	0,037 ± 0,003	80,0 ± 0,0
1,000	0,872 ± 0,009	0,044 ± 0,003	80,0 ± 0,0

Na Obrázku 63 si pak můžeme všimnout závislosti velikosti částic na rostoucí koncentraci hyaluronanu, zjištěnou pomocí metody DLS a FCS. Ze závislosti je patrné, data naměřená analýzou

DLS nekoreluje s daty zjištěnými pomocí metody FCS. I zde tak má na systém pravděpodobně vliv nehomogenní distribuce fluorescenčních sond v silikátových částicích, či zvýšená polydisperzita systémů.



Obrázek 63: Závislost velikostí částic na rostoucí koncentraci hyaluronanu zjištěné metodami DLS a FCS.

## 7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly zkoumány difuzní vlastnosti vezikulárních systémů pomocí dvou rozptylových metod, a to dynamického rozptylu světla a fluorescenční korelační spektroskopie. Nejprve byly vybrány fluorescenční sondy, u kterých byla následně ověřena jejich vhodnost pro barvení a studium vezikulárních systémů. U fluorescenční sondy RBOE nebyla její vhodnost potvrzena a z následných experimentů tak byla vyřazena. U zbývajících tří sond (DiI, DiO, F16) došlo k proměření systémů cIPA s různým přídatkem hyaluronanu.

Pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla došlo k získání informací o průměrné velikosti částic, polydisperzitě a zeta potenciálu. Analýza ukázala, že při nízkých koncentracích hyaluronanu se zeta potenciál pohybuje v kladných hodnotách, zatímco při vyšších koncentracích poklesne k záporným. Tento jev může být vysvětlen na základě poměru nábojů záporně nabitého hyaluronanu a kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC, vyskytujícího se na povrchu vezikul. Při nižších koncentracích je poměr menší než 1, kladný náboj u DODAC tak převládá nad záporným hyaluronanem a hodnoty zeta potenciálu jsou tak záporné. Naopak při vysokých koncentracích je poměr mnohonásobně větší, než 1, čímž dochází k převaze záporného náboje a poklesu zeta potenciálu.

Pomocí analýzy FCS byly kromě jiného získány i difuzní koeficienty, ze kterých byly následně vypočteny hydrodynamické průměry částic. Data získaná z obou metod pak byla následně porovnána, kdy došlo ke zjištění, že se výsledky značně neshodují. Bylo zjištěno, že s přídatkem fluorescenčních sond k samotným cIPA systémům dochází ke zvýšení hodnot PDI, což poukazuje na nehomogenní distribuci barviva do jednotlivých vezikul. Zvýšené PDI taktéž ovlivňuje i hodnotu molekulárního jasu, kdy větší částice obsahují více molekul fluoroforu, čímž také o to intenzivněji svítí. Tímto pak dochází k zastínění menších částic většími, a to i když se v systému vyskytují v majoritní množství. Zároveň bylo zjištěno, že s přídatkem hyaluronanu dochází jak ke zvyšování polydisperzity, tak velikosti částic. Záporně nabitý hyaluronan tedy interaguje s kladně nabitými vezikuly, čímž se utvářejí částice s většími rozměry. Zároveň některé vezikuly mohou s hyaluronanem interagovat více, jak jiné, a tím bude pravděpodobně docházet ke vzniku systému s nehomogenní distribucí velikostí částic. Taktéž bylo zjištěno, že přidání hyaluronanu brzdí pohyb vezikul, čímž dochází k anomální difuzi.

Závěrem je tedy nutné říct, že nejen že systémy vykazují nehomogenní distribuci sondy a polydisperzitu, ale také i anomální difuzi, čím se stávají značně složitějšími a dostupné matematické modely, které slouží k proložení FCS dat, jsou naprosto nedostačující. K analýze těchto systémů je tedy zapotřebí využít složitějších matematických modelů a sofistikovanějších programů, které budou uvažovat polydisperzitu či optimalizaci molekulárního jasu. Ze studie také bylo zjištěno, že každá sonda pravděpodobně využívá jiný mechanismus barvení, a proto není vhodné na všechny analyzované systémy použít stejné vyhodnocovací modely. Do budoucna by tedy mohlo dojít zejména k prozkoumání nových matematických modelů. Dále by se také mohl vyzkoušet jiný způsob značení, a to například do kapalného kompartmentu vezikul.

## 8 LITERATURA

- [1] FARN, Richard J., 2006. *Chemistry and technology of surfactants*. Ames, Iowa: Blackwell Pub. ISBN 978-14051-2696-0.
- [2] W. M. Linfield, W. M. Linfield (ed.): *Anionic Surfactants*, Marcel Dekker, New York, 1967.
- [3] E. H. Lucassen-Reynders: *Anionic Surfactants – Physical Chemistry of Surfactant Action*, Marcel Dekker, New York, 1981.
- [4] TADROS, Tharwat F., 2005. *Applied surfactants: principles and applications*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-30629-9.
- [5] DENNISON, Clive. *A Guide to Protein Isolation*. [s.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2002. ISBN 0-306-46868-9.
- [6] Cetrimonium bromid. *PubChem* [online]. [cit. 2023-02-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5974>
- [7] B. R. Buestein, C. L. Hilton: *Amphoteric Surfactants*, Marcel Dekker, New York, 1982.
- [8] M. J. Schick (ed.): *Nonionic Surfactants*, Marcel Dekker, New York, 1966.
- [9] N. Schonfeldt: *Surface Active Ethylene Oxide Adducts*, Pergamon Press, Oxford, 1970
- [10] Porter, M.R. (1994) *Handbook of Surfactants*, 2nd edn. Chapman & Hall, London.
- [11] Mukerjee, P. and Mysels, K.J. (1971) *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. NSRDS-NBS 36, Washington, DC.
- [12] Micelle. *Glossary of nanotechnology and related terms* [online]. [cit. 2023-02-07]. Dostupné z: <https://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>
- [13] Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect*. Wiley, New York.
- [14] Israelachvili, J. (1992) *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd edn. Academic, Orlando, FL.
- [15] JURAŠIN, Darija Domazet, Suzana ŠEGOTA, Vida ČADEŽ, Atiđa SELMANI a Maja Dutour SIKIRČ, 2017. *Recent Advances in Catanionic Mixtures. Application and Characterization of Surfactants*. InTech, 2017-07-05. ISBN 978-953-51-3325-4. Dostupné z: doi:10.5772/67998
- [16] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG, 2016. *Recent Strategies in the Development of Catanionic Vesicles*. *Journal of Oleo Science*. **65**(5), 377-384. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess15249
- [17] Moghimi, S.M., Hunter, A.C. and Murray, J.C. (2005), *Nanomedicine: current status and future prospects*. *The FASEB Journal*, 19: 311-330. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>
- [18] YADAV, Durgavati, Kumar SANDEEP, Deepak PANDEY a Ranu Kumari DUTTA, 2017. *Liposomes for Drug Delivery*. **07**(04). ISSN 2155952X. Dostupné z: doi:10.4172/2155-952X.1000276.
- [19] ZYLBERBERG, Claudia a Sandro MATOSEVIC, 2016. *Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape*. *Drug Delivery*. **23**(9), 3319-3329. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2016.1177136
- [20] SOUSSAN, Elodie, Stéphanie CASSEL, Muriel BLANZAT a Isabelle RICO-LATTES, 2009. *Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers*. *Angewandte Chemie International Edition*. **48**(2), 274-288. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200802453
- [21] Dhawan V.V., Nagarsenker M.S. *Catanionic systems in nanotherapeutics—Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications*. *J. Control. Release*. 2017;266:331–345. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.040.
- [22] Walker S.A., Zasadzinski J.A. *Electrostatic Control of Spontaneous Vesicle Aggregation*. *Langmuir*. 1997;13:5076–5081. doi: 10.1021/la970094z

- [23] Lee C.H., Yang Y.M., Chang C.H. Enhancing physical stability of positively charged cationic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid Polym. Sci.* 2014;292:2519–2527. doi: 10.1007/s00396-014-3285-x.
- [24] De Meyer F.J.M., Benjamini A., Rodgers J.M., Misteli Y., Smit B. Molecular Simulation of the DMPC-Cholesterol Phase Diagram. *J. Phys. Chem. B.* 2010;114:10451–10461. doi: 10.1021/jp103903s.
- [25] Lee W.H., Tang Y.L., Chiu T.C., Yang Y.M. Synthesis of Ion-Pair Amphiphiles and Calorimetric Study on the Gel to Liquid-Crystalline Phase Transition Behavior of Their Bilayers. *J. Chem. Eng. Data.* 2015;60:1119–1125. doi: 10.1021/je501079n.
- [26] Liu Y.S., Wen C.F., Yang Y.M. Cholesterol Effects on the Vesicular Membrane Rigidity and Drug Encapsulation Efficiency of Ethosome-Like Cationic Vesicles. *Sci. Adv. Mater.* 2014;6:954–962. doi: 10.1166/sam.2014.1859.
- [27] Tang W.H., Chuang Y.T., Yu C.Y., Chang C.H., Yang Y.M. Effects of Sterol-Like Additives on Phase Transition Behavior of Ion-Pair Amphiphile Bilayers. *J. Oleo Sci.* 2017;66:1229–1238. doi: 10.5650/jos.ess17086.
- [28] HAVLÍKOVÁ, Martina, Adam JUGL, Jitka KROUSKÁ, et al., 2021. Interactions between Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles and Hyaluronan—A Physicochemical Study. *Langmuir*. **37**(28), 8525-8533. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.1c00993
- [29] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR, 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*. **53**(8), 397-411. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [30] LAURENT, TORVARD C, ULLA BG LAURENT a J ROBERT E FRASER, 1996. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology*. **74**(2), a1-a7. ISSN 08189641. Dostupné z: doi:10.1038/icb.1996.32
- [31] SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE a Christopher A. LOVE, 2016. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*. **6**(1). ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-016-0379-9
- [32] HASCALL, V. C. a T. C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: Glycoforum [online]. 1997 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html> [3] Známý neznámý hyaluronan. In: Chempoint [online]. 2011 [cit. 2014
- [33] POUCHLÝ, Julius, 2008. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [34] L. Liu, X. Cai, J. Zhang, C. Xu, Particle-size measurements in a micro-channel with image dynamic light scattering method, *Procedia Eng.* 102 (2015) 904e910.
- [35] C. Xu, X. Cai, J. Zhang, L. Liu, Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering 19 (2015) 82e85.
- [36] R. Weber, G. Schweiger, Photon correlation spectroscopy on flowing polydisperse fluid-particle systems: theory, *Appl. Opt.* 37 (1998) 4039e4050.
- [37] H. wang, J. Shen, B. Wang, B. Yu, Y. Xu, Laser diode feedback interferometry in flowing Brownian motion system: a novel theory, *Appl. Phys. B* 101 (2010) 173e183
- [38] H.Z. Cummins, N. Knable, Y. Yeh, Observation of diffusion broadening of Rayleigh scattered light, *Phys. Rev. Lett.* 12 (1964) 150e152.
- [39] EL HADJI MAMOUR SAKHO, Elaheh Allahyari; OLUWAFEMI, Oluwatobi S. Dynamic light scattering (DLS). *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, 2017, 3: 37.
- [40] HASSAN, Puthusserickal A., Suman RANA a Gunjan VERMA, 2015. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir*. **31**(1), 3-12. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la501789z



- [41] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL, 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. **8**(4), 409-427. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- [42] BABICK, Frank, 2020. Dynamic light scattering (DLS). *Characterization of Nanoparticles*. Elsevier, 2020, 137-172. ISBN 9780128141823. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9
- [43] VILLARI, Valentina a Norberto MICALI, 2008. Light Scattering as Spectroscopic Tool for the Study of Disperse Systems Useful in Pharmaceutical Sciences. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **97**(5), 1703-1730. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21067
- [44] TSCHARNUTER, Walther. Photon correlation spectroscopy in particle sizing. *Encyclopedia of analytical chemistry*, 2000, 5469-5485.
- [45] Electrophoretic Light Scattering, 2002. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 289-343. Particle Technology Series. ISBN 0-7923-6300-0. Dostupné z: doi:10.1007/0-306-47124-8\_6.
- [46] PATEL, Samir G., Meghal D. PATEL, Archita J. PATEL, Mahavir B. CHOUGULE a Hira CHOUDHURY, 2018. Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors*. Elsevier, 2018, 191-244. ISBN 9780128122181. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812218-1.00008-7
- [47] VARENNE, F., J.-B. COTY, J. BOTTON, F.-X. LEGRAND, H. HILLAIREAU, G. BARRATT a C. VAUTHIER, 2019. Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. *Talanta*. **205**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.06.062
- [48] KOKUFUTA, Etsuo, 2016. Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering of Biopolymers. *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set*. Hoboken, NJ, USA, 2016-09-24, 619-627. ISBN 9781119075691. Dostupné z: doi:10.1002/9781119075691.ch51
- [49] LIMPOUCHOVÁ, Zuzana a Karel PROCHÁZKA, 2016. Theoretical Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*. Cham: Springer International Publishing, 2016-02-04, 91-149. Springer Series on Fluorescence. ISBN 978-3-319-26786-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-26788-3\_4
- [50] ROYER, C.A., 1995. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*. **68**(3), 1191-1195. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(95)80295-X
- [51] SIKORSKA, Ewa, Igor KHMELINSKII a Marek SIKORSKI, 2019. Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality*. Elsevier, 2019, 491-533. ISBN 9780128142172. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00019-6
- [52] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006. Boston, MA: Springer US. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-46312-4\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-46312-4_1)
- [53] Perrin-Jablonski Diagram. *Direct industry* [online]. [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: <https://trends.directindustry.com/edinburgh-instruments/project-25178-193661.html>
- [54] *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 2005. Elsevier. ISBN 9780123485304. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123485304002113>
- [55] So, P.T. and Dong, C.Y. (2001). Fluorescence Spectrophotometry. In eLS, (Ed.). <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002978>
- [56] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 1999. Boston, MA: Springer US. ISBN 978-1-4757-3063-0. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-3061-6\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-3061-6_2)

- [57] What is the Difference Between Spectrophotometer and Spectrofluorometer. *Difference Between* [online]. [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.differencebetween.com/what-is-the-difference-between-spectrophotometer-and-spectrofluorometer/>
- [58] KIRBY, Edward P., 1971. Fluorescence Instrumentation and Methodology. *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Boston, MA: Springer US, 1971, 31-56. ISBN 978-1-4684-1880-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-1878-1\_2
- [59] YU, Lanlan, Minyi TAN, Bow HO, Jeak Ling DING a Thorsten WOHLAND, 2006. Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide. *Analytica Chimica Acta* [online]. **556**(1), 216-225 [cit. 2022-11-12]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2005.09.008
- [60] VERDAASDONK, Jolien Suzanne, Josh LAWRIMORE a Kerry BLOOM, 2014. Determining absolute protein numbers by quantitative fluorescence microscopy. *Quantitative Imaging in Cell Biology* [online]. Elsevier, 2014, 347-365 [cit. 2022-11-10]. Methods in Cell Biology. ISBN 9780124201385. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00019-7
- [61] GUPTA, Anjali, Jagadish SANKARAN a Thorsten WOHLAND, 2019. Fluorescence correlation spectroscopy: The technique and its applications in soft matter. *Physical Sciences Reviews* [online]. **4**(4) [cit. 2022-09-28]. ISSN 2365-659X. Dostupné z: doi:10.1515/psr-2017-0104
- [62] LEVIN, Mikhail K. a John H. CARSON, 2004. Fluorescence correlation spectroscopy and quantitative cell biology. *Differentiation* [online]. **72**(1), 1-10 [cit. 2022-11-12]. ISSN 03014681. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-0436.2004.07201002.x
- [63] YU, Lan, Yunze LEI, Ying MA, Min LIU, Juanjuan ZHENG, Dan DAN a Peng GAO, 2021. A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Frontiers in Physics* [online]. **9** [cit. 2022-09-28]. ISSN 2296-424X. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2021.644450
- [64] ELSON, Elliot L., 2011. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future. *Biophysical Journal* [online]. **101**(12), 2855-2870 [cit. 2022-11-12]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2011.11.012
- [65] SENGUPTA, Parijat, J BALAJI a Sudipta MAITI, 2002. Measuring diffusion in cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* [online]. **27**(4), 374-387 [cit. 2022-10-12]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/S1046-2023(02)00096-8
- [66] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT, 2012. *Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science* [online]. **17**(6), 377-387 [cit. 2022-09-28]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2012.09.003
- [67] ENDERLEIN, Jörg, Ingo GREGOR, Digambara PATRA, Thomas DERTINGER a U. Benjamin KAUPP, 2005. Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration. *ChemPhysChem* [online]. **6**(11), 2324-2336 [cit. 2022-09-29]. ISSN 1439-4235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.200500414
- [68] Beranová, L., Humpolíčková, J., & Hof, M. (2009). Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Chemické Listy*, **103**(2).
- [69] FELEKYAN, S., R. KÜHNEMUTH, V. KUDRYAVTSEV, C. SANDHAGEN, W. BECKER a C. A. M. SEIDEL, 2005. Full correlation from picoseconds to seconds by time-resolved and time-correlated single photon detection. *Review of Scientific Instruments* [online]. **76**(8) [cit. 2022-09-29]. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1946088
- [70] JENSEN, Ellen C., 2012. Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. **295**(12), 2031-2036 [cit. 2022-11-18]. ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.22602

- [71] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8
- [72] HERMANSON, Greg T., 2013. *Fluorescent Probes. Bioconjugate Techniques* [online]. Elsevier, 2013, 395-463 [cit. 2022-11-18]. ISBN 9780123822390. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382239-0.00010-8
- [73] Z. Fišar, *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*, publikováno na internetu, 2003 (<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>, 25. 4. 2007).
- [74] BARRANTES, Francisco J., 2021. *Fluorescence sensors for imaging membrane lipid domains and cholesterol. New Methods and Sensors for Membrane and Cell Volume Research*. Elsevier, 2021, 257-314. *Current Topics in Membranes*. ISBN 9780323911146. Dostupné z: doi:10.1016/bs.ctm.2021.09.004
- [75] Strekowski L, editor. *Heterocyclic polymethine dyes. Top Heterocycl. Chem. vol. 14*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2008
- [76] Mishra A, Behera RK, Behera PK, Mishra BK, Behera GB. Cyanine during 1990s: a review. *Chem Rev* 2000;100:1973–2011
- [77] Levitus M, Ranjit S. Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of poly-methine fluorescent dyes in biomolecular environments. *Quart Rev Biophys* 2011;44:123–51
- [78] Mujumdar SR, Mujumdar RB, Grant CM, Waggoner AS. Cyanine-labelling reagents: sulfo benzindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem* 1996;7:356–62
- [79] Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS. Cyanine dye labelling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem* 1993;4:105–11
- [80] Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B, Semmler W. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photo-physical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem Photobiol* 2000;72:392–8
- [81] PTASZEK, Marcin. *Rational Design of Fluorophores for In Vivo Applications. Fluorescence-Based Biosensors - From Concepts to Applications*. Elsevier, 2013, 2013, 59-108. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. ISBN 9780123869326. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386932-6.00003-X
- [82] BRICKS, Julia L, Yuri L SLOMINSKII, Ihor D PANAS a Alexander P DEMCHENKO, 2018. *Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review. Methods and Applications in Fluorescence*. 6(1). ISSN 2050-6120. Dostupné z: doi:10.1088/2050-6120/aa8d0d
- [83] Andrey S. Klymchenko: Emerging field of self-assembled fluorescent organic dye nanoparticles. *J. Nanosci. Lett.* 2013, 3: 21
- [84] 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2023-01-20]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/d4292?gclid=Cj0KCQiAlKmeBhCkARIsAHy7WVuf7DDAkH6aIAuZLjswukJfnZ9GItFa2pcAdHqh8i22pCDwDfH2a2IaAvQmEALw\\_wcB&gclidsrc=aw.ds](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/d4292?gclid=Cj0KCQiAlKmeBhCkARIsAHy7WVuf7DDAkH6aIAuZLjswukJfnZ9GItFa2pcAdHqh8i22pCDwDfH2a2IaAvQmEALw_wcB&gclidsrc=aw.ds)
- [85] *Dialkylcarbocyanine and Dialkylaminostyryl Probes—Section 13.4. The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* [online]. 11th ed. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation, 2010 [cit. 2023-20-01]. ISBN 0982927916. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home.html>
- [86] 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2023-01-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/468495>
- [87] NECKERS, Douglas C. a Oscar M. VALDES-AGUILERA, 1993. *Photochemistry of the Xanthene Dyes. Advances in Photochemistry*. Hoboken, NJ, USA, 2007-01-05, 315-394. *Advances in Photochemistry*. ISBN 9780470133491. Dostupné z: doi:10.1002/9780470133491.ch4

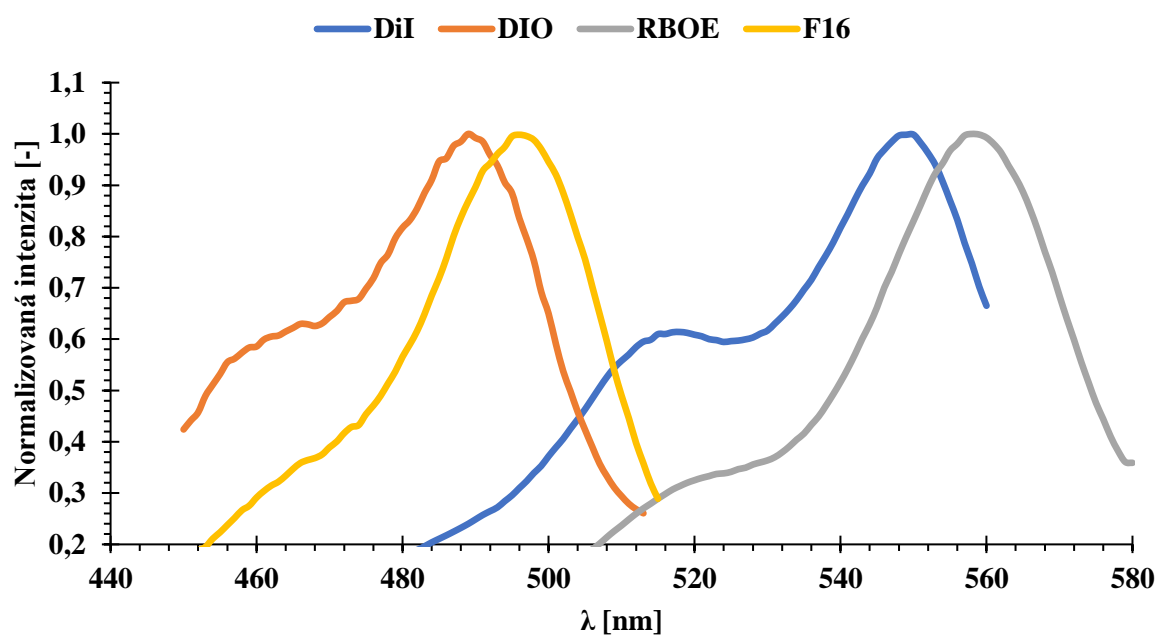
- [88] SCHRAMM, Stefan a Dieter WEISS, 2019. *Fluorescent heterocycles: Recent trends and new developments*. Elsevier, 2019, 103-179. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. ISBN 9780128171813. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aihch.2018.10.003
- [89] *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000-12-04. Dostupné z: doi:10.1002/0471238961.2401142023090708.a01
- [90] M. Wainwright, *Photosensitizers in Biomedicine*, John Wiley & Sons, Inc. Ltd., 2009.
- [91] BURANDA, Tione, Yang WU, Dominique PEREZ, Alexandre CHIGAIEV a Larry A. SKLAR, 2010. Real-Time Partitioning of Octadecyl Rhodamine B into Bead-Supported Lipid Bilayer Membranes Revealing Quantitative Differences in Saturable Binding Sites in DOPC and 1: 1. *The Journal of Physical Chemistry B*. **114**(3), 1336-1349. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp906648q
- [92] Rhodamine B octadecyl ester perchlorate, Lipophilic energy transfer acceptor (ab145364). *Abcam* [online]. [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/rhodamine-b-octadecyl-ester-perchlorate-lipophilic-energy-transfer-acceptor-ab145364.html>
- [93] Technology Networks. *Technology Networks* [online]. [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/products/understanding-homofret-281901>
- [94] 5-HEXADECANOYLAMINOFLUORESCEIN. *Chemical book* [online]. [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: [https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9669543.htm](https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9669543.htm)
- [95] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG, 2014. Fabrication of positively charged cationic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 292(3), 589-597. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-013-3104-9
- [96] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2018, 92, 29-35 [cit. 2020-12-26]. DOI: 10.1016/j.jtice.2018.02.013. ISSN 1876-1070. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107018300993>
- [97] ZHANG, Zhenfu, Dan YOMO a Claudiu GRADINARU, 2017. Choosing the right fluorophore for single-molecule fluorescence studies in a lipid environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1859**(7), 1242-1253. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2017.04.001
- [98] KALWARCZYK, Tomasz, Karina KWAPISZEWSKA, Krzysztof SZCZEPANSKI, et al., 2017. Apparent Anomalous Diffusion in the Cytoplasm of Human Cells: The Effect of Probes' Polydispersity. *The Journal of Physical Chemistry B*. **121**(42), 9831-9837. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.7b07158
- [99] AHMED, Sohail, Andrew H. A. CLAYTON, Andreas HERRMANN, et al. Practical Manual for Fluorescence Microscopy Techniques. *PicoQuant* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: [https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/17319/5\\_fcs.pdf](https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/17319/5_fcs.pdf)
- [100] SCHAEFFEL, David, Stoyan YORDANOV, Roland Hinrich STAFF, et al., 2015. Fluorescence Correlation Spectroscopy in Dilute Polymer Solutions: Effects of Molar Mass Dispersity and the Type of Fluorescent Labeling. *ACS Macro Letters*. **4**(2), 171-176. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/mz500638e

## 9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

PAL	Povrchově aktivní látky
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného)
CTAB	Hexadecyltrimethylamonium bromid
DODAC	Dimethyldioktadecylamonium chlorid
CMC	Critical micelle concentration (kritická micelární koncentrace)
M	$\text{mol dm}^{-3}$
$P_c$	Packing parameter (sbalovací parametr)
IPA	Ion pair amphiphile (iontově amfifilní pár)
$\bar{A}_i$	Střední posuv disperzní částice
$J_i$	Difuzní tok
$D_\tau$	Difuzní koeficient
DLS	Dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
PCS	Photon correlation spectroscopy (fotonová korelační spektroskopie)
$R_h$	Hydrodynamický poloměr
ELS	Electrophoretic light scattering (elektroforetický rozptyl světla)
$\zeta$	Zeta potenciál
$S_0$	Základní energetická hladina singletového stavu
$S_1, S_2$	Vyšší energetické hladiny singletových stavů
$T_1$	Tripletový stav molekuly
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy (Fluorescenční korelační spektroskopie)
EB	Ethidium bromid
NA	Numerická aparatura
PMT	Photomultiplier tube (fotonásobič)
SPAD	Single photon avalanche diodes (jednofotonové lavinové diody)
$G(\tau)$	Autokorelační funkce
$V_{\text{eff}}$	Efektivní detekční objem
$\tau_D$	Difuzní čas
PN	Particle number (průměrný počet částic)
GFP	Green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
DiO	3,3'-dioktadecyloxakarbokyanin perchlorát
DiI	1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindokarbokyanin perchlorát
RBOE	Rhodamin B oktadecyl ester perchlorát
F16	
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (Försterův rezonanční přenos energie)
LUV	Large unilamellar vesicles (velké unilamelární vezikuly)
TEx3D	Triplet extended 3D

## 10 PŘÍLOHA

### 10.1 Excitační spektrum



Obrázek 64: Excitační spektrum vybraných fluorescenčních sond.

## 10.2 FLCS analýza

### 10.2.1 Sonda DiI

Tabulka 28: FLCS analýza s využitím sondy DiI s delší dobou života.

c HyA [g/l]	Doba života [ns]	Pure diffusion			TE <sub>x</sub> 3D				
		D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	d <sub>H</sub> [nm]	N [-]	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	d <sub>H</sub> [nm]	$\alpha$ [-]	
0,000	1,501	2,90 ± 0,12	169,14 ± 7,01	0,193 ± 0,001	0,187 ± 0,002	2,50 ± 0,11	98,10 ± 8,65	0,939 ± 0,028	
0,001	1,531	3,67 ± 0,05	133,65 ± 1,82	0,836 ± 0,002	0,830 ± 0,005	3,64 ± 0,05	134,75 ± 1,85	0,960 ± 0,014	
0,005	1,982	3,94 ± 0,04	124,49 ± 1,26	3,020 ± 0,016	2,980 ± 0,013	4,14 ± 0,04	118,48 ± 1,14	0,940 ± 0,007	
0,010	1,600	4,10 ± 0,19	119,64 ± 5,56	4,360 ± 0,045	4,120 ± 0,029	4,37 ± 0,10	112,24 ± 2,54	0,837 ± 0,018	
0,500	1,629	4,10 ± 0,12	119,64 ± 3,51	12,000 ± 0,110	11,000 ± 0,120	4,50 ± 0,11	54,50 ± 2,67	0,923 ± 0,017	
0,750	1,627	2,88 ± 0,03	170,31 ± 1,72	5,860 ± 0,023	5,790 ± 0,050	2,88 ± 0,04	170,31 ± 2,37	0,974 ± 0,013	
1,000	1,637	1,66 ± 0,04	295,48 ± 6,77	4,835 ± 0,010	4,760 ± 0,030	1,65 ± 0,03	297,28 ± 5,41	0,910 ± 0,010	

Tabulka 29: FLCS analýza s využitím sondy DiI s kratší dobou života.

c HyA [g/l]	Doba života [ns]	Pure diffusion			TE <sub>x</sub> 3D				
		D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	d <sub>H</sub> [nm]	N [-]	N [-]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	d <sub>H</sub> [nm]	$\alpha$ [-]	
0,000	0,699	5,60 ± 0,11	87,59 ± 1,72	0,328 ± 0,001	0,120 ± 0,320	5,50 ± 0,12	89,18 ± 1,95	0,911 ± 0,018	
0,001	0,732	5,90 ± 0,15	83,14 ± 2,12	1,310 ± 0,010	0,100 ± 1,300	6,27 ± 0,10	78,23 ± 1,25	0,935 ± 0,010	
0,005	0,995	5,21 ± 0,07	94,15 ± 1,23	1,710 ± 0,007	0,100 ± 1,690	4,60 ± 0,10	106,63 ± 2,32	0,960 ± 0,010	
0,010	0,805	5,30 ± 0,25	92,55 ± 4,38	5,190 ± 0,050	0,130 ± 4,860	6,40 ± 0,13	76,64 ± 1,56	0,847 ± 0,014	
0,500	0,883	4,91 ± 0,10	99,90 ± 2,04	14,000 ± 0,120	0,230 ± 14,000	5,50 ± 0,23	89,18 ± 3,74	0,919 ± 0,017	
0,750	0,894	3,50 ± 0,06	140,14 ± 2,32	6,760 ± 0,025	0,066 ± 6,800	3,55 ± 0,07	138,17 ± 2,57	1,000 ± 0,022	
1,000	0,888	1,94 ± 0,03	252,84 ± 3,52	5,360 ± 0,014	0,030 ± 5,250	1,90 ± 0,03	258,16 ± 4,08	0,921 ± 0,001	