



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM HYDRATAČNÍHO OBALU VEZIKULÁRNÍCH
SYSTÉMŮ NA BÁZI IONTOVÝCH AMFIFILNÍCH PÁRŮ**

STUDY OF THE HYDRATION SHELL OF VESICULAR SYSTEMS BASED ON IONIC AMPHIPHILIC PAIRS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Rašticová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1664/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Rašticová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium hydratačního obalu vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na používané metody studia hydratačního obalu membránových systémů.
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodné metody studia hydratačního obalu amfifilního páru Cetyltrimethylamonium–dodecylsírán a studovat vliv teploty.
- 3) Zhodnotit a porovnat získané parametry daného systému s rešerší.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Barbora Rašticová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem hydratačního obalu kladně nabitých vezikulárních systémů. Cílem práce bylo sledovat hydratační obal a zjistit tak množství molekul vody v okolí při různých stavech membrány. Dále také porovnání dvou vybraných fluorescenčních sond. Jako systémy byly využity kladně nabitě vezikulární systémy složeny ze dvou druhů tenzidů, a to ze záporně nabitého SDS a kladně nabitého CTAB. Pro stabilizaci byl k systému přidán i dvou řetězový kladně nabitý tenzid DODAC. Díky tomuto tenzidu získaly vzniklé vezikulární systémy kladný náboj. Pro studium byly vybrány tři různé koncentrace cholesterolu, které byly přidány k systému, a to 20, 40 a 60 mol. %. Studium bylo provedeno pomocí měření emise fluorescence v závislosti na rostoucí teplotě, kde teplotní interval byl od 10 do 80 °C. Jako fluorescenční sondy byly vybrány Laurdan a Prodan. Pro vyhodnocení byla využita metoda generalizované polarizace. Laurdanu se díky své struktuře nachází zejména v membránovém prostředí, proto byla pro jeho vyhodnocení postačující metoda dvou vlnové generalizované polarizace, která zahrnuje příspěvky fluorescence pouze z membrány. Prodan má oproti Laurdanu kratší uhlovodíkový řetězec, proto se začleňuje nejen do membrány ale také do vodného prostředí. Proto byla pro vyhodnocení Prodanu využita metoda tří vlnové generalizované polarizace, která zahrnuje i příspěvek fluorescence z vodného prostředí. Výsledky ukázaly, že chování obou sond je velmi podobné. U všech systému docházelo s rostoucí teplotou k poklesu hodnot generalizované polarizace. Při nízkých teplotách se tedy membrána nachází ve stavu pevném uspořádaném. Se zvyšující teplotou dochází k přeměně do stavu kapalného neuspořádaného. S rostoucí teplotou tedy dochází ke zvyšování počtu molekul vody. Zároveň se s rostoucí koncentrací cholesterolu zvětšoval interval fázového přechodu. Výsledky též ukázaly, že hodnoty tří vlnové generalizované polarizace Prodanu jsou vždy vyšší, jak hodnoty dvou vlnové generalizované polarizace Laurdanu.

KLÍČOVÁ SLOVA:

kataniontové vezikulární systémy, iontový amfifilní pár, hydratační obal, Prodan, Laurdan, generalizovaná polarizace

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of hydration shell of positively charged vesicular systems. The aim of the work was to monitor the hydration shell and to find out the amount of water molecules in the environment at different conditions of the membrane. Furthermore, a comparison of two selected fluorescent probes were studied. Positively charged vesicular systems composed of two types of surfactants were used, namely negatively charged SDS and positively charged CTAB. The two-chain positively charged surfactant was also added, resulting a positively charged vesicular systems. Three different concentrations of cholesterol were selected for the study and added to the system, namely 20, 40 and 60 mol. %. The study was performed by measuring the fluorescent emission as a function of temperature. The temperature range was from 10 to 80 °C. As a fluorescent probe Laurdan and Prodan were selected. For evaluation the method of generalized polarization was used. Due to its structure, Laurdan is mainly found in the membrane environment, so the method of two-wavelength generalized polarization, which includes fluorescence contributions only from the membrane, was sufficient for its evaluation. Compared to Laurdan, Prodan has a shorter hydrocarbon chain, so its distribution is not only in the membrane but also in the aqueous environment. Therefore, the method of three-wavelength generalized polarization, which also includes the contribution of fluorescence from the aqueous environment was used. The results showed that the behaviour of both probes is very similar. In all systems, the values of generalized polarization decreased with increasing temperature. Thus, at low temperatures, the membrane is in a solid ordered phase. With increasing temperature, it transforms into a liquid disordered phase. Thus, with increasing temperature, the number of water molecules increases. As the cholesterol concentration increased, the phase transition interval increased. The results also showed that the values of Prodan's three wavelength generalized polarization are always higher than the values of Laurdan's two wavelength generalized polarization.

KEY WORDS:

catanionic vesicular systems, ion pair amphiphile, hydration shell, Prodan, Laurdan, Generalized polarization

RAŠTICOVÁ, Barbora. *Studium hydratačního obalu vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131415>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

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

podpis studenta

Poděkování

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

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
	2.1 Tenzidy	8
	2.1.1 Aniontové tenzidy.....	8
	2.1.2 Kationtové tenzidy.....	9
	2.1.3 Micely	9
	2.1.4 Kataniontové vezikulární systémy.....	11
	2.2 Fluorescence	12
	2.2.1 Fluorescenční sondy	13
	2.2.2 Generalizovaná polarizace	15
	2.2.3 Instrumentace.....	16
3	Současný stav řešené problematiky	17
	3.1 Příprava a stabilita kataniontových vezikul	17
	3.2 Studium fosfolipidových vezikul pomocí fluorescenčních technik.....	18
4	Experimentální část	22
	4.1 Chemikálie.....	22
	4.2 Shrnutí cílů práce.....	22
	4.3 Použité metody	23
	4.3.1 Příprava IPA	23
	4.3.2 Příprava cIPA + cholesterol	23
	4.3.3 Příprava vzorků na solubilizaci.....	23
	4.3.4 Spektrofluorimetrie.....	23
5	Výsledky a diskuze	25
	5.1 Příprava IPA	25
	5.2 Příprava cIPA + cholesterol.....	25
	5.3 Emisní spektra a intenzita fluorescence.....	26
	5.4 Generalizovaná polarizace	29
	5.4.1 Generalizovaná polarizace Laurdanu.....	29
	5.4.2 Generalizovaná polarizace Prodanu.....	30
	5.4.3 Porovnání generalizované polarizace Laurdanu a Prodanu	33
6	Závěr	38
7	Litertura	40
8	Seznam zkratk a symbolů	43
	8.1 Seznam použitých zkratk	43
	8.2 Seznam použitých symbolů	43
9	Příloha	45
	9.1 Vzorky před a po sonifikaci.....	45
	9.2 Emisní spektra.....	45
	9.3 Generalizovaná polarizace	47
	9.3.1 Generalizovaná polarizace Laurdanu.....	47
	9.3.2 Generalizovaná polarizace Prodanu.....	47

1 ÚVOD

Kataniontové vezikulární systémy lze vytvořit pomocí dvou opačně nabitých tenzidů. Příkladem takových tenzidů je záporně nabitá SDS a kladně nabitá CTAB. Spojením těchto dvou látek vzniká útvar zvaný IPA neboli iontový amfifilní pár. Takto vzniklé systémy nejsou sami o sobě stabilní, proto se k nim přidávají další látky, jako je například dvou-řetězcový kladně nabitý tenzid DODAC, který zároveň dává vzniklým vezikulárním systémům kladný náboj. Dále se pro stabilizaci používá cholesterol.

Vzniklé vezikulární systémy mají tvar dutých kuliček a jsou složeny ze dvou částí – hydrofobní a hydrofilní. Hydrofilní část je tvořena polárními hlavami, hydrofobní naopak nepolárními uhlovodíkovými řetězci. Tímto uspořádáním se tak utváří uzavřená dvojvrstva, která od sebe odděluje polární prostředí od nepolárního. Tohoto uspořádání se využívá zejména ve farmaceutickém průmyslu, kde se vezikulární systémy využívají zejména jako nosiče léčiv. Látky lipofilní povahy tak mohou být zadrženy v membránové dvojvrstvě a přeneseny na místo určení. Hydrofilní látky na druhou stranu vnikají do jádra vezikul, kde se nachází polární prostředí. Kromě nosičových systémů mohou také uplatnit své využití jako modelové biologické membrány.

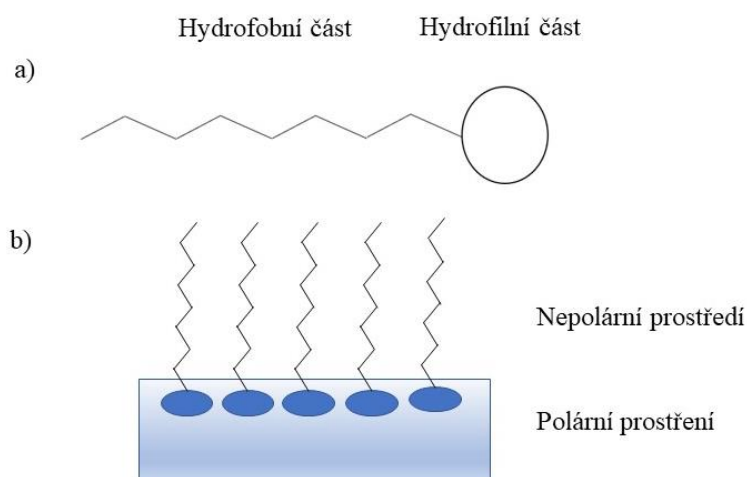
Cílem práce bylo sledovat hydratační obal vezikulárních systémů pomocí fluorescenčních technik, a zjistit tak množství molekul vody v okolí v závislosti na různých stavech membrány. Ke studiu byly využity tři různé koncentrace cholesterolu: 20, 40 a 60 mol. % a jako fluorescenční sondy byly vybrány Laurdan a Prodan. Studium bylo provedeno proměřením emisních spekter obou sond. Data byly následně vyhodnoceny pomocí metody generalizované polarizace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky (PAL), které jsou schopny se hromadit na mezifázovém rozhraní a snižovat tak mezifázovou energii soustavy. Jedná se o amfipatické neboli amfifilní molekuly, které jsou složeny ze dvou částí (Obrázek 1a). První částí je hydrofilní hlava tvořena polární skupinou rozpustnou ve vodě. Druhou částí je hydrofobní neboli nepolární chvost, který je tvořen uhlovodíkovým řetězcem. Molekuly se na fázovém rozhraní orientují tak, že jejich hydrofilní hlavičky směřují do polární fáze, zatímco hydrofobní chvost směřuje do fáze nepolární (Obrázek 1b) [1].

Tenzidy se rozdělují do dvou skupin podle jejich schopnosti disociovat ve vodném roztoku. Ionogenní, kam spadají aniontové, kationtové a amfoterní tenzidy a neionogenní. Jak již napovídá z názvu, ionogenní tenzidy vytvářejí ionty po jejich rozpuštění ve vodě. Dochází zde k rozštěpení iontové vazby mezi molekulami a k následnému vytvoření solvatačního obalu okolo iontů. Tvorba solvatačního obalu je způsobena účinkem vody, která je polárním, a tedy dobře solvatujícím prostředím. Neionogenní tenzidy na rozdíl od ionogenních ionty nevytvářejí. Povrchové efekty jsou zde vázány na strukturu celé molekuly [2]. Mezi zástupce ionogenních tenzidů řadíme látky obsahující funkční skupiny $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ nebo amoniové soli. Naopak u zástupců neionogenních jde především o hydroxylové nebo esterové skupiny [1]. Amfoterní tenzidy obsahují jak anion, tak kation. Díky přítomnosti obou iontů je lze kombinovat jak s kationovými, tak s aniontovými tenzidy [3].



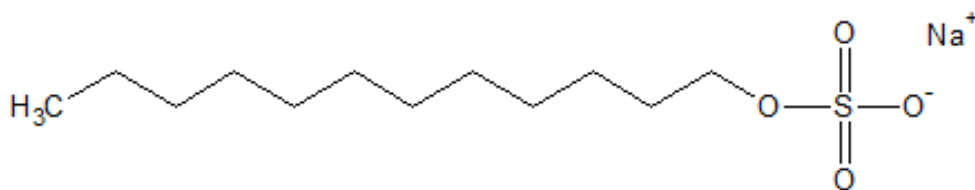
Obrázek 1: a) schéma tenzidu, b) orientace tenzidu ve vodném prostředí.

2.1.1 Aniontové tenzidy

Tato skupina patří mezi nejrozšířenější tenzidy. Jejich disociací vznikají povrchově aktivní anionty. Mezi nejvýznamnější a nejvíce používané aniontové tenzidy řadíme zejména alkalické soli vyšších mastných kyselin (mýdla). Tvoří tedy významnou část toaletních i ostatních mýdel, kromě toho také působí jako odpěňovače. Dále sem patří například soli alkylsulfonových kyselin (umělá mýdla), sulfosukcináty, tauridy nebo sarkosináty [1],[3].

2.1.1.1 SDS

Dodecylsírán sodný je aniontový tenzid, který se díky svým vlastnostem hojně využívá v řadě čistících a hygienických prostředků. Jedná se o sodnou sůl organosulfátu, tvořenou jedním uhlíkovým řetězcem obsahující 12 uhlíkových atomů. Hydrofilní část je tvořena záporně nabitou sulfátovou skupinou (Obrázek 2). Je to tuhá hořlavá látka, toxická při styku s kůží, neřadí se ale mezi karcinogenní látky. Může také způsobovat vážné poranění očí a dýchacích cest [4].



Obrázek 2: Chemická struktura SDS.

2.1.2 Kationtové tenzidy

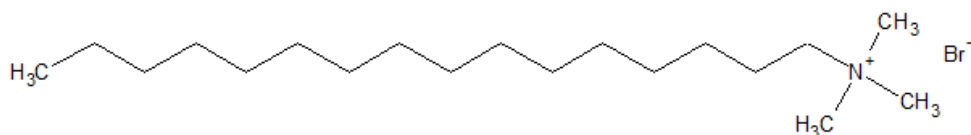
Při disociaci ve vodě tvoří povrchově aktivní kationty [1]. U většiny kationtových tenzidů je kation tvořen kvartérním dusíkovým atomem, tj. jedná se o kvarterní amoniové soli, a to zejména chloridů. Mezi kationtové tenzidy řadíme například i soli alkylaminů. Kvarterní amoniové soli většinou obsahují jeden až tři alkyly. Mají mikrobicidní a avivážní účinky, proto se některé z nich využívají zejména jako antiseptika, působící především proti grampozitivním mikroorganismům. Dále se kationtové tenzidy využívají při přípravě kondicionálních přípravků pro vlasovou kosmetiku [3].

Přítomnost aniontových a kationtových tenzidů ve vodném roztoku způsobuje jejich vzájemné srážení a vytvoření nerozpustné sraženiny tzv. aglomerátu. Tím se ruší jejich antiseptický a emulgační účinek. Pro zachování tohoto účinku se využívají tenzidy, které mají v molekule kromě ionické části i neionickou, která zajišťuje rozpuštění vzniklého aglomerátu ve vodě [3].

2.1.2.1 CTAB

Hexadecyltrimethylamonium bromid, též centrimoniumbromid, se řadí mezi amoniové kvarterní soli. Jeho hydrofobní část je tvořena řetězcem s 16 atomy uhlíku. Hydrofilní hlava je pak tvořena dusíkem a na ni jsou navázány tři methylové zbytky (Obrázek 3). Je to pevná, bílá a slabě zapáchající látka, způsobující podráždění kůže a dýchacích cest [5].

Používá se zejména pro tvorbu pufových roztoků pro extrakci DNA. Další využití můžeme najít jako antiseptické činidlo proti bakteriím a houbám. Významně se také používá při výrobě kondicionérů pro vlasovou kosmetiku [6].

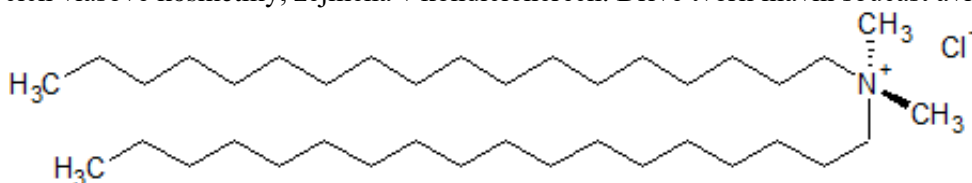


Obrázek 3: Chemická struktura CTAB.

2.1.2.2 DODAC

Dimethyldioktadecylamonium chlorid patří mezi kationtové tenzidy. Jeho hydrofilní hlava je tvořena kladně nabitým atomem dusíku, na který se vážou dva methylové zbytky. Jeho hydrofobní část je na rozdíl od výše zmíněného CTAB tvořena dvěma uhlovodíkovými řetězci, z nichž každý obsahuje 18 atomů uhlíku (Obrázek 4). Jedná se o bílou pevnou látku, téměř nerozpustnou ve vodě [7].

Stejně jako ostatní kladně nabitě tenzidy se využívá zejména v čistících a dezinfekčních prostředcích či ve výrobcích vlasové kosmetiky, zejména v kondicionérech. Dříve tvořil hlavní součást aviváže [7].

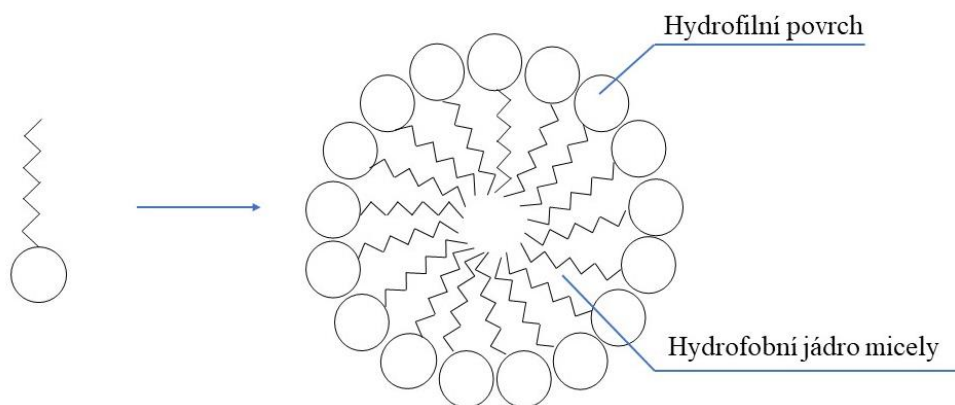


Obrázek 4: Chemická struktura DODAC.

2.1.3 Micely

Ve velmi zředěných roztocích tvoří PAL pravé roztoky. Po dosažení určité koncentrace, zvané kritická molární koncentrace (CMC), dochází k tvorbě agregátů a vniku útvarů koloidních velikostí. Vzniklé

útvary se pak nazývají micely (Obrázek 5) [1]. Ne každá amfipatická molekula je schopna asociovat na micely. Molekuly vyšších alkoholů nebo karboxylových kyselin nejsou natolik hydrofilní, aby způsobily dostatečnou rozpustnost látek s dlouhým hydrofobním řetězcem. V roztoku existují pouze při mnohem nižších koncentracích než koncentrace potřebné k dosažení CMC, a tedy vytvoření micel. Podmínky umožňující vznik micel splňují nejlépe ionogenní tenzidy [8].

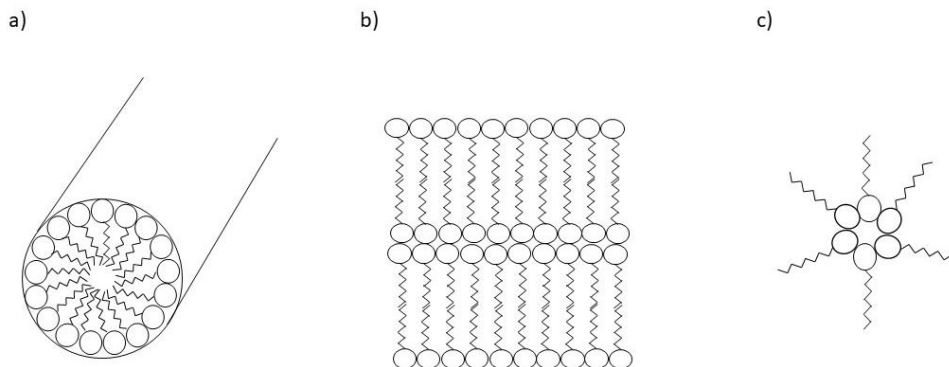


Obrázek 5: Schéma tvorby micely z tenzidu.

Hodnoty CMC se pohybují v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol. l^{-1} . Závisí na mnoha faktorech, které ovlivňují hodnotu CMC. Vyšší hodnoty mají surfaktanty s rozvětvenými uhlíkatými řetězci nebo násobnými vazbami. Klesající hodnota CMC naopak značí rostoucí délku řetězce, přítomnost aromatického jádra nebo přítomnost některých látek, jako jsou například alkoholy se střední délkou řetězce. Ionogenní tenzidy mají hodnoty CMC obecně vyšší než neionogenní [9].

Tvar micel závisí na tvaru molekul surfaktantu a také na její koncentraci. Ve vodných zředěných roztocích se tvoří kulové neboli sférické micely. Tento typ micel je nejčastější. Molekuly PAL se seskupí tak, že jejich uhlovodíkové řetězce jsou spolu vzájemně propojeny a tvoří jádro micely, zatímco jejich polární hlavy směřují ven (Obrázek 5). Koncentrovanější roztoky tvoří micely válcové (tyčové) a laminární (vrstevnaté). S rostoucí koncentrací roztoku roste rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se začínají orientovat spíše rovnoběžně. Kulovité micely se tak mění na válcové (Obrázek 6a). Při ještě větším zvětšování koncentrace se z válcových micel stávají micely laminární (Obrázek 6b). Ty jsou složeny ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny svými uhlovodíkovými řetězci [1],[9].

Existují i tzv. obrácené micely, které vznikají v nevodném neboli nepolárním prostředí. Jejich jádro je tvořeno polárními hlavami, zatímco nepolární uhlovodíkové konce směřují ven (Obrázek 6c) [1].



Obrázek 6: Tvary micel. a) válcové b) laminární c) obrácené.

To, jak budou PAL agregovat, respektive jaký typ micely budou tvořit, určuje tzv. kritický sbalovací parametr (z angl. *packing parameter*) P_c :

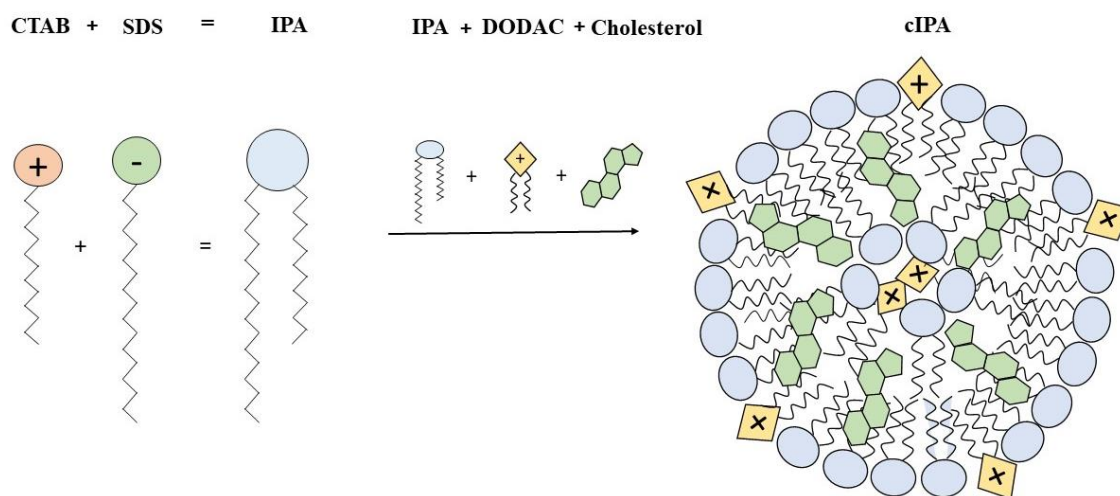
$$P_c = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (2.1)$$

kde v je objem, který zaujímá hydrofobní část řetězce, a_0 je plocha vyhrazena na povrchu micely pro hydrofilní skupinu a l_c je efektivní délka hydrofobního řetězce. Hodnota $P_c \leq 0,33$ značí tvorbu sférických neboli kulových micel, hodnota $0,33 \leq P_c \leq 0,5$ tvorbu cylindrických micel a při hodnotě $0,5 \leq P_c \leq 1$ se budou tvořit útvary zvané vezikuly. Pro hodnoty $P_c > 1$ budou vznikat obrácené micely [10].

2.1.4 Kataniontové vezikulární systémy

Jak již z názvu vyplývá, kataniontové vezikuly jsou tvořeny jak kationtovými, tak aniontovými tenzidy. Díky jejich opačně nabitým iontům spolu interagují na základě elektrostatických interakcí mezi polárními skupinami a vytvářejí tak pseudo-dvouřetězcové struktury (Obrázek 7). Díky této struktuře mohou být považovány za pseudo-dvouřetězcové tenzidy. Tato struktura se také označuje jako iontový amfifilní pár (IPA z angl. *ion pair amphiphile*) [11].

K formaci IPA může docházet několika způsoby. Prvním z nich je metoda iontové výměny. Tato metoda využívá vhodného iontoměniče, který přeměňuje aniontové a kationtové PAL na jejich protonované a hydroxydové formy. Další metoda přípravy je metoda extrakce, kdy se ve vodě smíchá ekvimolární množství opačně nabitých tenzidů a následně pomocí organického rozpouštědla dochází k extrakci. Poslední metodou je metoda precipitační. Zde dochází opět ke smíchání ekvimolárních množství opačně nabitých tenzidů ve vodě jako v předchozím případě. Rozdíl je ale v tom, že poté nedochází k extrakci ale k odstranění protiontů pomocí opakovaného vymývání a centrifugace [11].



Obrázek 7: Vlevo tvorba IPA pomocí kationtového a aniontového tenzidu, vpravo schéma kataniontového vezikulu. Oranžové - kationtové a aniontové tenzidy, modré - DODAC, zelené - cholesterol.

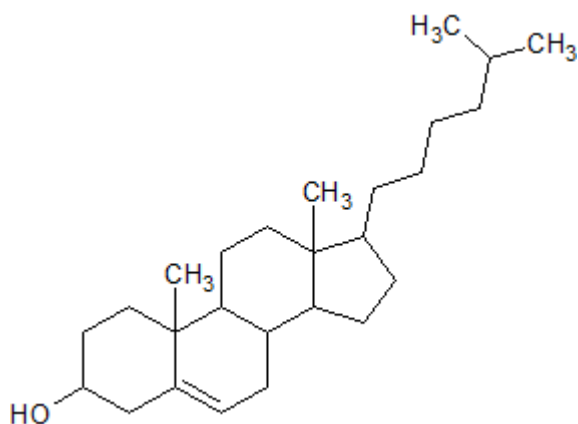
Struktura vezikul se tedy skládá z uzavřené dvojvrstvy, která odděluje vnitřní vodní prostředí od vnějšího (Obrázek 7). Této jejich struktury se využívá zejména ve farmaceutickém průmyslu, kde slouží jako nosiče léčiv. Aktivní molekuly léčiva lipofilní povahy se tak mohou enkapsulovat v membránové dvojvrstvě. Naopak léčiva hydrofilní, jsou zapouzdřeny v jádru vezikuly ve vodném prostředí. Kataniontové vezikuly se pak dále mohou využívat také jako modely pro biologické membrány zejména díky jejich vysoké stabilitě a biokompatibilitě [12]. Kromě farmaceutického průmyslu se ale vezikuly využívají i v technologických oblastech, jako je kosmetický průmysl nebo výroba nano-struktur [13].

Kataniontové vezikuly připravené pouze z čistých iontových amfifilních párů ve vodní fázi vykazují malou stabilitu a mají tendenci agregovat. Proto se k nim přidávají dvou-řetězcové tenzidy, které

zvyšují jejich stabilitu a brání agregaci. Příkladem takového tenzidu je výše zmíněný DODAC. Ten se vmezeří do membrány vezikul a vyztuží ji [11]. Díky DODAC zároveň získají membrány vezikul stejný náboj, budou mezi nimi tak převládat vzájemně odpuzivé síly, které budou bránit jejich agregaci [14]. Kromě samotné přítomnosti dvou-řetězcového tenzidu má také na stabilitu vliv délka jeho uhlovodíkového řetězce. Další možností stabilizace vezikulárních systémů je přidání cholesterolu [15].

2.1.4.1 Cholesterol

Jedná se o látku steroidní povahy, která se běžně vyskytuje v lidském těle. Je důležitou součástí nervů a některých hormonů ale zejména je součástí fosfolipidové dvojvrstvy biologických membrán, kde přispívá k její stabilizaci. Fluidita a permeabilita membrány je tak díky cholesterolu mnohem nižší. Cholesterol je stejně jako tenzidy složen ze dvou částí. Největší část představuje hydrofobní uhlovodíkový řetězec, tvořený několika steroidními kruhy. Druhou poměrně malou částí je polární hydroxylová skupina (Obrázek 8). Díky tomuto složení se cholesterol řadí mezi amfifilní látky. Vzniká jednak biosyntézou z acetyl-koenzymu A ale také je přijímán potravou [16].



Obrázek 8: Chemická struktura cholesterolu.

Zakomponování cholesterolu do membrány kationtových vezikul způsobuje oddálení opačně nabitých skupin tenzidů tvořící membránu. Toto oddálení má za následek snížení elektrostatické přitažlivosti mezi opačně nabitými tenzidy, a tedy zvýšení stability membrány vezikul. Cholesterol zároveň snižuje tendenci protiontů se vázat na nabitý povrch vezikulu, čímž se zvyšuje neuspořádanost a tím také stabilita [14].

Systémy neobsahující cholesterol se mohou nacházet ve dvou fázích, v pevně uspořádané nebo v kapalné neuspořádané fázi. Začleněním cholesterolu dochází k vytvoření fáze nové, a to kapalné uspořádané. Stav, kdy dochází k přeměně z pevného uspořádaného stavu do stavu kapalného neuspořádaného se nazývá fázový přechod. Při teplotách, které jsou nižší, jak teplota fázového přechodu se membrána nachází v pevném uspořádaném stavu. Zvyšováním teploty dochází k přeměně na stav kapalný neuspořádaný. V této fázi jsou teploty vyšší, jak teplota fázového přechodu. S přidávkem cholesterolu dochází k ovlivnění vlastností membrány, jako je fluidita nebo právě teplota fázového přechodu [17].

2.2 Fluorescence

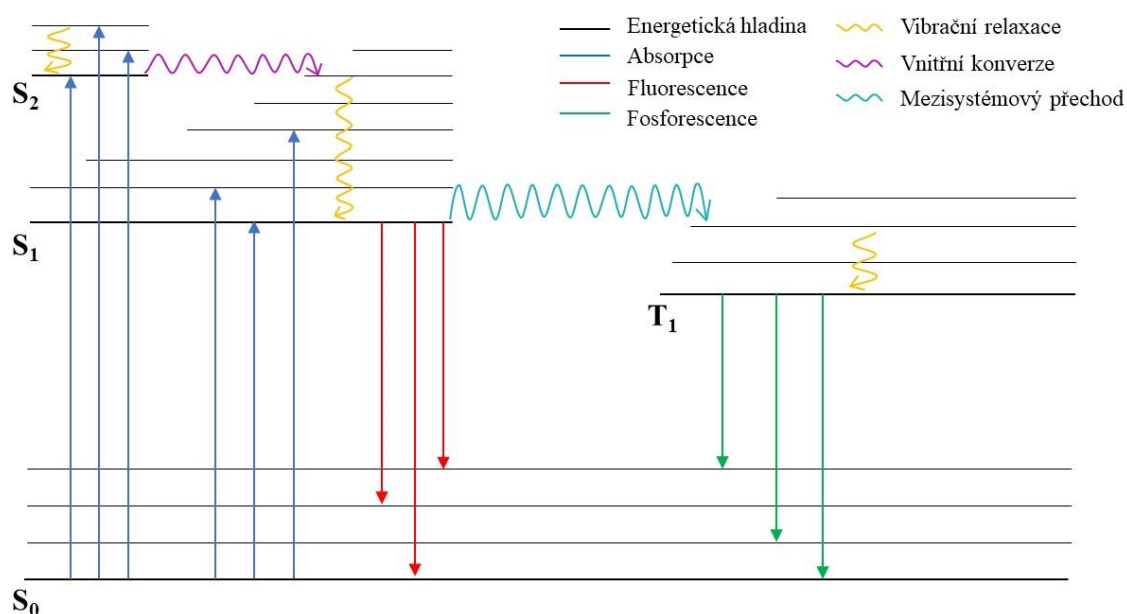
Fluorescence je jedním z luminiscenčních jevů. Konkrétně se jedná o fotoluminiscenci, při které se molekula zbavuje nadbytku energie, poté co pohltí (absorbuje) elektromagnetické záření. K fotoluminiscenčním dějům patří také jev zvaný fosforescence. Mezi nejvýznamnější rozdíl těchto dvou jevů patří zejména doba trvání emise záření. U fluorescence je tato doba mnohem kratší. Tyto procesy znázorňuje Perrin-Jabloňského diagram (Obrázek 9) [18].

Většina molekul se nachází na základní energetické hladině a jejich elektrony se vyskytují v základním singletovém stavu S_0 . Poté, co molekula pohltí světelnou energii určitého kvanta, dojde k excitaci elektronů ze základní energetické hladiny S_0 do některé z vibračních hladin energeticky

vyšších stavů S_1 (resp. S_2). Tento jev se nazývá absorpce. Jedná se o velmi rychlý proces v jednotkách 10^{-15} s. Poté, co je molekula vyexcitována, se vrací zpět na základní energetickou hladinu, přičemž vyzařuje (emituje) energii. Tomuto jevu se říká fluorescence [18].

Kromě fluorescence dochází i k jiným deexcitačním jevům. Jedná se o vnitřní konverzi, vibrační relaxaci a mezisystémový přechod. Vnitřní konverze je děj, při němž dochází k přechodu mezi dvěma elektronickými stavy se stejným spinem ($S_1 \rightarrow S_0$, resp. $S_2 \rightarrow S_1$). U vibrační relaxace dochází k přechodu molekuly na základní hladinu příslušného elektronicky excitovaného stavu. V posledním jevu – mezisystémový přechod, dochází k přechodu ze singletového stavu do tripletového, přičemž dochází k obrácení spinu elektronu. Výše zmíněné děje patří mezi tzv. nezářivé přechody, při nichž sice dochází k uvolnění energie, ale nedochází k emisi záření [18].

Posledním dějem je tzv. fosforescence. Zde po excitaci do singletového stavu S_1 dochází nejprve k přechodu mezi systémy do tripletového stavu T_1 a následně k deexcitaci zpět na základní energetickou hladinu S_0 , přičemž dochází k emisi záření. Na rozdíl od emise fluorescence, která se pohybuje okolo 10^{-9} až 10^{-6} s, je emise fosforescence mnohem delší. Pohybuje se okolo 10^{-4} až 10^2 s. Také má menší energii a intenzitu, tudíž dosahuje větších vlnových délek [18].



Obrázek 9: Schéma Perrin- Jabloňského diagramu.

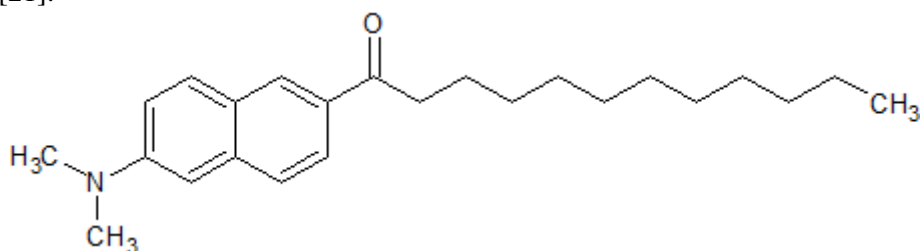
2.2.1 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy spadají pod skupinu látek nazývajících se fluorescenční barviva. Ty se poté dále dělí na dvě skupiny látek - fluorofory a fluorochromy. Fluorofory se pak dále dělí na vnější (vlastní) a vnitřní (nevlastní). Vnitřní fluorofory způsobují vnitřní fluorescenci buněk. Mezi tyto látky řadíme např. proteiny či chlorofyl. Fluorescenční sondy patří naopak mezi fluorofory vnější, proto jsou tedy ke studovanému vzorku přidávány a vážou se na ně pomocí nekovalentních vazeb, přičemž mění své fluorescenční vlastnosti [19].

2.2.1.1 Laurdan

Laurdan (6-Dodecanoyl-2-dimethylaminonafalen) se řadí mezi tzv. solvatochromní sondy. Solvatochromní sondy patří mezi nejstarší a nejrozšířenější membránové sondy. Při excitaci vykazují silné změny jejich dipólových momentů. Interakce dipól-dipól a specifické interakce (vodíkové můstky) těchto sond s jejich prostředím způsobují změnu energie elektronických přechodů sondy, a tím posouvají maxima jejich excitačních a emisních spekter [20].

Laurdan je hojně využívaná fluorescenční sonda zejména pro studium vezikul (Obrázek 10). Díky své citlivosti na polaritu prostředí se používá k detekci a studiu fázových přechodů v membránové dvojvrstvě. Stav, v jakém se membrána vyskytuje, ovlivňuje množství molekul vody nacházejících se v membráně. Jestliže je membrána v tuhém stavu, hydrofobní řetězce jsou uspořádány a hydrofilní hlavy tak mají možnost se více sbalit. Díky tomuto uspořádání se tak počet molekul vody v membráně sníží. V kapalném stavu je tomu naopak. Hydrofobní řetězce jsou tedy neuspořádány, hydrofilní hlavy se nedokážou dostatečně přiblížit a molekuly vody tak mají možnost více proniknout do membrány. Lze tedy říct, že při změně stavu z neuspořádaného na uspořádaný dochází k vypuzení molekul vody z membrány [21].



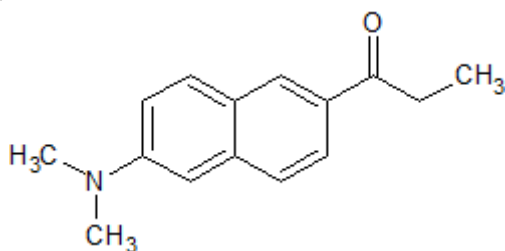
Obrázek 10: Chemická struktura Laurdanu.

Rozdílný stav membrány, a tedy i rozdílný obsah vody v membráně způsobuje posuny emisního spektra. Například v membráně obsahující fosfatidylcholin se jeho emisní maximum liší přibližně o 45 nm v závislosti na fluiditě membrány. Emisní maximum Laurdanu je 435 nm, když je membrána v tuhém stavu, zatímco v tekutém stavu činí tedy 480 nm. Tenhle posun emisního maxima svědčí o změně počtu molekul vody, popřípadě o změně jejich polohy [21].

Typ fosfolipidu, ze kterého je membrána složena, souvisí sice s teplotou fázového přechodu, avšak nesouvisí už s výše zmíněnými spektrálními posuny Laurdanu. Nezávisí tedy na tom, zda jsou polární části molekul kladně či záporně nabitý. Nezávisí také ani na pH prostředí [22].

2.2.1.2 Prodan

Prodan (6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalen) je podobně jako Laurdan velmi citlivá sonda na polaritu prostředí (Obrázek 11) [23]. Fluorescenční emisní maximum Prodanu silně závisí na tom, jaké je jeho okolí. Například v systému složeném z reverzních micel v heptanu s různým obsahem vody, byly pozorovány tři maxima, a to při vlnových délkách 390, 413 a 503 nm [24]. V malých unilamelárních vezikulách SUV (z angl. *small unilamellar vesicles*) byly pozorovány maxima dvě, a to při vlnových délkách 440 nm a 520 nm [25].



Obrázek 11: Chemická struktura Prodanu.

Kvůli rozdílným délkám uhlovodíkového řetězce Laurdanu a Prodanu se tyto dvě sondy významně liší při rozdělení mezi polární prostředí a membránovou dvojvrstvou. Zatímco Laurdan se začleňuje zejména do membránové dvojvrstvy a poskytuje tak fluorescenční signál z membrány, Prodan se rozděluje mezi dvě části – jedna jeho část se stejně jako Laurdan začleňuje do membrány, jeho druhá část ale zůstává na povrchu v polárním prostředí. Tohoto se využívá právě pro studium membrán, kdy Prodan přináší informace zejména z povrchové oblasti membrány, oproti Laurdanu, který je v membráně zakotven o něco hlouběji [23][24].

K tomu, aby se zohlednil příspěvek fluorescence Prodanu i ve vodném prostředí se zavádí metoda třívlňové generalizované polarizace, která umožňuje určit rozdělení sondy mezi dvojvrstvu a vodu [23].

2.2.2 Generalizovaná polarizace

Jak již bylo zmíněno výše, emisní maxima Laurdanu i Prodanu ve dvojvrstvě jsou závislá na stavu, ve kterém se membrána nachází. V gelovém stavu membrány je emisní maximum okolo 440 nm. Ve stavu tekutého krystalu se emisní maximum zvyšuje na zhruba 490 nm. Při zvýšení teploty nad teplotu fázového přechodu, tedy teploty, kdy se mění stav membrány z pevného uspořádaného na kapalný neuspořádaný, dochází k posunu emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Tento posun emisního spektra je připisován procesu zvanému dipolární relaxace [26].

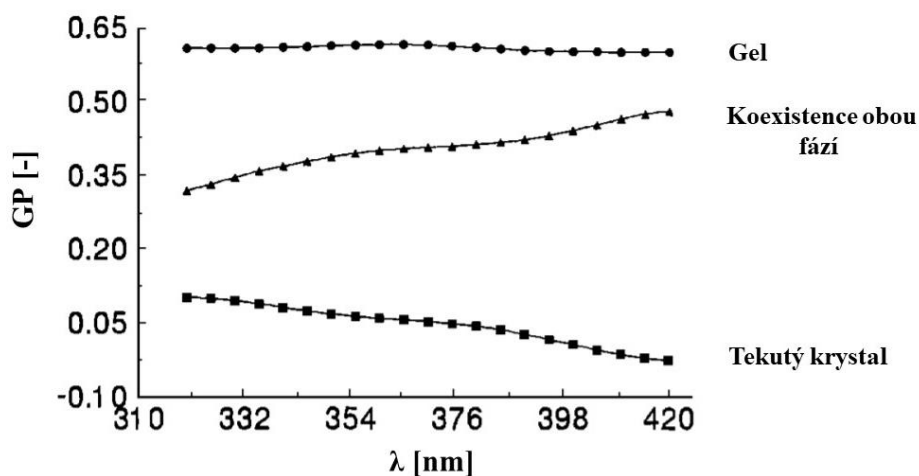
U obou sond se nachází tzv. dipólový moment, který je způsoben rozdělením parciálních nábojů mezi dvě oblasti, a to mezi jejich 2-dimethylamino a 6-karbonylovou část. Tento dipólový moment se při excitaci zvyšuje a může způsobit přeorientování dipólů rozpouštědla. Energie, která je potřebná k reorientaci rozpouštědla, snižuje energii excitačního stavu sondy, a tím dochází k posunu jejího emisního spektra. K takovému posunu k vyšším vlnovým délkám dochází pouze u polárních rozpouštědel. Čím je rozpouštědlo polárnější, tím větší posun bude. Například emisní maximum pro Laurdan v dodekanu je 380 nm, v dimethylsulfoxidu 460 nm a v methanolu 490 nm [26].

Pro kvantitativní měření toho, zda jsou molekuly Laurdanu (popř. Prodanu) obklopeny více gelovou fází nebo fází tekutou, se zavedla funkce zvaná dvou vlnová generalizovaná polarizace (2wGP). S tím, v jakém stavu (fázi) se nachází membrána, souvisí i její polarita. Proto lze říct, že pomocí GP se také kvantitativně zjišťuje polarita membrány [27]. Pro výpočet 2wGP existuje následující vzorec:

$$2wGP = \frac{I_g - I_l}{I_g + I_l} \quad (2.2)$$

kde I_g je intenzita při maximální emisní vlnové délce ve stavu pevném uspořádaném a I_l je intenzita maximální emisní vlnové délky ve stavu tekutém neuspořádaném. Z hodnot GP lze tedy poznat, v jakém stavu se membrána nachází.

Jestli-že sledujeme závislost GP na vlnové délce a hodnoty GP zůstávají konstantní, pak se membrána nachází ve stavu pevném. Naopak pro stav kapalný hodnoty GP rovnoměrně klesají. Membrána se však nemusí nacházet pouze ve stavu pevném nebo ve stavu tekutém. Tyto dvě fáze spolu mohou koexistovat. Pro tento případ koexistence obou fází, hodnoty GP rovnoměrně stoupají. Příklady znázorněných dějů můžeme vidět v následujícím grafu (Obrázek 12) [26].



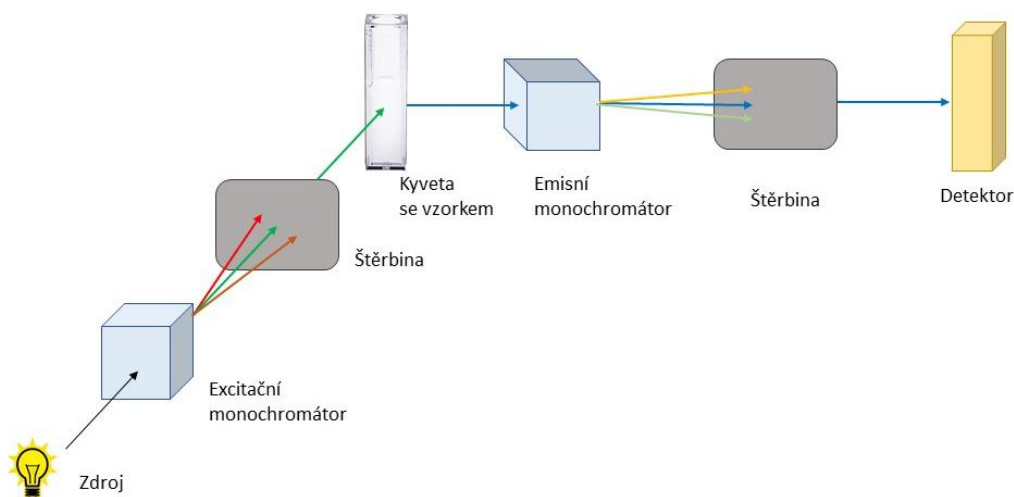
Obrázek 12: Hodnoty GP pro jednotlivé stavy membrány při různých excitačních vlnových délkách [26].

Obecně jsou hodnoty GP limitovány hodnotami -1 a +1. Limitní hodnota +1 značí pevný uspořádaný stav membrány, která není solvatována, naopak hodnota -1 značí kapalný neuspořádaný stav při úplné solvataci. Hodnoty GP tedy nejsou nižší jak -1 ale zároveň nejsou vyšší jak +1, což můžeme opět vidět i na předchozím grafu (Obrázek 12) [28].

Jak již ale bylo zmíněno, Prodan má oproti Laurdanu mnohem kratší uhlovodíkový řetězec a rozděluje se tedy do dvou prostředí, a to do membránového a do vodného [23]. Dvou vlnová generalizovaná polarizace (2wGP) sice umožňuje kvantitativní charakterizaci membránové polarity, nicméně pro získání hodnot emise pouze z membránového prostoru, se zde zavádí metoda třívlňové generalizované polarizace (3wGP). Ta umožňuje odečtení emise Prodanu z vodného prostředí od membránového, a tak získání hodnot emise pouze z membrány [27].

2.2.3 Instrumentace

K měření fluorescence se využívají zejména spektrofluorimetry (Obrázek 13). Typické je pravoúhlé geometrické uspořádání, kde excitační paprsek dopadající na vzorek je v pravém úhlu s paprskem, který ze vzorku vychází. Mezi základní prvky každého spektrofluorimetru patří zdroj záření, monochromátor, cela s kyvetou se vzorkem a detektor. Jako zdroje fluorescence jsou využívány zdroje s vyšší intenzitou vyzařování, mezi které patří zejména xenonové výbojky. U moderních fluorimetrů jsou to pak elektronicky řízené pulsní xenonové lampy, které se využívají zejména u vzorků nestabilních na světle a díky pulsům tak dochází k ovlivnění tzv. fotovybělení. Výhodou je také možnost detekce zpožděné fluorescence. U spektrofluorimetru se dále využívá dvojice monochromátorů (emisní a excitační). Zde je možná regulace šířky vstupní štěrbinu, což umožňuje optimalizovat intenzitu signálu. V dnešní době se používají zejména mřížkové monochromátory, osazené konkávními mřížkami, které fungují současně jako kolimátory záření. Díky takovému uspořádání není již nutné kolimovat záření pomocí kolimačních zrcadel. Jako detektory se hojně využívají fotonásobiče. Stejně jako monochromátory, i detektory rozlišujeme dva. Referenční, který koreluje excitační spektrum a detekční k detekci emise. Vzorkovací prostor je většinou tvořen kyvetou, která má všechny čtyři strany čiré. Někdy se místo kyvet mohou využívat také tenké trubice zvané kapiláry. Pro regulaci teploty se také využívají termostatované držáky kyvet. U některých fluorimetrů se také mohou využívat tzv. polarizátory, které umožňují detekovat polarizovanou fluorescenci [29]. Nicméně u metody generalizované polarizace se však polarizátory nevyužívají, ač může být název zavádějící [26].



Obrázek 13: Schéma spektrofluorimetru.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Příprava a stabilita kataniontových vezikul

Chin-Jung Wu a kol. studovali přípravu a stabilitu kataniontových vezikul v závislosti na koncentraci kladně nabitého dvou-řetězcového tenzidu a na délce uhlovodíkového řetězce. Jako kationtový tenzid zde byl použit CTAB (hexadecyltrimethylamonium bromid) a jako aniontový tenzid SDS (dodecylsírán sodný). Pro zlepšení stability vezikul byl k systému CTA-DS (IPA) přidán různě dlouhý kladně nabitý dvou-řetězcový tenzid (DXDAB): DTDAB (ditetradecyldimethylamonium bromid), DHDAB (dihexadecyldimethylamonium bromid) a DODAB (dioktadecyldimethylamonium bromid). Pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS) byla sledována velikost a také zeta potenciál vzniklých vezikul. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací byla taktéž využita. Nejdříve byla sledována stabilita v závislosti na koncentraci DXDAB. Při koncentraci $X_{DXDAB} < 0,3$ byly vzniklé CTA-DS/DXDAB systémy velmi nestabilní. Po zvýšení koncentrace na $0,3 \leq X_{DXDAB} \leq 0,5$ již systémy vykazovaly značnou stabilitu. U systémů, které obsahovaly DHDAB a DODAB byla při koncentracích $X_{DXDAB} = 0,4$ a $0,5$ zjištěna přítomnost vezikul s velikostí větší jak 3 000 nm a u systému DODAB i přítomnost vezikul s velikostí menší jak 10 nm. Nicméně tyto vzniklé systémy měly zanedbatelný vliv na stabilitu systému. Při zvyšování koncentrace DXDAB by tak mohla stabilita systému stoupat. Dále byl sledován zeta potenciál, který v závislosti na koncentraci DXDAB zůstal konstantní na hodnotě přibližně 55 mV. Ze získaných hodnot je tedy patrné, že vzájemné elektrostatické odpuzování vezikul není hlavním faktorem pro zlepšení stability vezikul. Dále bylo zjištěno, že systémy obsahující DHDAB a DODAB při koncentraci $X_{DXDAB} > 0,3$ vykazují také vysokou stabilitu. Tyto systémy se vyznačují delším uhlovodíkovým řetězcem, proto lze říct, že stabilita vezikul dále závisí na délce uhlovodíkového řetězce [30].

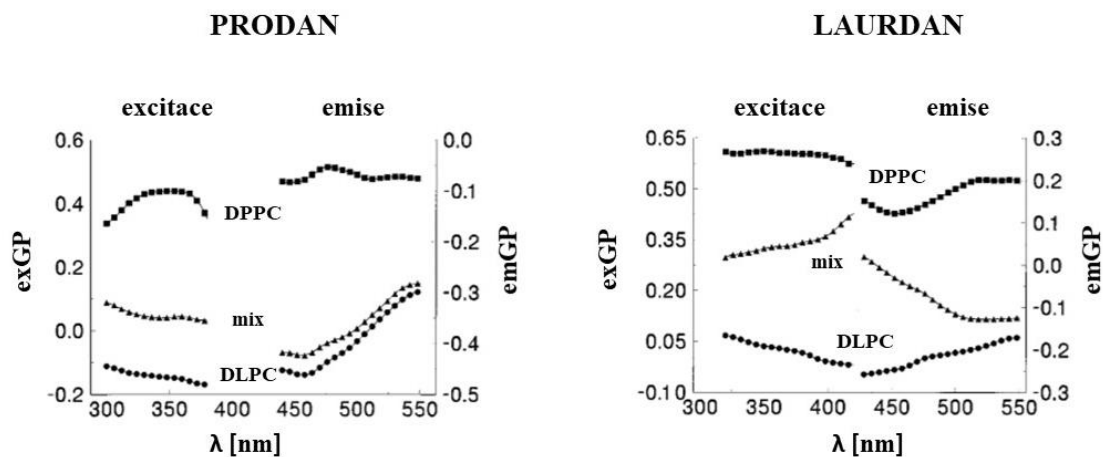
Studie **An-Tsung Kuo a kol.** zkoumala vliv cholesterolu na kladně nabitě kataniontové vezikuly. Jako IPA zde byl opět použit systém HTMA-DS jako v předchozím případě a jako dvou-řetězcový tenzid DTDAB. Se zvyšujícím přídatkem cholesterolu se zvyšovala hodnota zeta potenciálu. Toto zjištění poukazuje na to, že s přídatkem cholesterolu se zvyšuje elektrostatické odpuzování vezikul, což naznačuje jejich zvýšenou stabilitu. Kromě koncentrace cholesterolu byl také sledován vliv poměru koncentrací IPA/DTDAB (konkrétně 5/5, 7/3 a 9/1). Zde bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací DTDAB se podobně jako u cholesterolu, zvyšuje hodnota zeta potenciálu. Z následující tabulky (Tabulka 1) je patrné, že systém je nejstabilnější při koncentraci cholesterolu $X_{chol} = 0,43$ při poměru koncentrací IPA/DTDAB 9/1, resp. 7/3. Naopak nejméně stabilní systém je při poměru IPA/DTDAB 1/9 při koncentraci cholesterolu $X_{chol} = 0,10$ resp. 0,20 [14].

Tabulka 1: Hodnoty průměrné velikosti, polydisperzního indexu, zeta potenciálu a doby stability v závislosti na poměru koncentrací IPA/DTDAB a na koncentraci cholesterolu [14].

Vezikulární systém s různou X_{chol}	Průměrná velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]	Doba stability [den]
IPA/DTDAB = 9/1				
0	-	-	44	0
0.10	60 ± 5	0.239 ± 0.015	47 ± 2	2 ± 1
0.30	80 ± 15	0.252 ± 0.032	56 ± 1	4 ± 2
0.43	105 ± 8	0.277 ± 0.010	60 ± 2	>270
IPA/DTDAB = 7/3				
0	91 ± 6	0.096 ± 0.001	49 ± 3	20 ± 6
0.10	62 ± 5	0.115 ± 0.001	52 ± 1	95 ± 49
0.30	60 ± 2	0.192 ± 0.039	51 ± 1	147 ± 47
0.43	82 ± 5	0.215 ± 0.019	66 ± 2	>270
IPA/DTDAB = 5/5				
0	114 ± 10	0.121 ± 0.001	45 ± 1	96 ± 22
0.10	78 ± 13	0.124 ± 0.001	52 ± 1	94 ± 40
0.30	58 ± 2	0.158 ± 0.014	53 ± 1	41 ± 1
0.43	78 ± 11	0.223 ± 0.019	75 ± 6	167 ± 37

3.2 Studium fosfolipidových vezikul pomocí fluorescenčních technik

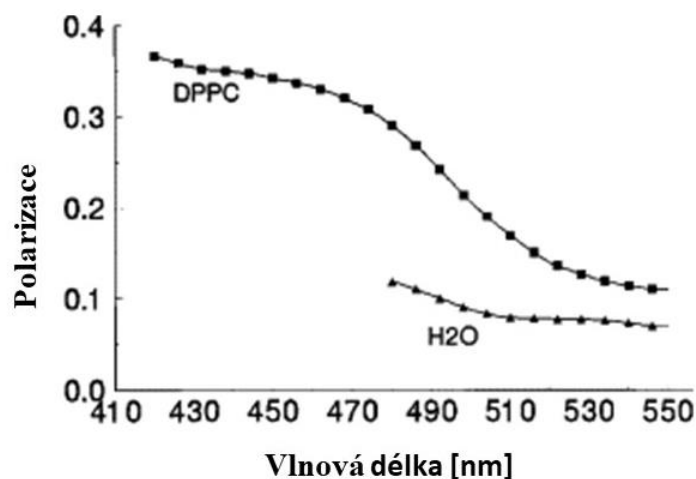
Ewa K. Krasnowska a kol. studovali fluorescenční spektra Prodanu a Laurdanu v závislosti na různých stavech membrány. Jako fosfolipidy byly vybrány DPPC jako gelový stav membrány a fosfolipidy DLPC jako tekutý stav membrány. Dále bylo použito ekvimolární množství obou fosfolipidů. Díky rozdílné délce uhlovodíkových řetězců obou sond a jejich různé afinitě k membráně, jsou lokalizovány v různých místech membrány a mohou se tak lišit svými fluorescenčními vlastnostmi. Nejprve byly sledovány excitační a emisní GP spektra Prodanu i Laurdanu (Obrázek 14).



Obrázek 14: Emisní a excitační GP spektra při 25 °C pro Prodan a Laurdan [23].

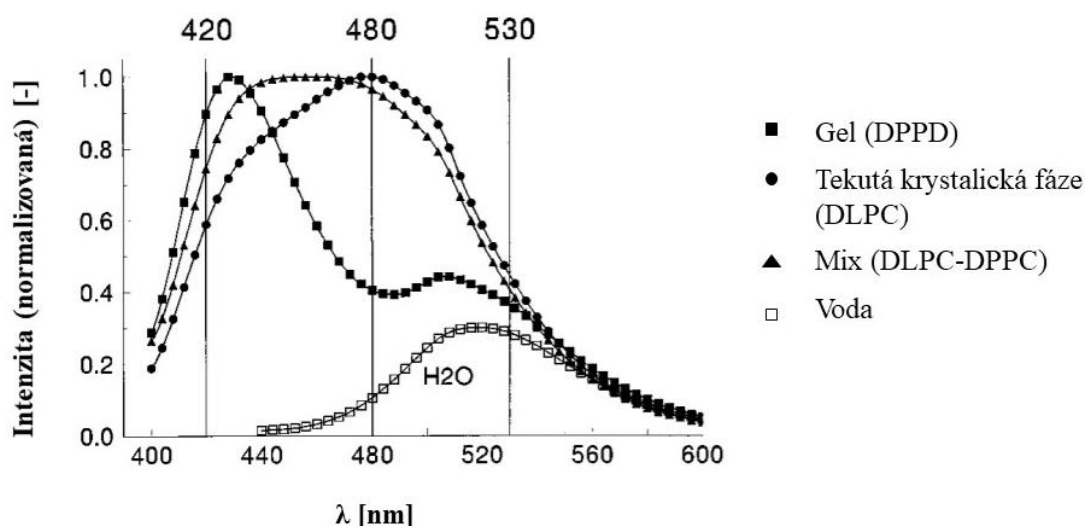
U tekuté krystalické fáze (DLPC) ukázaly jak excitační, tak emisní GP spektra Prodanu velmi podobnou závislost na vlnové délce jak u Laurdanu. Hodnoty GP tedy klesaly se zvyšující se excitační vlnovou délkou a zvyšovaly s emisní vlnovou délkou. U gelové fáze (DPPC) se již spektra pro obě sondy lišila. U excitačního spektra Prodanu hodnoty GP nejprve rostly se zvyšující se vlnovou délkou a následně klesaly. U emisního spektra nebyla pozorována žádná průměrná závislost na vlnové délce. Při koexistenci obou fází DLPC-DPPC (mix) ukázala obě Prodanová spektra velmi podobnou závislost jako u DLPC. Tyto zjištění naznačují, že při rozdělení sondy mezi dvě prostředí by Prodan preferoval tekutou fázi před gelovou.

Dále byla vypočtena polarizace fluoresce Prodanu pomocí emisních spekter, a to v DPPC a následně ve vodě. Ze získaných dat, které můžeme vidět na Obrázku 15 je patrné, že se zvyšující se emisní vlnovou délkou klesá hodnota polarizace. U systému DPPC po dosažení vlnových délek větších jak 470 nm nastává prudký pokles polarizace a hodnoty se začínají přibližovat hodnotám polarizace naměřených ve vodě.



Obrázek 15: Polarizační spektrum emise Prodanu ve vezikulách a ve vodě při teplotě 10 °C [23].

Pro získání emise fluoresce Prodanu ve vodě a GP hodnot v membráně byla využita metoda tří vlnové generalizované polarizace (3wGP). Pro měření intenzity emise byly vybrány tři vlnové délky tak, aby se co nejvíce maximalizovalo oddělení příspěvků emise z různých prostředí. Emisní spektra Prodanu v různých fázích můžeme vidět v následujícím grafu (Obrázek 16). Vybrané vlnové délky tedy byly následující: $I_1=420$ nm, $I_2=480$ nm a $I_3 = 530$ nm.



Obrázek 16: Normalizovaná emisní spektra Prodanu pro různé fáze [23].

Pro výpočet 3wGP zde byl využit následující vzorec:

$$3wGP = \frac{R_{I_2} - 1}{R_{I_2} + 1'} \quad (3.1)$$

kde

$$R_{12} = \frac{I_1 \cdot k_{32}}{I_2 \cdot k_{32} - I_3 + I_3 R_{31}}, \quad (3.2)$$

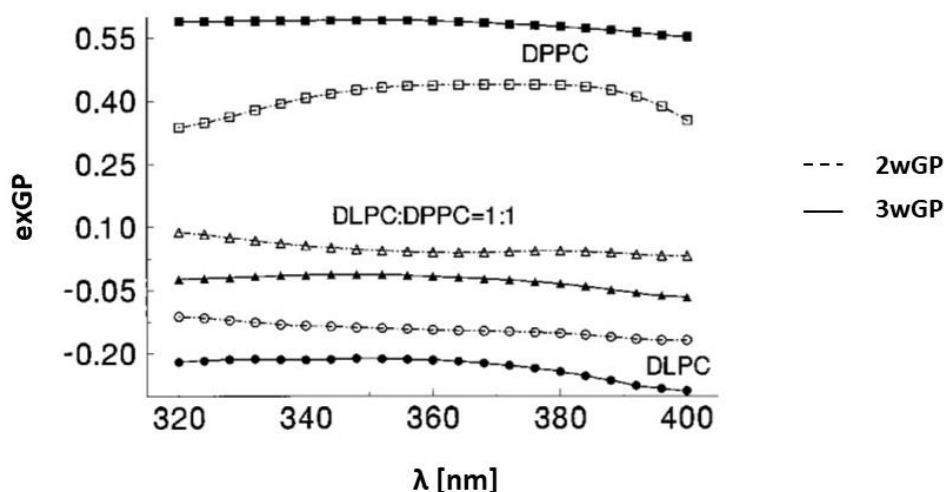
a kde

$$k_{32} = \frac{I_{3W}}{I_{2W}}, \quad (3.3)$$

a

$$R_{31} = \frac{I_{3M}}{I_{1M}}. \quad (3.4)$$

Následně byly porovnány excitační spektra Prodanu z 2wGP a 3wGP pro různé fáze (Obrázek 17). Pro všechny vzorky bylo měření provedeno při 25 °C. Žádný zásadní rozdíl není pozorovaný pro fáze tekutého krystalu (DLPC) ani pro koexistenci dvou fází (DLPC-DPPC) při porovnání hodnot z 2wGP a 3wGP. Naopak u gelové fáze (DPPC) je rozdíl již patrný. U 3wGP je pozorováno lineární chování v závislosti na vlnové délce oproti 2wGP.



Obrázek 17: Excitační spektra Prodanu pro 2wGP a 3wGP pro různé fáze [23].

Pro potvrzení toho, že se Prodan rozděluje více mezi tekutou fází než gelovou, byl vypočítán rozdělovací koeficient (C_p) pro jednotlivé fáze. Hodnoty můžeme vidět v Tabulce 2.

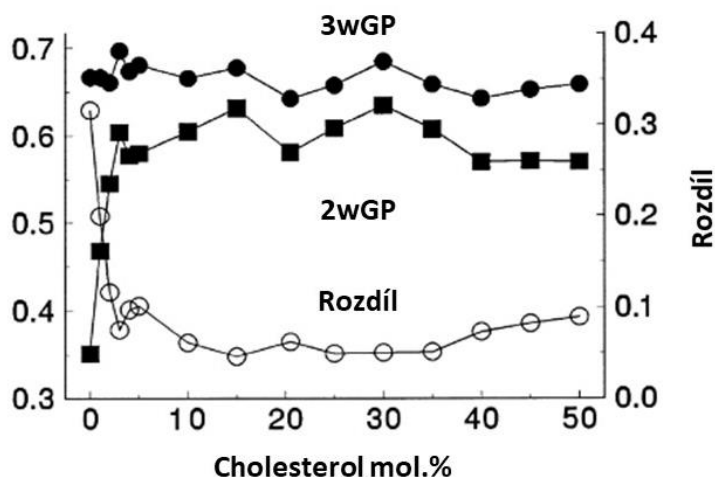
Tabulka 2: Rozdělovací koeficient pro jednotlivé fáze [23].

Fáze	C_p [10^4]
DPPC	14
DLPC	505
DLPC-DPPC (1:1)	221

Z tabulky je patrné, že rozdělení Prodanu mezi DLPC a vodu je asi 36krát větší než jeho rozdělení mezi DPPC a vodu, což tedy potvrzuje předchozí výsledky [23].

Další studie **Ewa K. Krasnowska a kol.** se zabývali studiem vlastností membrány obsahující cholesterol pomocí fluorescence. Jako fluorescenční sonda byl využit Prodan. Ten se, jak již bylo dokázáno v předchozí studii, díky své struktuře nenachází pouze v membráně, ale částečně se rozděluje i do vodného prostředí. Díky tomu byla ke studii vybrána metoda tří vlnové generalizované polarizace

(3wGP), která umožňuje rozlišení spekter pro obě prostředí. Pro tuto metodu byly opět vybrány tři vlnové délky jako v předchozím případě, tedy $I_1=420\text{ nm}$, $I_2=480\text{ nm}$, $I_3=530\text{ nm}$, ve kterých byla měřena intenzita fluorescence. Fosfolipidové vezikuly byly trojího typu, opět stejné jako v předchozí studii. První tedy byly složeny pouze z DLPC, druhé z DPPC a třetí byly složeny smícháním ekvimolárního množství dvou předchozích. Ze všech systémů byly získány emisní spektra jak v přítomnosti cholesterolu, tak při absenci. Bylo zjištěno, že v systému obsahující DPPC již při přítomnosti 1 mol. % cholesterolu, se emise v červené oblasti výrazně snížila a při 3 mol. % již byla sotva detekovatelná. U systémů, které obsahovaly více jak 3 mol. % cholesterolu, již detekce prodanových molekul ve vodě nebyla vůbec zjistitelná. Při porovnání dat z 2wGP s daty z 3wGP byly zjištěny značné rozdíly při koncentraci cholesterolu od 0 do 3 mol. %.



Obrázek 18: Hodnoty 2wGP a 3wGP v závislosti na koncentraci cholesterolu [27].

Z grafu je patrné (Obrázek 18), že hodnoty pro 2wGP se rapidně zvýšily při koncentraci cholesterolu 0 až 3 mol %, naopak hodnoty pro 3wGP zůstávaly konstantní. Nad koncentrací 3 mol. % cholesterolu již byly hodnoty pro obě metody konstantní, nicméně hodnoty 2wGP zůstávaly nižší jak pro 3wGP. Tyto data naznačují, že i při více jak 3 mol. % cholesterolu jsou stále Prodanové molekuly přítomny ve vodném prostředí, a tedy nutnost využití metody 3wGP pro studium fluorescence Prodanové sondy [27].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Dodecylsírán sodný

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

Hexadecyltrimethylamonium bromid

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

Dimethyldioctadecylamonium chlorid

$M_w=686,50$ g/mol, CAS: 107-64-2, Sigma Aldrich

Cholesterol

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

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

Prodan

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

Laurdan

$M_w=353,54$ g/mol, CAS: 74515-25-6, Sigma Aldrich

Deionizovaná voda

System ELGA

4.2 Shrnutí cílů práce

Tato práce navazuje na mezinárodní projekt GAČR 19-14024J s National Cheng Kung University na Taiwanu. Cílem práce bylo sledovat hydratační obal kladně nabitých vezikulárních systémů, a tedy zjistit množství molekul vody v okolí při různých stavech membrány. Ke studiu systémů byly vybrány celkem tři různé koncentrace cholesterolu, a to 20, 40 a 60 mol. %. Studium bylo provedeno pomocí měření emise fluorescence v závislosti na rostoucí teplotě. Jako fluorescenční sondy byly vybrány Laurdan a Prodan. Obě sondy mají velmi podobnou stavbu molekuly s tím rozdílem, že sonda Laurdan má delší uhlovodíkový řetězec, jak Prodan. Díky tomuto uspořádání se Laurdan začleňuje do membrány mnohem hlouběji, oproti Prodanu, který zůstává více na povrchu. Jako vyhodnocovací metoda byla vybrána metoda generalizované polarizace. Pro Laurdan byla postačující metoda dvou vlnové GP, která zahrnuje příspěvky pouze z membránového prostředí. Pro Prodan, který vykazuje fluorescenci jak v membránovém, tak i ve vodném prostředí již muselo dojít k modifikaci této metody, aby byl zahrnut

i příspěvek z vodného prostředí. Proto pro výpočet Prodanu byla využita metoda tří vlnové GP. Pro měření byla využita spektrofluorimetrie. Závěrem práce je porovnání obou sond Laurdanu a Prodanu.

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava IPA

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky tenzidů CTAB a SDS. Roztoky byly připraveny navážením příslušného množství tak, aby výsledný objem činil 500 ml a výsledná koncentrace 20 mM. Takto připravené roztoky se nechaly míchat po dobu 24 hodin. Následně byly roztoky tenzidů smíchány v poměru 1:1 a opět míchány po dobu dalších 24 hodin při teplotě 30 °C. Po ukončení míchání byla vzniklá sraženina centrifugována po dobu 10 minut při 3500 ot/min a následně filtrována za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku. Vzniklý prášek IPA v podobě filtračního koláče byl dán do sušárny a sušen po dobu 3 dní při teplotě 50 °C. Takto připravený prášek IPA byl ponechán v suché zaparafilmované vialce.

4.3.2 Příprava cIPA + cholesterol

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky IPA v chloroformu a DODAC v chloroformu. Z připravených roztoků se odpipetoval takový objem, aby bylo dodrženo jejich smíchání v požadovaném poměru, tj. 9:1. Následně bylo do suché pyrexky naváženo takové množství cholesterolu, aby výsledný roztok obsahoval 20, 40 a 60 mol. % cholesterolu. K němu byl přidán objem zásobního roztoku IPA a DODAC v požadovaném poměru. Takto připravený chloroformový roztok byl zvortexován a následně k němu byly přidány skleněné kuličky. Poté bylo vše opět zvortexováno a chloroformová fáze se nechala odpařit do druhého dne. V průběhu docházelo k promíchání. Po odpaření chloroformové fáze došlo k vytvoření tenkého filmu na kuličkách, který byl rehydratován 60 ml deionizované vody. Následně bylo vše opět zvortexováno a poté sonifikováno tyčovým dispergátorem při 50 % amplitudě do dosažení požadované energie 25 kJ.

4.3.3 Příprava vzorků na solubilizaci

Ihned po sonifikaci byly nejprve připraveny vzorky pro měření emise Prodanu a Laurdanu ve vezikulách. Do dvou suchých vialek bylo napipetováno vždy po 4 ml připravených cIPA s požadovanou koncentrací cholesterolu. Následně se ke vzorkům přidaly fluorescenční sondy. Do první vialky byla přidána fluorescenční sonda Laurdan (v acetonu), do druhé Prodan (v acetonu). Objem sondy byl vypočten tak, aby výsledná koncentrace sondy činila 10^{-6} M a výsledný objem vzorku byl 4 ml. Všechny vzorky byly připraveny tímto způsobem celkem třikrát. Připravené vzorky se zavíčkovaly a nechaly zvortexovat. Poté bylo víčko odstraněno a vzorky se nechaly stát po dobu 5 minut, aby došlo k odpaření acetonu. Po uběhnutí 5 minut se vzorky opět zavíčkovaly a byly dány do sušárny, kde byly ponechány po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C za současného třepání.

Následně byly připraveny vzorky pro měření emise Prodanu ve vodě obdobným způsobem. Do vialek byly napipetovány 4 ml deionizované vody místo cIPA s cholesterolem. Následně byla opět přidána fluorescenční sonda Prodan a dále již byl postup stejný jako v předchozím případě s tím rozdílem, že takto připravené vzorky již nemusely být ponechány v sušárně, ale byly dány pouze do digestoře, kde byly opět ponechány po dobu 24 hodin za současného třepání. I zde byly vzorky připraveny celkem třikrát.

4.3.4 Spektrofluorimetrie

Všechny připravené vzorky byly následně proměřeny na spektrofluorimetru Edinburgh Instruments FS5. Vzorky obsahující 20 a 60 mol. % cholesterolu byly před samotným měřením sonifikovány ve vodní lázni při teplotě 70 °C do odkalení. Vzorky obsahující 40 mol. % cholesterolu nemusely být sonifikaci podrobeny. Odkalené vzorky byly následně dány do křemenné kyvety a umístěny do měrné cely spektrofluorimetru. Jako měrná cela byla použita SC-25 pro teplotní skeny. Zdrojem záření zde byla využita xenonová lampa. Následně byly pomocí programu Fluoracle změřeny emisní spektra pro teplotu v rozmezí 10 až 80 °C. Pro měření Laurdanu byla nastavena maximální excitační vlnová délka

na 350 nm a maximální emisní vlnová délka 480 nm. Sken byl proveden v rozmezí vlnových délek 400 až 550 nm. Pro měření Prodanu ve vezikulách byla nastavena maximální excitační vlnová délka na hodnotu 380 nm a maximální emisní vlnová délka na 430 nm a sken byl proveden v rozmezí 400 až 600 nm. Posledním měřením byl Prodan ve vodě. Zde byla nastavena maximální excitační délka 380 nm a maximální emisní vlnová délka 520 nm. Sken byl jako v předchozím případě proveden v rozmezí vlnových délek 400 až 600 nm. Pro všechny měření byla volena šířka štěrbin tak, aby intenzita fluorescence byla optimální. Po celou dobu měření byly všechny vzorky promíchávány.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Příprava IPA

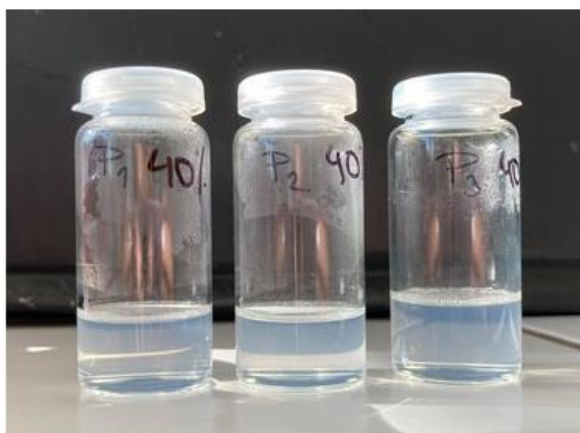
Roztoky tenzidů CTAB a SDS byly po ponechání 24 hodin za současného míchání čiré. Po jejich následném smíchání se objevil bílý zákal, který se po dalším míchání po dobu 24 hodin proměnil v bílou sraženinu. Vzniklá sraženina byla po centrifugaci a následné filtraci ponechána v sušárně po dobu 3 dní a následně byla zvážena. Výtěžek prášku IPA činil 2,1008 g.

5.2 Příprava cIPA + cholesterol

Po odpaření chloroformové fáze a po rehydrataci, byly všechny vzorky zakaleny. Následovala sonifikace pomocí tyčového dispergátoru při 50 % amplitudě (model HD 3 200, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG). Po dosažení požadované energie 25 kJ byly vzorky obsahující 20 a 40 mol. % cholesterolu již bez zákalu a vykazovaly opalescenci. Vzorky obsahující 60 mol. % cholesterolu byly i po sonifikaci stále mírně zakaleny. Po přidání příslušné fluorescenční sondy a po ponechání vzorků v sušárně po dobu 24 hodin za současného míchání byly vzorky obsahující 20 a 60 mol. % cholesterolu opět zakaleny a byly následně opět podrobeny sonifikaci ve vodní lázni. U vzorku obsahujícího 20 mol. % cholesterolu došlo opět k téměř úplnému vymizení zákalu (Obrázek 19), nicméně u vzorku obsahující 60 mol. % cholesterolu zákal opět zcela nevymizel. U vzorků obsahujících 40 mol. % cholesterolu se ani po 24 hodinách zákal neobjevil (Obrázek 20).



Obrázek 19: Vzorky Prodanu obsahující 20 mol. % cholesterol. Vlevo před sonifikací pomocí vodní lázně, vpravo po sonifikaci.



Obrázek 20: Vzorky Prodanu obsahující 40 mol.% cholesterolu po 24 hodinách od sonifikace pomocí tyčového dispergátoru.

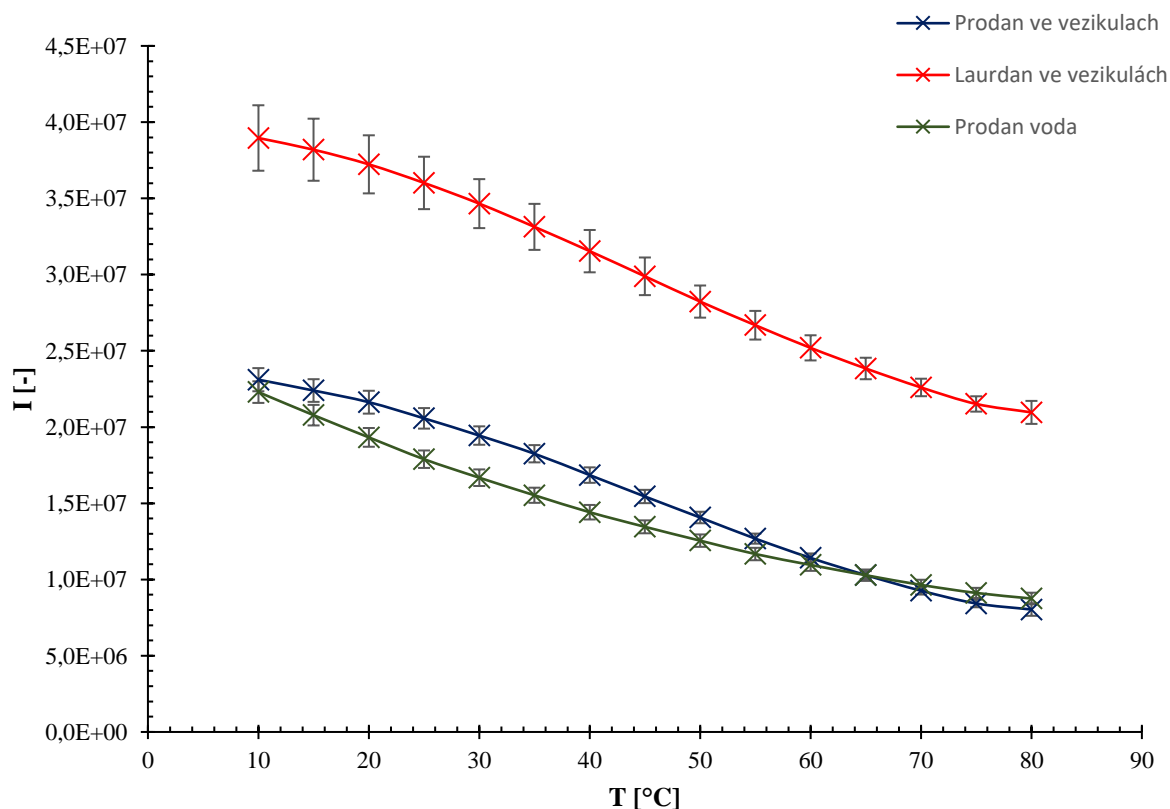
Vzorky připravené smícháním deionizované vody a fluorescenční sondy Prodan byly zcela čiré. Ukázky vzorků obsahující Prodan s 60 mol. % cholesterolu a Prodan v deionizované vodě jsou uvedeny v kapitole 9.1 v Příloze.

5.3 Emisní spektra a intenzita fluorescence

U všech vzorků byla proměřena emisní spektra v závislosti na teplotě. Teplotní rozsah měření byl od 10 do 80 °C. U vzorků, které obsahovaly fluorescenční sondu jak Laurdan, tak Prodan ve vezikulách, docházelo s rostoucí teplotou k posunu spekter k delším vlnovým délkám. Naopak u vzorku obsahující fluorescenční sondu Prodan v deionizované se spektrum s rostoucí teplotou neposouvalo k delším ani kratším vlnovým délkám ale zůstávalo stejné, pouze se měnila intenzita. Ukázky emisních spekter pro vzorky obsahující 40 mol. % cholesterolu a Prodan v deionizované vodě jsou uvedeny v kapitole 9.2 v Příloze.

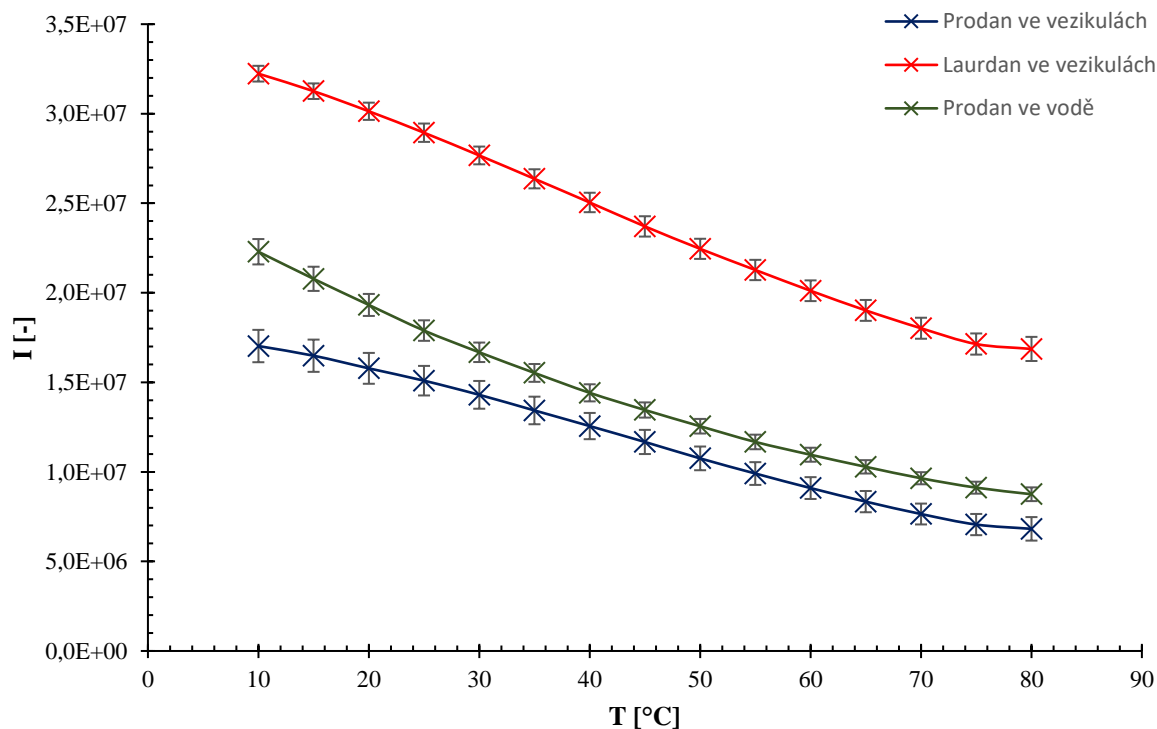
Dále byla sledována intenzita fluorescence. Hodnoty intenzit byly vypočteny jako suma intenzit všech vlnových délek pro danou teplotu. Tyto hodnoty byly následně vyneseny do grafů jako závislost intenzity fluorescence na teplotě. U všech vzorků docházelo s rostoucí teplotou k poklesu intenzity.

Nejdříve byly porovnány intenzity u vzorků obsahující 40 mol. % cholesterolu. Na následujícím grafu (Obrázek 21) můžeme vidět závislost intenzity fluorescence na teplotě pro systém obsahující Prodan se 40 mol. % cholesterolu, Laurdan se 40 mol. % cholesterolu a systém Prodan v deionizované vodě. Z grafu je patrné, že intenzita pro systém obsahující Laurdan je výrazně vyšší, jak u systémů obsahující Prodan. U dvou systémů obsahující Prodan, tedy Prodan ve vezikulách a Prodan v deionizované vodě jsou hodnoty intenzity srovnatelné. Intenzita Prodanu ve vodě je o něco menší, jak intenzita Prodanu ve vezikulách obsahujících 40 mol. % cholesterolu. Průběh poklesu intenzity systémů obsahující fluorescenční sondu ve vezikulách vytváří S-křivku. Naopak systém Prodanu ve vodě vytváří exponenciální závislost.



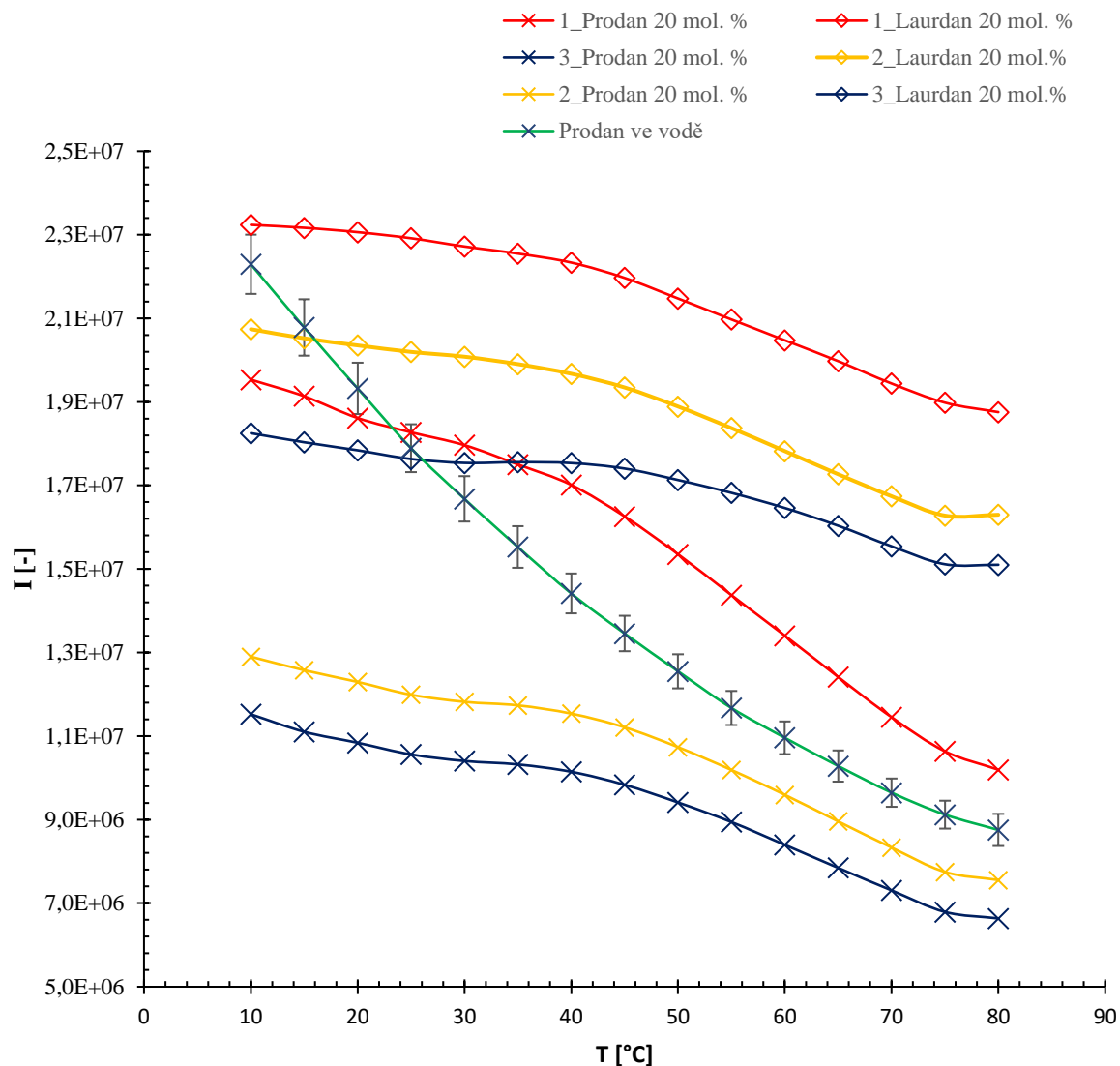
Obrázek 21: Závislost intenzity fluorescence na teplotě u různých systémů pro obsah cholesterolu 40 mol. %

Následující graf (Obrázek 22) porovnává systémy s Prodanem a Laurdanem se 60 mol. % cholesterolu a dále systém Prodan v deionizované vodě. Chování výše zmíněných systémů je velmi podobné, jako u systémů obsahující 40 mol. % cholesterolu. Nejvyšších hodnot intenzity tedy dosahuje systém obsahující Laurdan. Při porovnání intenzit systémů Prodan ve vezikulách s 60 mol. % cholesterolu a Prodan v deionizované vodě dosahuje tentokrát o něco větších intenzit systém s Prodanem ve vodě. Pokles intenzit vytváří opět S-křivku u systémů s fluorescenční sondou ve vezikulách. Se zvýšením obsahu cholesterolu na 60 mol. %, došlo k poklesu hodnot intenzity oproti systému se 40 mol. %.



Obrázek 22: Závislost intenzity fluorescence na teplotě u různých systémů pro obsah cholesterolu 60 mol. %

Nejmenších hodnot intenzit dosahovaly systémy s 20 mol. % cholesterolu (Obrázek 23). Pro každý systém (Prodan s 20 mol % cholesterolu, Laurdan s 20 mol. %) byly vždy provedeny tři stejná měření. Z Obrázku 23 je patrné, že pro každé měření, jednoho a toho samého systému, vycházely tři různé intenzity. Proto nemohlo dojít k jejich zprůměrování, jako v případech systémů se 40 a 60 mol. % cholesterolu. Odchytky měření pro systémy Prodan s 20 mol. % cholesterolu a Laurdan s 20 mol. % cholesterolu jsou tedy příliš vysoké. Důvodem velkého rozptylu hodnot intenzit může být fakt, že systémy obsahující 20 mol. % cholesterolu, jsou poměrně nestabilní. Proto se v systému mohou nacházet vezikuly o nestejných rozměrech a při následném měření intenzity tak může dojít k naměření rozdílných intenzit. Nicméně i tak je patrné, že i zde dochází k poklesu intenzity s rostoucí teplotou.



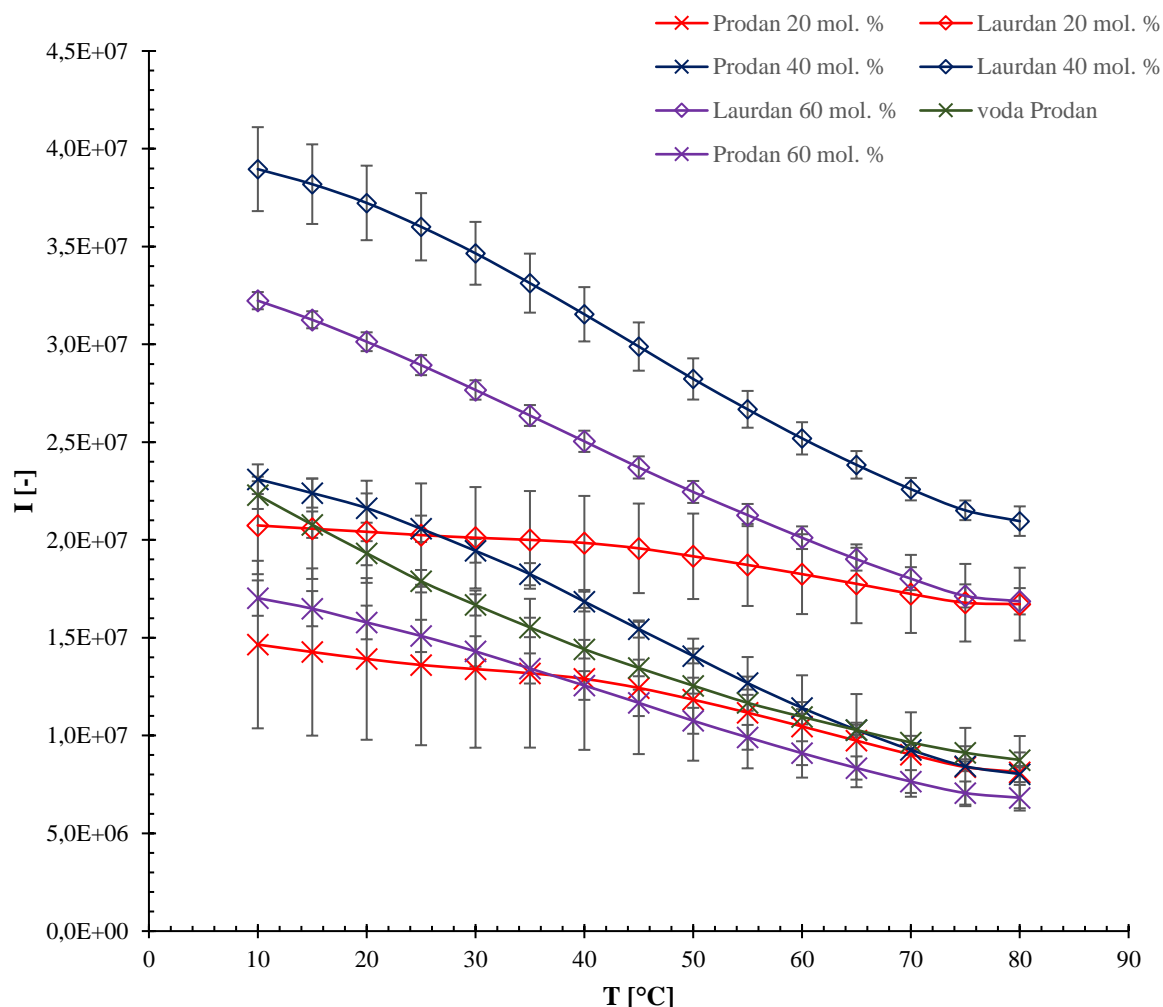
Obrázek 23: Závislost intenzity na teplotě u systémů obsahující fluorescenční sondu Prodan a Laurdan se 20 mol. % cholesterolu a systém Prodan v deionizované vodě.

Při porovnání dvou systémů obsahující Prodan, tedy Prodan ve vezikulách obsahujících 20 mol. % cholesterolu a Prodan v deionizované vodě, je intenzita Prodanu ve vodě vyšší, zejména při nižších teplotách. S rostoucí teplotou dochází k vyrovnání intenzit.

Intenzita fluorescence vzorků obsahující Prodan byla výrazně nižší, jak u vzorků obsahující Laurdan při všech koncentracích cholesterolu. Důvodem nižší intenzity Prodanu v porovnání s Laurdanem je to, že se Prodan vyskytuje i ve vodním prostředí, které samotnou intenzitu fluorescence snižuje.

Hodnoty intenzit systému obsahující Prodan v deionizované vodě, jsou nižší, jak všechny systémy obsahující Laurdan, zároveň jsou ale vyšší, jak systémy obsahující Prodan s 20 a 60 mol. % cholesterolu.

Porovnání intenzity všech výše zmíněných systémů v závislosti na teplotě najdeme v následujícím grafu (Obrázek 24).



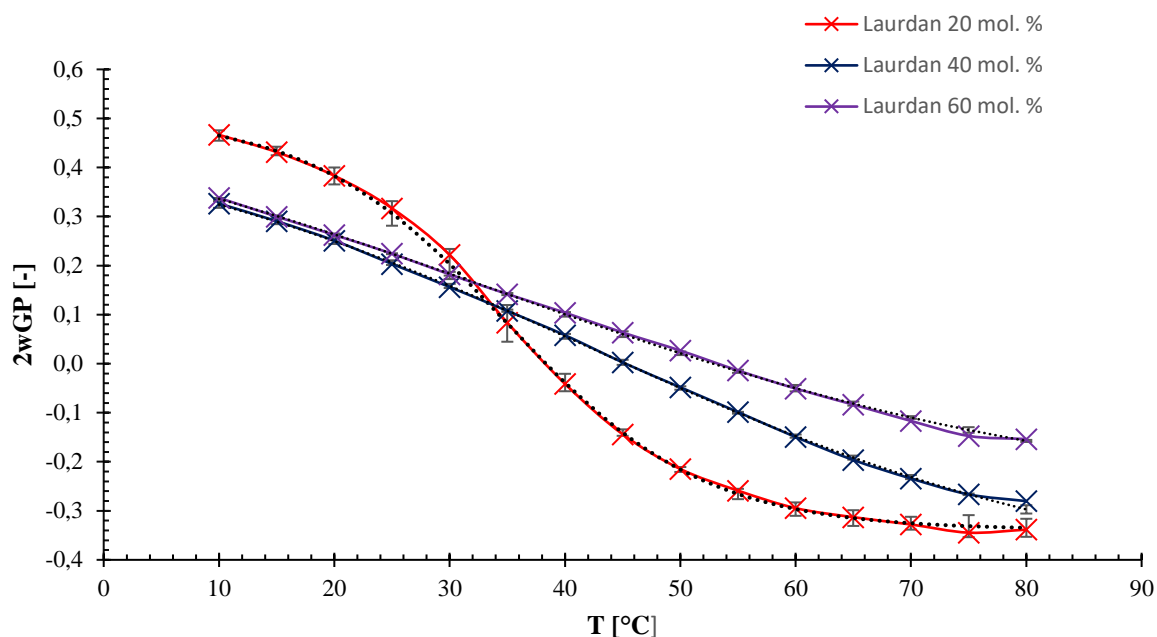
Obrázek 24: Graf závislosti intenzity na teplotě pro jednotlivé systémy. Křížky – Prodan, kosočtverce – Laurdan. Červená – 20 mol. % cholesterolu, tmavě modrá – 40 mol. % cholesterolu, fialová – 60 mol. % cholesterolu, zelená – Prodan ve vodě.

5.4 Generalizovaná polarizace

5.4.1 Generalizovaná polarizace Laurdanu

Ke sledování fázového přechodu membrány a zjištění polarity v okolí sondy, a tedy i ke zjištění množství molekul vody v membráně, byla využita metoda generalizované polarizace. Pro Laurdan byla vybrána metoda dvou vlnové GP (2wGP). K výpočtu byl použit vzorec (2.2). Intenzity byly vybrány při vlnových délkách $I_g=440$ nm, jako intenzita při maximální emisní vlnové délce ve stavu gelu, tedy v pevném stavu a $I_l=490$ nm jako intenzita při maximální emisní vlnové délce v kapalném stavu.

Nejprve byl pozorován systém obsahující 20 mol. % cholesterolu. Při nižších teplotách je hodnota 2wGP nejvyšší, což naznačuje nízký obsah molekul vody v okolí sondy. Membrána se v této fázi nachází v pevném uspořádaném stavu a molekuly vody tak nemohou snadno pronikat do membrány. S rostoucí teplotou se hodnoty 2wGP snižují, čímž dochází ke zvyšování počtu molekul vody v okolí sondy a membrána tak postupně přechází do kapalného neuspořádaného stavu. V rozmezí teplot od 25 do 50 °C křivka klesá mnohem strměji, což naznačuje fázový přechod. V tomto stavu se začíná vytvářet kapalná neuspořádaná fáze, avšak pevná uspořádaná fáze ještě také zcela nevymizela.



Obrázek 25: Graf závislosti 2wGP Laurdanu na teplotě pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % cholesterolu.

Dále byl sledován systém obsahující 40 mol. % cholesterolu. Zde, stejně jako v předchozím případě, jsou při nízkých teplotách hodnoty 2wGP vysoké, což opět značí pevný uspořádaný stav membrány a malý obsah molekul vody okolo sondy. S rostoucí teplotou hodnoty 2wGP opět klesají, čím dochází k vytváření kapalné neuspořádané fáze a zvýšení obsahu molekul vody v membráně.

Oproti systému obsahující 20 mol. % cholesterolu, zde došlo ke zvětšení teplotního intervalu fázového přechodu. Zároveň v oblasti nižších teplot, tedy ve stavu, kdy se membrána nachází v pevné fázi, došlo k poklesu hodnot 2wGP. Naproti tomu u vyšších teplot, a tedy v kapalném stavu membrány došlo naopak ke zvýšení hodnot 2wGP.

U posledního systému, a tedy systému obsahující 60 mol. % cholesterolu, byl pozorován obdobný průběh jako v předchozím případě, kdy s rostoucí teplotou opět klesaly hodnoty 2wGP, a tedy docházelo ke zvyšování obsahu molekul vody v membráně. U systému obsahující 60 mol. % cholesterolu, došlo k ještě většímu zvětšení teplotního intervalu fázového přechodu. Zároveň v oblasti vysokých teplot došlo opět k dalšímu zvýšení hodnot 2wGP, naproti tomu v oblasti nízkých teplot došlo k nepatrnému zvýšení 2wGP.

Všechny systémy (Laurdan s 20, 40 a 60 mol. % cholesterolu) byly proloženy pomocí čtyř parametrického Boltzmannova sigmoidního modelu. Pro výpočet modelu byla využita následující rovnice:

$$y = \frac{\max - \min}{1 + e^{x-x_0/dx}} + \min, \quad (5.1)$$

kde max a min určuje y souřadnice příslušné plochy, x_0 určuje x souřadnici inflexního bodu a dx značí sklon odpovídající závislosti [31].

Závislost 2wGP na teplotě všech výše zmíněných systémů můžeme vidět na Obrázku 25 a vypočtené hodnoty 2wGP Laurdanu taktéž pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % jsou k dispozici v kapitole 9.3.1 v Příloze.

5.4.2 Generalizovaná polarizace Prodanu

Dále byl sledován systém obsahující fluorescenční sondu Prodan. Laurdan má oproti Prodanu delší uhlovodíkový řetězec, který se začleňuje do membránové části. Proto k jeho měření postačuje metoda

dvou vlnové GP, kdy se berou intenzity pouze z membránového prostředí. Naproti tomu Prodan, který má uhlovodíkový řetězec kratší, se tak vyskytuje jak v membránovém prostředí, tak i v prostředí vodném. Proto zde již nebude metoda 2wGP, která zahrnuje pouze příspěvky z membránového prostředí stačit, ale využije se metoda tří vlnové GP (3wGP), která umožňuje zahrnutí příspěvků intenzit právě z vodného prostředí.

V kapitole 3.2 je uvedena studie Ewa K. Krasnowska a kol., kde pro výpočet 3wGP byly vybrány tři vlnové délky, a to $I_1=440$ nm jakožto intenzita při maximální emisní vlnové délce v pevném stavu, $I_2=480$ nm jako intenzita při maximální emisní vlnové délce ve stavu kapalném a $I_3=530$ nm jakožto maximální emisní vlnová délka pro systém Prodan v deionizované vodě. S využitím těchto vlnových délek byly následně vypočteny hodnoty 3wGP pomocí rovnic (3.1) až (3.4). Pro rovnici (3.3) byla ve studii Ewa K. Krasnowska a kol. vypočtena konstanta k_{32} pro všechny systémy stejná s fixní hodnotou $k_{32} = 2,8$ [23]. Při aplikaci rovnic (3.1) až (3.4) na námi připravené systémy, konstanta k_{32} nezůstávala konstantní, ale s rostoucí teplotou klesala (Tabulka 3).

Tabulka 3: Vypočtené hodnoty konstanty k_{32} pro jednotlivé teploty.

T [°C]	k_{32}
0	4,70 ± 0,03
15	4,41 ± 0,01
20	4,301 ± 0,006
25	4,09 ± 0,03
30	3,84 ± 0,03
35	3,72 ± 0,03
40	3,55 ± 0,05
45	3,33 ± 0,02
50	3,20 ± 0,04
55	3,05 ± 0,02
60	2,86 ± 0,04
65	2,80 ± 0,03
70	2,65 ± 0,02
75	2,515 ± 0,006
80	2,46 ± 0,03

Proto musela být rovnice (3.1) modifikována do následující podoby:

$$3wGP = \frac{(I_{M440} - W_{P440} \cdot I_{WR}) - (I_{M480} - W_{P480} \cdot I_{WR})}{(I_{M440} - W_{P440} \cdot I_{WR}) + (I_{M480} - W_{P480} \cdot I_{WR})}, \quad (5.2)$$

kde I_{M440} a I_{M480} jsou intenzity z membránového prostředí pro vlnové délky 440 nm a 480 nm, W_{P440} a W_{P480} jsou vodní parametry pro vlnové délky 440 nm a 480 nm z vodného prostředí a I_{WR} je tzv. vodní reference pro vlnovou délku 580 nm z membránového prostředí.

Pro výpočet vodních parametrů platí:

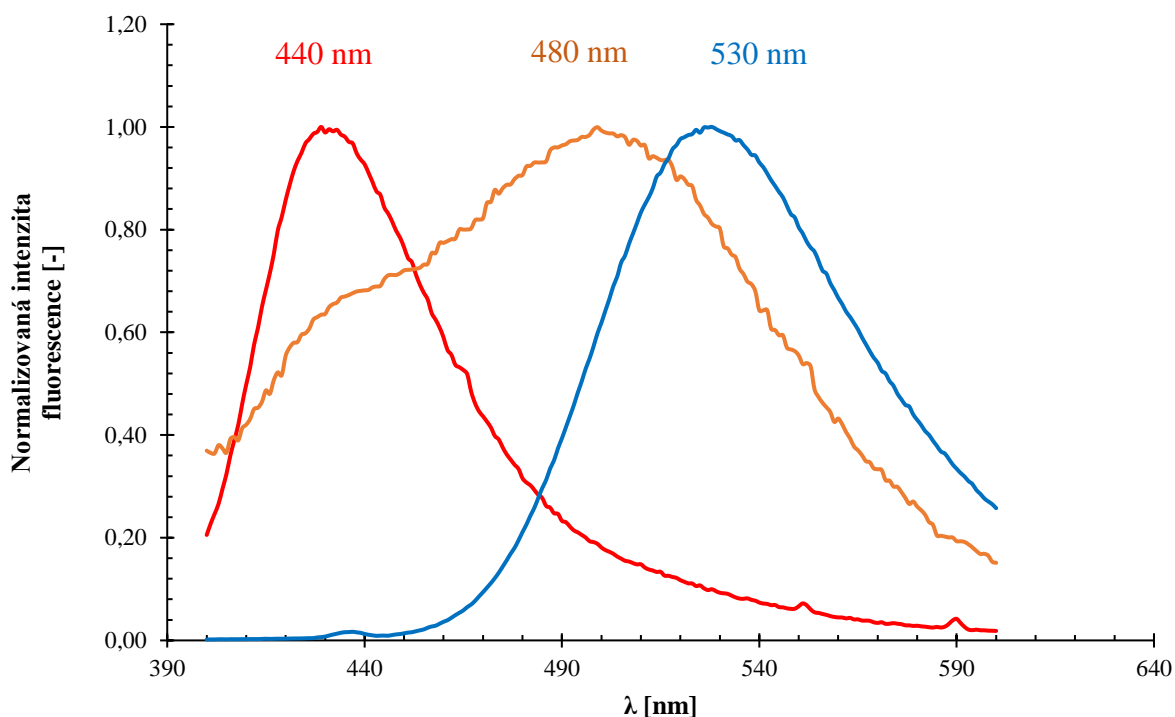
$$W_{P440} = \frac{I_{W440}}{I_{W580}}, \quad (5.3)$$

popř.

$$W_{P480} = \frac{I_{W480}}{I_{W580}}, \quad (5.4)$$

kde $I_{W_{440}}$, $I_{W_{480}}$ a $I_{W_{580}}$ jsou intenzity při vlnových délkách 440, 480 a 580 nm z vodného prostředí.

Kromě modifikace rovnice pro výpočet 3wGP byla také místo vlnové délky 530 nm jakožto maximální emisní vlnové délky pro systém Prodan v deionizované vodě, která byla využita ve studii Ewa K. Krasnowska a kol., vybrána vlnová délka 580 nm. Důvodem posunutí této vlnové délky je to, že pro odstranění příspěvku fluorescence z vodného prostředí, a tedy získat data pouze z membrány, je nutno vybrat takovou vlnovou délku, při které je intenzita fluorescence Prodanu ve vodě relativně vysoká, zároveň ale neovlivňuje, nebo ovlivňuje jen minimálně, příspěvek fluorescence z membrány. Vlnová délka 530 nm je sice hodnota, při které dosahuje systém obsahující Prodan v deionizované vodě nejvyšší intenzity, nicméně zasahuje i do příspěvku fluorescence z membrány. Intenzita fluorescence při vlnové délce 580 nm ve vodě je sice o něco nižší jak při 530 nm, nicméně příspěvek z membrány zde zasahuje minimálně (Obrázek 26).



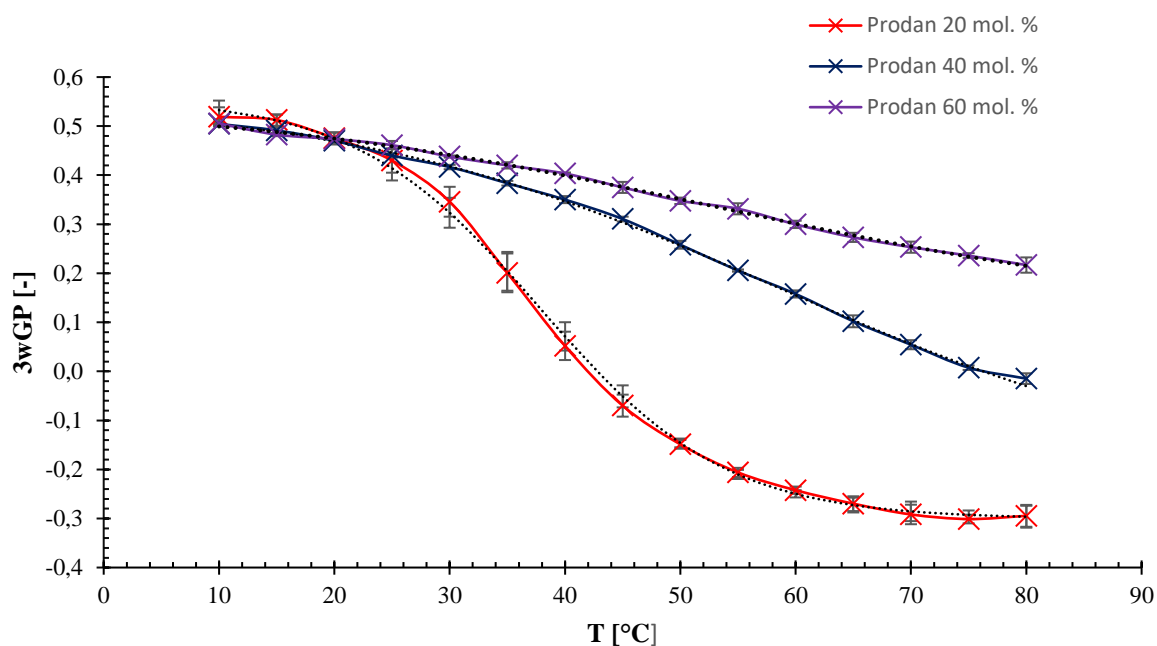
Obrázek 26: Graf normalizované intenzity fluorescence Prodanu na teplotě. Červená - maximum emise z pevného uspořádaného stavu membrány, oranžová - maximum emise z kapalného neuspořádaného stavu membrány, modrá - maximum emise z vodného prostředí.

I zde byly zkoumány celkem 3 systémy s různým obsahem cholesterolu, a to 20, 40 a 60 mol. %. Následně byly vypočteny hodnoty 3wGP dle rovnic (5.2) až (5.4). Dle vypočtených hodnot je patrné, že všechny systémy obsahující Prodan vykazují velmi podobné chování jako systémy s Laurdanem. U všech systémů zde docházelo s rostoucí teplotou k poklesu hodnot 3wGP. Zároveň se zvětšoval teplotní interval fázového přechodu. (Obrázek 27).

Všechny systémy (Prodan s 20, 40 a 60 mol. % cholesterolu), byly opět proloženy pomocí Boltzmannova modelu vypočítaného dne rovnice (5.1).

Při nízkých teplotách jsou hodnoty 3wGP Prodanu pro všechny koncentrace cholesterolu srovnatelné. S rostoucí teplotou se zvětšuje jejich rozdíl. Důvodem může být to, že při nízkých teplotách, když se membrána nachází ve stavu pevném uspořádaném, se molekuly vody nemohou příliš přeorientovat a měnit tak svoji polohu. V této fázi tak, nemá obsah cholesterolu na vodu v okolí membrány takový vliv. Naopak při vyšších teplotách, když se membrána nachází ve stavu kapalném neuspořádaném, mají

molekuly vody větší možnost se pohybovat, a proto má v této oblasti cholesterol na vodu v okolí membránu větší vliv.



Obrázek 27: Závislost $3wGP$ na teplotě u systému s různým obsahem cholesterolu.

Vypočtené hodnoty $3wGP$ Prodanu pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % jsou k dispozici v kapitole 9.3.2 v Příloze.

5.4.3 Porovnání generalizované polarizace Laurdanu a Prodanu

U všech systémů obsahujících jak fluorescenční sondu Laurdan, tak fluorescenční sondu Prodan, dochází se zvyšující teplotou k poklesu hodnoty GP. Membrána se tak v průběhu mění ze stavu pevného uspořádaného, kdy se v okolí vyskytuje malý obsah molekul vody, do stavu kapalného neuspořádaného, kdy se v okolí naopak vyskytuje molekul vody více.

Stav přechodu z pevné fáze do kapalné se nazývá fázový přechod. U vzorku s Laurdanem a 20 mol. % cholesterolu byl interval fázového přechodu přibližně stejný, jako u systému obsahující Prodan s 20 mol. % cholesterolu. Obdobně tomu bylo i u systémů se 40 a 60 mol. %. s tím, že s rostoucí koncentrací cholesterolu docházelo ke zvětšování teplotního intervalu fázového přechodu.

Dále byla sledována oblast vysokých teplot, tedy stav, kdy se membrána nachází v kapalné neuspořádané fázi, v závislosti na rostoucí koncentraci cholesterolu. U systémů s Laurdanem docházelo v této oblasti s rostoucí koncentrací cholesterolu k nárůstu hodnot $2wGP$. U systémů obsahující Prodan docházelo s rostoucí koncentrací cholesterolu také ke zvyšování hodnot $3wGP$. Avšak u systémů s Prodanem byl nárůst hodnot $3wGP$ mnohem výraznější, jak u hodnot $2wGP$ Laurdanu (Tabulka 4).

Hodnoty $3wGP$ u systému s Prodanem obsahující 60 mol. % cholesterolu dokonce zůstaly i při vysokých teplotách v kladné oblasti. Největších hodnot GP v kapalné neuspořádané oblasti tedy dosahují oba systémy při koncentraci cholesterolu 60 mol. %, naopak nejmenších při koncentraci 20 mol. % cholesterolu.

Tabulka 4: Minimální hodnoty 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu pro jednotlivé koncentrace cholesterolu.

Minimální hodnoty GP		
mol. % cholesterolu	Laurdan 2wGP	Prodan 3wGP
20	-0,338 ± 0,018	-0,29 ± 0,02
40	-0,280 ± 0,008	-0,015 ± 0,011
60	-0,154 ± 0,002	0,217 ± 0,016

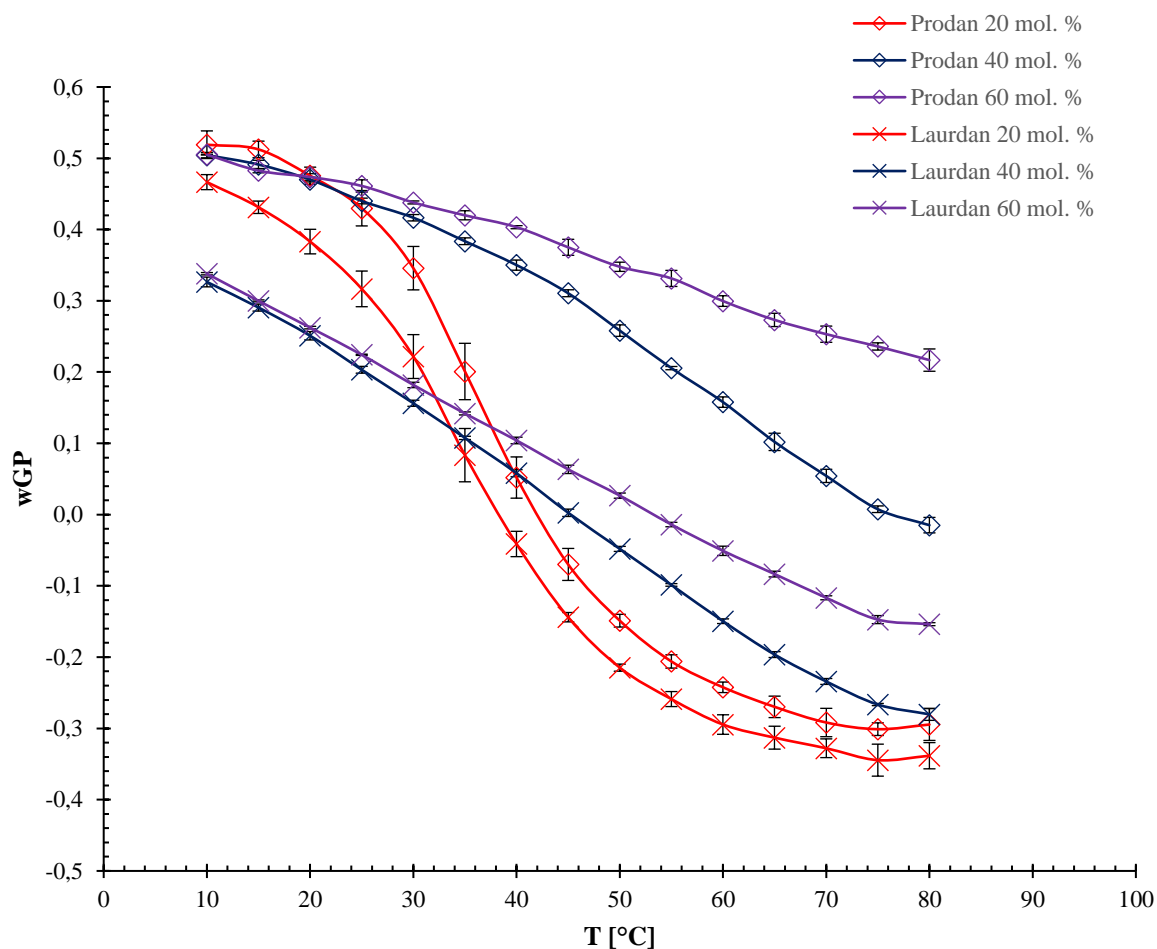
V oblasti nízkých teplot, tedy ve stavu pevném uspořádaném, byl průběh u obou sond opět shodný. U systému obsahující Laurdan u vzorku se 40 mol. % cholesterolu došlo k poklesu hodnot 2wGP oproti systému s 20 mol. %. U systému obsahující 60 mol. % cholesterolu došlo poté k opětovnému nepatrnému zvýšení. U vzorků obsahující Prodan byl pozorován stejný průběh. U systému s 40 mol. % cholesterolu došlo tedy k poklesu 3wGP a při zvýšení koncentrace cholesterolu na 60 mol. % se hodnoty 3wGP opět zvýšily (Tabulka 5). Avšak v tomto případě byly změny hodnot 3wGP výrazně nižší jak změny u 2wGP.

Tabulka 5: Maximální hodnoty 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu pro jednotlivé koncentrace cholesterolu.

Maximální hodnoty GP		
mol. % cholesterolu	Laurdan 2wGP	Prodan 3wGP
20	0,467 ± 0,011	0,519 ± 0,019
40	0,326 ± 0,007	0,504 ± 0,004
60	0,3380 ± 0,0016	0,5051 ± 0,0006

Největších hodnot 2wGP i 3wGP v oblasti nízkých teplot dosahují tedy obě sondy při koncentraci cholesterolu 20 mol. %, nejnižších naopak u systému obsahující 40 mol. %.

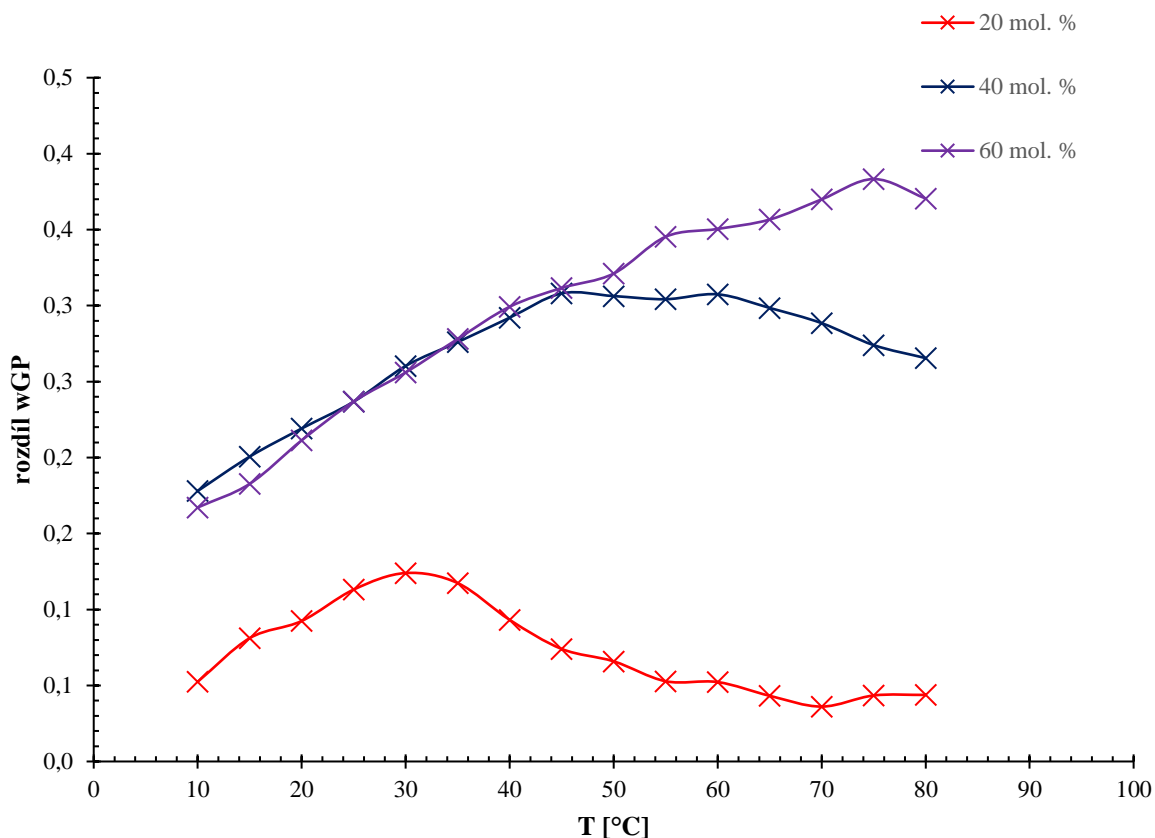
Při porovnání systémů 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu (Obrázek 28) je patrné, že oba systémy vykazují velmi podobné chování. S rostoucí teplotou klesají jak hodnoty 2wGP Laurdanu, tak hodnoty 3wGP Prodanu. Dochází tedy ke změně stavu membrány z pevného uspořádaného na kapalný neuspořádaný, a tím zároveň dochází k nárůstu obsahu vody v okolí sondy. Dále také dochází s rostoucí koncentrací cholesterolu ke zvětšení teplotního intervalu fázového přechodu.



Obrázek 28: Graf závislosti $2w_{GP}$ Laurdanu a $3w_{GP}$ Prodanu na teplotě pro různé koncentrace cholesterolu. Křížky – Laurdan, kosočtverce – Prodan, červená – 20 mol. %, tmavě modrá – 40 mol. %, fialová 60 mol. % cholesterolu.

Z předchozího grafu (Obrázek 28) je patrné, že hodnoty $3w_{GP}$ Prodanu jsou vždy vyšší, jak hodnoty $2w_{GP}$ Laurdanu. Dále lze vidět, že s rostoucí koncentrací cholesterolu roste i rozdíl mezi hodnotami GP Laurdanu a Prodanu (Obrázek 29). Nejmenší rozdíl je tedy u systému obsahující 20 mol. % cholesterolu, největší naopak u 60 mol. %.

U systému obsahující 20 mol. % cholesterolu dochází nejprve k mírnému nárůstu rozdílu w_{GP} hodnot. Po dosažení teploty 30 °C následuje pokles hodnot a od teploty 70 °C dochází jen k velmi mírnému zvýšení. Největší rozdíl hodnot w_{GP} pro systém obsahující 20 mol. % cholesterolu je při teplotě 30 °C. Naopak nejmenších rozdílů se dosahuje v oblasti vysokých teplot.



Obrázek 29: Závislost rozdílu wGP Prodan-Laurdan na teplotě pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % cholesterolu.

Pro systém obsahující 40 mol. % cholesterolu se průběh mírně liší. Nejprve dochází opět k nárůstu rozdílu wGP až do teploty 45 °C. Od této teploty začínají hodnoty naopak mírně klesat. U tohoto systému je tedy největší rozdíl při teplotě 45 °C. Na druhou stranu s nejmenším rozdílem se setkáváme při nízkých teplotách.

U posledního systému, který obsahuje 60 mol. % cholesterolu se průběh liší od předchozích dvou. Zde dochází k nárůstu rozdílu v celém teplotním rozsahu s výjimkou intervalu teplot od 75 do 80 °C, kdy dojde k mírnému poklesu. Zde tedy nejmenší rozdíl wGP nastává v oblasti nízkých teplot. Naopak největších rozdílů wGP se dosahuje při vysokých teplotách.

Z naměřených dat je patrné, že s rostoucí koncentrací cholesterolu se zvětšuje rozdíl mezi 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu, a zároveň se maximální rozdíl posouvá k vyšším teplotám.

Tabulky maximálních a minimálních rozdílů wGP Prodan-Laurdan pro systémy s různou koncentrací cholesterolu, můžeme vidět v následujících tabulkách (Tabulka 6) a (Tabulka 7).

Tabulka 6: Teploty, při kterých se dosahuje největšího wGP Prodanu-Laurdanu pro koncentrace cholesterolu 20, 40 a 60 mol. %.

Maximální rozdíl 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu	
mol.% cholesterolu	T [°C]
20	30
40	45
60	75

Tabulka 7: Teploty, při kterých se dosahuje nejmenšího rozdílu wGP Prodan-Laurdan pro koncentrace cholesterolu 20, 40 a 60 mol.

Minimální rozdíl 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu	
mol.% cholesterolu	T [°C]
20	70
40	10
60	10

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá studiem hydratačního obalu kladně nabitých vezikulárních systémů. Cílem práce bylo sledovat hydratační obal a zjistit tak množství molekul vody v okolí při různých stavech membrány. Dále také porovnání dvou vybraných fluorescenčních sond. Sledované systémy byly složeny ze dvou opačně nabitých tenzidů, a to záporně nabitého SDS a kladně nabitého CTAB. Pro stabilizaci byl k systému přidán i dvou-řetězcový kladně nabitý tenzid DODAC, který zapříčinil kladné nabití vezikulárních systémů, a cholesterol. Pro studium byly použity celkem tři různé koncentrace cholesterolu, a to 20, 40 a 60 mol. %. Studium bylo provedeno měřením emise fluorescence v závislosti na teplotě, kde teplotní rozsah byl od 10 do 80 °C. Jako fluorescenční sondy byly využity Laurdan a Prodan. Laurdan, díky svému poměrně dlouhému uhlovodíkovému řetězci se nachází zejména v membránovém prostředí, proto pro jeho vyhodnocení postačuje metoda dvou vlnové generalizované polarizace. Oproti tomu Prodan má uhlovodíkový řetězec kratší a díky tomu se rozděluje do dvou prostředí. Do prostředí membránového, stejně jako Laurdan, ale zároveň také do prostředí vodného. Proto je nutno pro jeho vyhodnocení využít metodu tří vlnové generalizované polarizace, která umožňuje zahrnutí příspěvků jak z membránového prostředí, tak právě i z vodného.

U všech systémů docházelo s rostoucí teplotou k poklesu intenzity. Systémy obsahující Laurdan dosahovaly výrazně vyšších intenzit, jak systémy obsahující Prodan. Důvodem je fakt, že se Prodan, oproti Laurdanu, vyskytuje i ve vodném prostředí, které samotnou intenzitu fluorescence snižuje. U systémů s Prodanem dosahoval největších hodnot intenzit systém, obsahující 40 mol. % cholesterolu, nejnižších naopak systém s 20 mol. %. U systémů obsahující sondu Laurdan tomu bylo stejně tak.

Hodnoty dvou vlnové generalizované polarizace Laurdanu klesaly s teplotou při všech koncentracích cholesterolu. Toto chování naznačuje, že při nízkých teplotách se membrána nachází ve stavu pevném uspořádaném, kdy se v okolí membrány vyskytuje malý obsah molekul vody. S rostoucí teplotou přechází membrána do stavu kapalného neuspořádaného, kdy se v okolí membrány zvýší i obsah molekul vody. S rostoucí koncentrací cholesterolu také docházelo ke zvětšování intervalu fázového přechodu.

Při výpočtu hodnot 3wGP Prodanu dle studie Ewa K. Krasnowska a kol. [23] se naše výsledky neshodovaly s výsledky výše uvedené studie. Proto musela být navržena nová rovnice pro výpočet tří vlnové generalizované polarizace Prodanu, která zahrnuje celkem tři intenzity, dvě z toho z membránového prostředí (ve stavu pevném uspořádaném a ve stavu kapalném neuspořádaném) a třetí z vodného prostředí. Po výpočtu 3wGP Prodanu pro všechny systémy s různým obsahem cholesterolu vykazovaly hodnoty 3wGP obdobné chování jako u 2wGP Laurdanu. S rostoucí teplotou tedy docházelo k poklesu hodnot 3wGP, a to při všech koncentracích cholesterolu. Tyto výsledky tedy opět naznačují, že při nízkých teplotách, a tedy v pevném uspořádaném stavu membrány je v okolí malý obsah molekul vody a se zvyšující se teplotou a přeměnou membrány do stavu kapalného neuspořádaného, se počet molekul vody zvyšuje. Zároveň opět docházelo ke zvětšování teplotního intervalu fázového přechodu.

Obě sondy vykazují velmi obdobné chování při všech koncentracích cholesterolu. Fluorescenční sonda Laurdan dosahuje tedy vyšších intenzit jak Prodan. Naopak porovnáním hodnot 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu se došlo ke zjištění, že hodnoty 3wGP Prodanu dosahují vyšších hodnot, jak 2wGP Laurdanu. Nejmenších rozdílů mezi generalizovanými polarizacemi obou sond se dostává při koncentraci cholesterolu 20 mol. % a naopak největších při koncentraci 60 mol. %. S rostoucí koncentrací cholesterolu tedy dochází ke zvětšování rozdílu mezi 2wGP Laurdanu a 3wGP Prodanu.

Z naměřených dat tedy není zcela patrná přesná lokalizace Prodanu, respektive jeho podíl v membránové a vodné oblasti. Změnou koncentrace cholesterolu zřejmě nedochází k výrazným změnám, které by poskytly více informací o Prodanovém rozdělení. K této problematice tedy stále existuje mnoho otázek, jejichž odpověď by mohla být nalezena například využitím TRES neboli časově rozlišených emisních spekter (z angl. *Time resolved emission spectra*). Dalším řešením by také mohlo být studium změn poměru koncentrací IPA:DODAC, kdy by docházelo ke změně stability membrány.

Popřípadě navázáním polymeru nebo jiných látek na povrch vezikul. Příkladem takové polymeru může být například hojně využívaný hyaluronan.

7 LITERTURA

- [1] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2020-12-26]. Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/). ISBN 80-7080-579-X
- [2] PICHLER, Jiří, 1988. *Technologie základních organických látek, tenzidy, barviva a pigmenty* [online]. Brno: Univerzita J.E. Purkyně [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: <https://dnnt.mzk.cz/view/uid:997ba970-13ba-11e3-8f8a-005056827e52?page=uid:e3c3fd50-3031-11e3-b62e-005056825209>
- [3] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes: *Chemické listy*. 93, 1999, s. 421-427
- [4] *Bezpečnostní list: Laurdylsírán sodný* [online]. Mach Chemikálie, 2011 [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: https://www.mach-chemikalie.cz/images/download/old_file/253/laurylsiran_sodny.pdf
- [5] *Bezpečnostní list: Cetyltrimethylammonium Bromide* [online]. Millipore, 2019 [cit. 2020-12-26]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-CN-Site/zh_CN/-/CNY/ShowDocument-File?ProductSKU=EMD_BIO-219374&DocumentId=D44026_SDS_CZ_CS.PDF&DocumentType=MSD&Language=CS&Country=CZ&Origin=PDP
- [6] CLARKE, J. D., 2009. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2009**(3), pdb.prot5177-pdb.prot5177. ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot5177
- [7] Dimethyldioctadecylammonium chloride [online]. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-chloride>
- [8] POUCHLÝ, Julius, 2008. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2020-12-26]. ISBN 978-80-7080-674-6. Dostupné z: <https://dnnt.mzk.cz/view/uid:a6100f30-320f-11ea-a83e-005056827e51?page=uid:e3eaec38-72b3-4d01-891a-1409c7522dd2&fulltext=micely>
- [9] KOTLÍK, Petr. Možnosti použití micelárních koloidů a mikroemulzí při restaurování památek: *Chemické listy*. 108, 2014, s. 1113-1118
- [10] 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
- [11] 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
- [12] GHOSH, Sampad, Balram AMBADE a Anirban RAY, 2013. Stable Catanionic Vesicles as Drug Delivery Vehicle. *Science of Advanced Materials*. **5**(12), 1837-1846. ISSN 19472935. Dostupné z: doi:10.1166/sam.2013.1649
- [13] JIANG, Yue, Yuxia LUAN, Fei QIN, Lanxia ZHAO a Zhonghao LI, 2012. Catanionic vesicles from an amphiphilic prodrug molecule: a new concept for drug delivery systems. *RSC Advances*. **2**(17). ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c2ra20653f
- [14] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged catanionic 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>

- [15] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG, 2018. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science*. **67**(6), 727-735. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess18008
- [16] DOSTÁL, Jirí, 2005. *Lékařská chemie II: bioorganická chemie* [online]. 2., zcela přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2020-12-26]. ISBN 80-210-3789-X. Dostupné z: <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:c4f694d0-18cf-11e6-8401-005056827e51?page=uuid:0ed97a10-2e4a-11e6-ae84-005056827e51>
- [17] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC, 2020. Study of cholesterol's effect on the properties of catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **607**. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526
- [18] VALEUR, Bernard, c2002. *Molecular fluorescence: principles and applications* [online]. Weinheim: Wiley-VCH [cit. 2020-12-26]. ISBN 35-276-0024-8. Dostupné z: http://scholar.google.cz/scholar_url?url=https://www.spiedigitallibrary.org/journals/Journal-of-Biomedical-Optics/volume-18/issue-3/039901/Molecular-Fluorescence-Principles-and-Applications-Second-Edition/10.1117/1.JBO.18.3.039901.pdf&hl=cs&sa=X&ei=GtzlX-6OEILpmQHUPrPICw&scisig=AAGBfm0Uh5XZxGbUaNIsD72suUD7mMnWgg&nossl=1&oi=scholarr
- [19] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2010. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1880-7.
- [20] KLYMCHENKO, Andrey S. a Rémy KREDER, 2014. *Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells*. **21**(1), 97-113. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.009
- [21] HARRIS, Faith M, Katrina B BEST a John D BELL, 2002. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1565**(1), 123-128. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(02)00514-X
- [22] PARASASSI, T., G. DE STASIO, G. RAVAGNAN, R.M. RUSCH a E. GRATTON, 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*. **60**(1), 179-189. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(91)82041-0
- [23] KRASNOWSKA, Ewa K., Enrico GRATTON a Tiziana PARASASSI, 1998. Prodan as a Membrane Surface Fluorescence Probe: Partitioning between Water and Phospholipid Phases. *Biophysical Journal*. **74**(4), 1984-1993. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(98)77905-6
- [24] ARTUKHOV, Viktor Ya., Oksana M. ZHARKOVA a Julia P. MOROZOVA, 2007. Features of absorption and fluorescence spectra of prodan. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **68**(1), 36-42. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2006.10.048
- [25] KOZYRA, K.A., J.R. HELDT, M. ENGELKE a H.A. DIEHL, 2005. Phase transition affects energy transfer efficiency in phospholipid vesicles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **61**(6), 1153-1161. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2004.06.034
- [26] PARASASSI, Tiziana, Ewa K. KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. *Journal of Fluorescence*. **8**(4), 365-373. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020528716621

- [27] KRASNOWSKA, Ewa K, Luis A BAGATOLLI, Enrico GRATTON a Tiziana PARASASSI, 2001. Surface properties of cholesterol-containing membranes detected by Prodan fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1511**(2), 330-340. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(01)00286-3
- [28] PARASASSI, T., G. DE STASIO, A. D'UBALDO a E. GRATTON, 1990. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*. **57**(6), 1179-1186. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(90)82637-0
- [29] KALINA, Jiří a Vladimír ŠPUNDA, 2004. *Optická spektroskopie I* [online]. Ostrava: Ostravská univerzita [cit. 2020-12-26]. ISBN 80-736-8000-9. Dostupné z: <https://dnnt.mzk.cz/view/uuid:e19f2f70-0092-11e6-845a-005056827e51?page=uuid:df3e6b20-12b1-11e6-a718-005056825209>
- [30] 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
- [31] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Ludmila MRAVCOVÁ, Tereza VENEROVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Miloslav PEKAŘ, Adam JUGL a Filip MRAVEC, 2021. Cholesterol Effect on Membrane Properties of Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles at Different Temperatures. *Langmuir*. **37**(7), 2436-2444. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c03504

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratk

PAL	povrchově aktivní látky
SDS	dodecylsírán sodný
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
DODAC	dimethyldioktadecylamonium chlorid
CMC	kritická molární koncentrace
IPA	iontový amfifilní pár
cIPA	kladně nabitě kataniontové vezikulární systémy
SUV	malé unilamelární vezikuly
GP	generalizovaná polarizace
2wGP	dvou vlnová generalizovaná polarizace
3wGP	tří vlnová generalizovaná polarizace
DTDAB	ditetradecyldimethylamonium bromid
DHDAB	dihexadecyldimethylamonium bromid
DODAB	dioktadecyldimethylamonium bromid
DLS	dynamický rozptyl světla
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DLPC	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin
TRES	časově rozlišená fluorescenční spektra

8.2 Seznam použitých symbolů

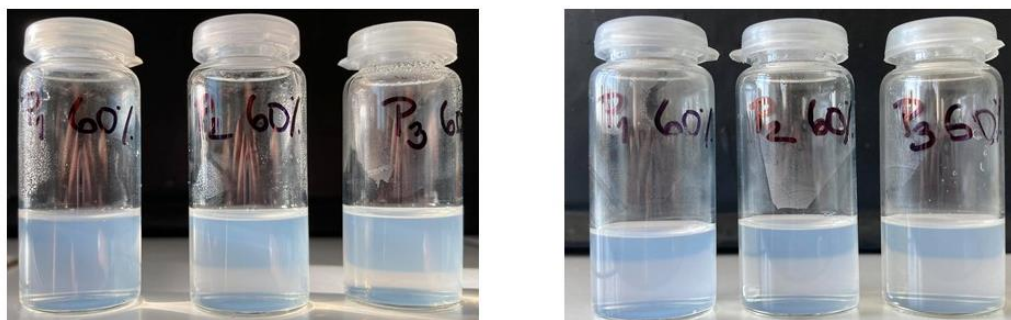
P_c	kritický sbalovací parametr
v	objem, který zaujímá hydrofobní část řetězce
a_0	plocha vyhrazena na povrchu micely pro hydrofilní skupinu a
l_c	efektivní délka hydrofobního řetězce
S_0	základní energetická hladina
S_1/S_2	energeticky vyšší hladiny
T	tripleťový stav
I	intenzita
I_g	intenzita fluorescence při maximální emisní vlnové délce v gelovém stavu
I_l	intenzita fluorescence při maximální emisní vlnové délce v tekutém stavu
λ	vlnová délka
T	teplota
I_M	intenzita z membránového prostředí
W_p	vodní paramer z vodného prostředí
I_{WR}	vodní reference z vodného prostředí

I_w

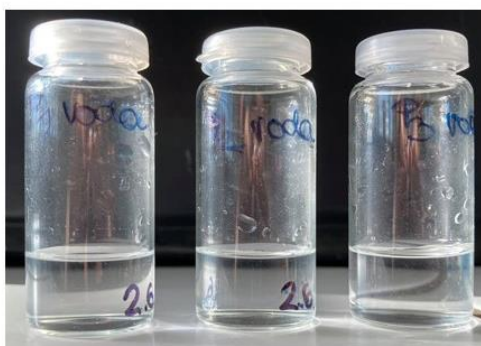
intenzita z vodného prostředí

9 PŘÍLOHA

9.1 Vzorky před a po sonifikaci

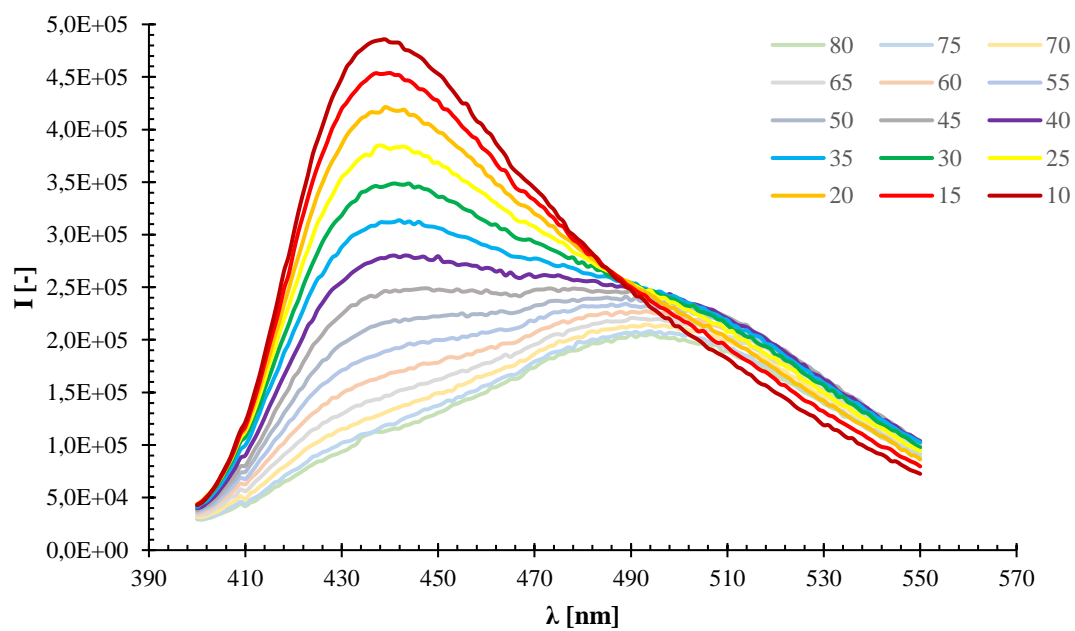


Obrázek 30: Vzorky Prodanu obsahující 60 mol. % cholesterol. Vlevo před sonifikací pomocí vodní lázně, vpravo po sonifikaci.

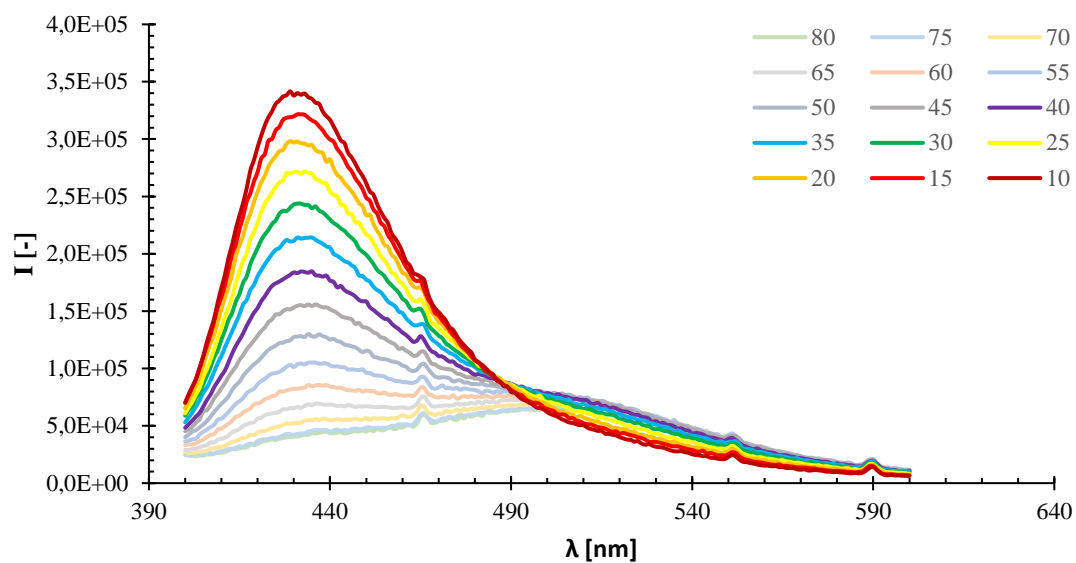


Obrázek 31: Vzorky obsahující Prodan v deionizované vodě.

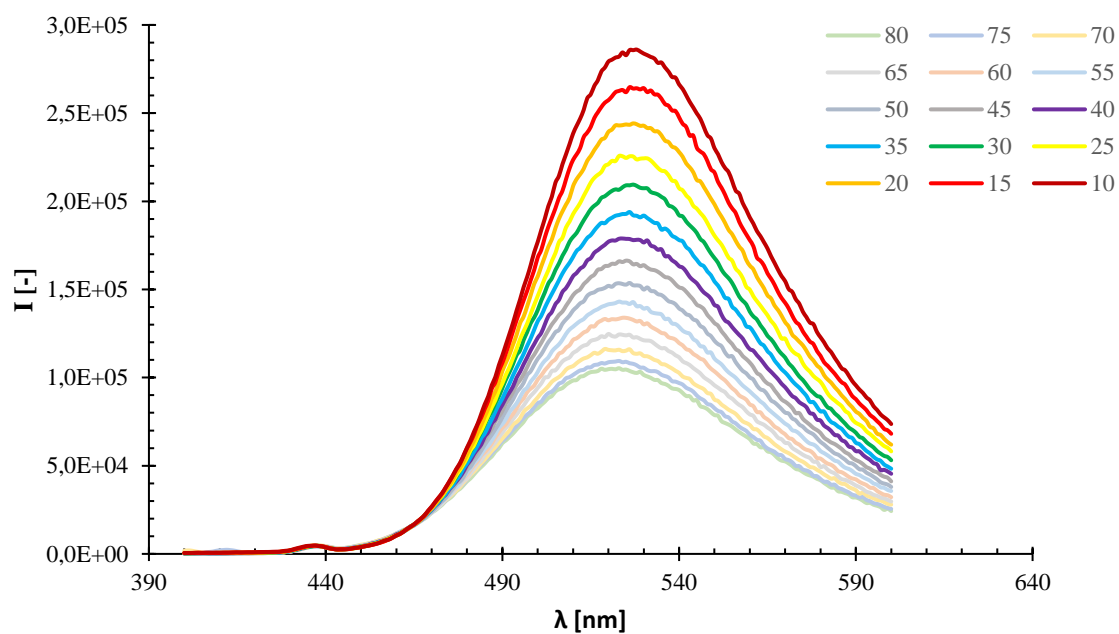
9.2 Emisní spektra



Obrázek 32: Emisní spektrum Laurdanu s obsahem cholesterolu 40 mol. %.



Obrázek 33: Emisní spektrum Prodanu s obsahem cholesterolu 40 mol. %.



Obrázek 34: Emisní spektrum Prodanu v deionizované vodě.

9.3 Generalizovaná polarizace

9.3.1 Generalizovaná polarizace Laurdanu

Tabulka 8: Vypočtené hodnoty 2wGP Laurdanu při určitých teplotách pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % cholesterol.

T [°C]	Obsah cholesterolu		
	20 mol. %	40 mol. %	60 mol. %
	3wG	3wGP	3wGP
10	0,467 ± 0,011	0,326 ± 0,007	0,3380 ± 0,0016
15	0,431 ± 0,009	0,291 ± 0,005	0,2999 ± 0,0013
20	0,383 ± 0,017	0,251 ± 0,006	0,2624 ± 0,0018
25	0,32 ± 0,03	0,203 ± 0,005	0,2243 ± 0,0009
30	0,22 ± 0,03	0,156 ± 0,004	0,182 ± 0,004
35	0,08 ± 0,04	0,108 ± 0,002	0,142 ± 0,002
40	-0,041 ± 0,018	0,058 ± 0,005	0,104 ± 0,005
45	-0,144 ± 0,007	0,003 ± 0,005	0,063 ± 0,006
50	-0,215 ± 0,005	-0,048 ± 0,004	0,027 ± 0,004
55	-0,259 ± 0,011	-0,0987 ± 0,0018	-0,014 ± 0,003
60	-0,295 ± 0,014	-0,150 ± 0,003	-0,051 ± 0,007
65	-0,313 ± 0,016	-0,196 ± 0,004	-0,083 ± 0,004
70	-0,328 ± 0,013	-0,234 ± 0,004	-0,117 ± 0,003
75	-0,34 ± 0,02	-0,2665 ± 0,0015	-0,147 ± 0,006
80	-0,338 ± 0,018	-0,280 ± 0,008	-0,154 ± 0,002

9.3.2 Generalizovaná polarizace Prodanu

Tabulka 9: Vypočtené hodnoty 3wGP Prodanu při určitých teplotách pro systémy obsahující 20, 40 a 60 mol. % cholesterol.

T [°C]	Obsah cholesterolu		
	20 mol. %	40 mol. %	60 mol. %
	3wG	3wGP	3wGP
10	0,519 ± 0,019	0,504 ± 0,004	0,5051 ± 0,0006
15	0,512 ± 0,012	0,491 ± 0,006	0,483 ± 0,003
20	0,476 ± 0,012	0,470 ± 0,003	0,474 ± 0,005
25	0,43 ± 0,02	0,440 ± 0,004	0,461 ± 0,009
30	0,35 ± 0,03	0,417 ± 0,005	0,438 ± 0,002
35	0,20 ± 0,04	0,384 ± 0,005	0,420 ± 0,006
40	0,05 ± 0,03	0,350 ± 0,007	0,403 ± 0,002
45	-0,07 ± 0,02	0,311 ± 0,005	0,375 ± 0,011
50	-0,149 ± 0,009	0,258 ± 0,008	0,348 ± 0,006
55	-0,206 ± 0,009	0,206 ± 0,002	0,331 ± 0,011
60	-0,242 ± 0,007	0,158 ± 0,007	0,300 ± 0,007
65	-0,270 ± 0,015	0,102 ± 0,012	0,273 ± 0,009
70	-0,29 ± 0,02	0,054 ± 0,009	0,253 ± 0,011
75	-0,301 ± 0,009	0,008 ± 0,005	0,236 ± 0,005
80	-0,29 ± 0,02	-0,015 ± 0,011	0,217 ± 0,016