



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 MEMBRÁNOVÝCH VLASTNOSTÍ
KATANIONTOVÝCH VEZIKUL Z NOVÝCH IONTOVÝCH
AMFIFILNÍCH PÁRŮ SEPT-DS**

STUDY OF MEMBRANE PROPERTIES OF CATIONIC VESICLES FROM NEW SEPT-DS AMPHIPHILIC ION PAIRS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Katarína Vajcíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1876/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Katarína Vajcíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium membránových vlastností kataniontových vezikul z nových iontových amfifilních párů SEPT-DS

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na přípravu a charakterizaci vezikulárních systémů na bázi kataniontových tenzidů.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodný postup přípravy a charakterizace systémů na bázi iontového páru obsahujícího septonex.
- 3) Provedení experimentů zaměřených na charakterizaci formulovaných vezikulárních systémů zejména na membránové vlastnosti.
- 4) Posouzení zvoleného systému jako potenciálního nosiče biologicky aktivních látek.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Katarína Vajcíková
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto práca popisuje možnosti stanovenia membránových vlastností vezikulárnych systémov tvorených amfifilnými iontovými párami (IPA), ktoré boli pripravené zmiešaním kladne a záporne nabitými povrchovo aktívnymi látkami, konkrétne kladne nabitým tenzidom karbethependecinium bromidom (Septonex) a záporne nabitým dodecylsulfátom sodným s prídavkom dioktadecyldimetylamónium chloridu a cholesterolu z dôvodu zvýšenia stability. Takéto systémy sú potenciálnymi nosičmi liečiv a teda ich dôsledná charakterizácia je veľmi dôležitá pre ďalší výskum. V tejto práci sú popísané možnosti štúdia membránových vlastností takýchto systémov pomocou spektrometrických metód, konkrétne fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie, ktorými bola zisťovaná fluidita a solvatácia dvojvrstvovej membrány v závislosti na množstve pridaného cholesterolu a zmene teploty. Ďalej bola sledovaná veľkosť a stabilita pripravených vezikulárnych systémov vytvorených z nových amfifilných párov pomocou techniky dynamického a elektroforetického rozptylu svetla a nakoniec zistená teplota fázového prechodu použitím metódy diferenčnej skenovacej kalorimetrie.

Kľúčové slová

Amfifilný iontový pár, kataniontový vezikulárny systém, dynamický rozptyl svetla, zeta potenciál, koeficient polydisperzity, fluorescenčná anizotropia, generalizovaná polarizácia, DPH, Laurdan, diferenčná skenovacia kalorimetria

ABSTRACT

This work describes the possibility of determining the membrane properties of vesicular systems formed by ion pair amphiphile (IPAs), which were prepared by mixing positively and negatively charged surfactants, namely the positively charged surfactant carbethopendecinium bromide (Septonex) and negatively charged surfactant sodium dodecyl sulphate with the addition of dioctadecyldimethylammonium chloride and cholesterol for stability enhancement. Such systems are potential drug carriers and hence their careful characterization is very important for further research. In this work, the possibilities of studying the membrane properties of such systems using spectrometric methods, namely fluorescence anisotropy and generalized polarization, by which the fluidity and solvation of the bilayer membrane were detected as a function of the amount of added cholesterol and the change in temperature, are described. The size and stability of the prepared vesicular systems formed from the new amphiphilic pairs were investigated by dynamic and electrophoretic light scattering, and finally, the phase transition temperature was detected using differential scanning calorimetry method.

Keywords

Ion pair amphiphile (IPA), catanionic vesicular system, dynamic light scattering, zeta potential, polydispersity index, fluorescence anisotropy, generalized polarization, DPH, Laurdan, differential scanning calorimetry

VAJCÍKOVÁ, Katarína. *Studium membránových vlastností kataniontových vezikul z nových iontových amfifilních párů SEPT-DS*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148066>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcemu svojej diplomovej práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné rady a čas, ktorý mi venoval na konzultáciách a pri spracovávaní diplomovej práce. Veľké ďakujem patrí aj Ing. Martine Havlikovej za pomoc pri práci v laboratóriu, odborný dohľad a ľudský prístup v priebehu riešenia diplomovej práce.

Taktiež by som chcela poďakovať rodine, partnerovi a priateľom za podporu počas celého štúdia a za to, že vďaka nim sa moje sny môžu stávať skutočnosťou.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Povrchovo aktívne látky	9
2.2	Kationické tenzidy	9
2.2.1	Septonex	10
2.2.2	Dioktadecyldimetylamónium chlorid	10
2.3	Anionické tenzidy	10
2.3.1	Dodecylsulfát sodný	10
2.4	Samosporiadavanie tenzidov	11
2.5	Vezikuly	13
2.5.1	Kataniontové vezikulárne systémy	13
2.5.2	Amfifilné iontové páry	14
2.5.3	Cholesterol ako membránový stabilizátor	15
2.6	Štúdium membránových vlastností	15
2.7	Fluorescencia	17
2.7.1	Fluorescenčné zákony	18
2.7.2	Fluorofóry	19
2.7.3	Anizotropia fluorescencie	20
2.8	Dynamický rozptyl svetla	23
2.8.1	Stanovanie veľkosti častíc	23
2.8.2	Inštrumentácia DLS	24
2.9	Elektroforetický rozptyl svetla a stanovenie zeta potenciálu	25
2.10	Diferenčná skenovacia kalorimetria	26
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	27
3.1	Využitie fluorescencie Laurdanu na sledovanie zmien fluidity fosfolipidovej membrány	27
3.2	Vplyv cholesterolu na stabilitu kladne nabitých kataniontových vezikúl	27
3.3	Účinky cholesterolu na štruktúru a tekutosť membrán lipozómov a kataniontových vezikúl	28
3.4	Vplyv cholesterolu na membránové vlastnosti kataniontových párov amfifilných vezikúl pri rôznych teplotách	29

4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1	Použité chemikálie	31
4.2	Použité prístroje	32
4.3	Zhrnutie cieľov práce	33
4.4	Pracovné postupy	33
4.4.1	Príprava zásobného prášku IPA	33
4.4.2	Príprava vzoriek IPA s prídavkom kladne nabitého tenzidu a rôznymi obsahmi pridaného cholesterolu.....	34
4.4.3	Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál.....	35
4.4.4	Príprava značených vezikúl fluorescenčnými sondami.....	35
4.4.5	Štúdium membránových vlastností kataniontových vezikulárnych systémov	35
4.4.6	Príprava micelárnych systémov Septonex a SDS značených fluorescenčnými sondami	36
4.4.7	Meranie teploty fázového prechodu pomocou techniky diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie	36
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	37
5.1	Veľkosť a stabilita vezikulárnych systémov s rôznym obsahom cholesterolu ...	37
5.2	Štúdium membránových vlastností kataniontových vezikulárnych systémov s prídavkom cholesterolu.....	40
5.2.1	Určenie hydratácie membrány pomocou výpočtu generalizovanej polarizácie	40
5.2.2	Určenie mikroviskozity membrány prostredníctvom fluorescenčnej anizotropie.....	42
5.2.3	Štúdium membránových vlastností micel tvorených tenzidmi Septonex a SDS	44
5.3	Meranie fázového prechodu pomocou DSC	45
6	ZÁVER.....	47
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	49
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	55
9	PRÍLOHA	56

1 ÚVOD

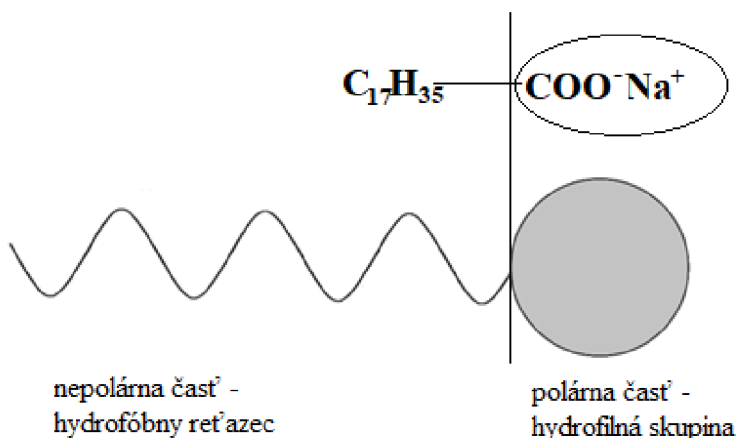
Kataniontové vezikulárne systémy sú v posledných rokoch cieľom mnohých výskumov ako potenciálne nosičové systémy pre cieleň transport liečiv, vitamínov, či napr. DNA. Ich výhodou sú pomerne nízke náklady na prípravu, avšak tieto systémy vykazujú oproti lipozómom nižšiu stabilitu a ich výskum je stále v začiatkoch. Kataniontové vezikulárne systémy použité v tejto práci sa skladajú z amfifilných iontových párov (IPA) tvorených opačne nabitými povrchovými látkami a to konkrétne karbethopendecinium bromidom (Septonex) a záporne nabitým dodecylsulfátom sodným. Práve z dôvodu zvýšenia fyzikálnej stability bol pridaný dvojreťazcový surfaktant dioktadecyldimetylamónium chlorid a cholesterol. Cholesterol má pri vhodne zvolených koncentráciách stabilizačný efekt na dvojvrstvové membrány, ktoré tvoria celý vezikulárny systém. Správne zvolený prídavok cholesterolu je však kľúčový, v malej koncentrácii nevykazuje požadovaný efekt a naopak vo veľmi vysokých koncentráciách spôsobuje jeho nadmerné množstvo destabilizačný efekt.

V tejto práci boli sledované membránové vlastnosti kataniontových vezikulárnych systémov s rôznymi prídavkami mol. % cholesterolu pri rôznych teplotách. Navrhnutými technikami bola sledovaná fluidita (tekutosť) vnútornej časti membrány prostredníctvom fluorescenčnej anizotropie s použitím sondy DPH. Využitím výpočtu hodnoty generalizovanej polarizácie fluorescenčnej sondy Laurdan boli získané informácie o vonkajšej časti membrány, a teda o hydratačnom obale vezikuly. Veľkosť častíc jednotlivých vezikulárnych systémov a ich stabilita boli skontrolované technikami dynamického a elektroforetického rozptylu svetla a jednotlivé výsledky vyhodnotené a diskutované optimálne množstvo cholesterolu pri príprave kataniontových vezikulárnych systémov tvorených novými amfifilnými iontovými párami tvorenými z tenzidov Septonex a SDS ako potenciálne nosiče liečiv pre ďalší výskum.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Povrchovo aktívne látky

Tenzidy (povrchovo aktívne látky), sú látky, ktoré znižujú povrchové napätie rozpúšťadiel. Patria medzi organické zlúčeniny, ktoré sa už pri nízkej koncentrácii hromadia na medzifázovom rozhraní, teda hranici medzi dvoma nemiesiteľnými fázami a tým dokážu znížiť voľnú medzifázovú energiu sústavy [1]. Schopnosť tenzidov hromadiť sa na fázovom rozhraní je spôsobená štruktúrou ich molekúl, ktorú označujeme ako amfifilnú. Na obr. 1 je zobrazený jeden z používaných tenzidov v praxi, a to stearan sodný, na príklade ktorého je vidieť, že tenzidy tvoria dve základné časti. Polárna časť (hlava), teda hydrofilná skupina, ktorá má veľkú afinitu k vode a nepolárna časť (tzv. chvostík), ktorý je najčastejšie tvorený alkylovým alebo alkylarylovým zbytkom, má naopak veľkú afinitu k nepolárnym rozpúšťadlám. Alkyl môže byť buď lineárny, alebo rozvetvený, avšak častejšie a optimálnejšie z hľadiska biologickej rozložiteľnosti sú lineárne alkylové zbytky s obsahom uhlíkov v intervale 8 až 22 (najčastejšie však 12 až 18) [2].



Obr. 1: Štruktúra tenzidu na príklade stearanu sodného.

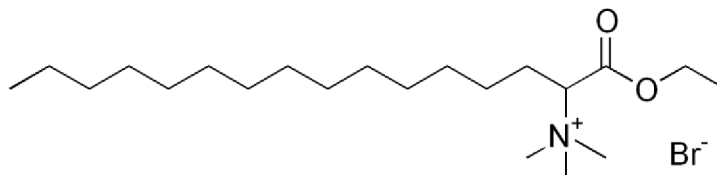
Tieto povrchovo aktívne látky môžeme klasifikovať na základe mnoho hľadísk, napríklad na základe iontového charakteru, teda hydrofilnej časti, kedy ich delíme na ionické, ktoré sa ďalej delia na anionické, kationické a amfotérne a tenzidy neionické, ktoré sa ďalej delia na oxyethylenáty a polyhydroxylzlučeniny [1].

2.2 Kationické tenzidy

Povrchovo aktívnou časťou kationického tenzidu je kation. Je to najčastejšie dusíkový atóm vo forme soli amínu (primárneho, sekundárneho, terciárneho), alebo vo forme kvartérnej amóniovej soli, teda chloridy alebo methosulfáty. Soli alkylamínov sú tiež kationickými tenzidmi, ale iba v kyslej oblasti, pri stredných alebo vyšších hodnotách pH strácajú kationický charakter (soľ amínu prechádza na amín, ktorý je následne vylúčený z roztoku). Kationické tenzidy nemajú detergentné vlastnosti, pretože sa svojou kladne nabitou časťou molekuly adsorbujú na záporne nabitú povrch, čo je podstatou ich antistatického, zmäkčovacieho a mikrobicídneho účinku [1,2].

2.2.1 Septonex

Septonex (karbethodecínium bromid), zobrazený na obr. 2 je kvartérna amóniová zlúčenina, s molekulovou hmotnosťou 422,49 g/mol, ktorú zaradíme medzi kationické tenzidy. Za bežných podmienok je to biely až nažltlý kryštalický prášok, ktorého vodný roztok pri pretrepaní silne pení. Je ľahko rozpustný vo vode, 96 % liehu a v chloroforme. Používa sa ako dezinfekčná látka či antiseptikum [3]. Tento tenzid má baktericídny účinok na gram-pozitívne baktérie a tento účinok klesá s klesajúcim pH. Naopak alkohol túto účinnosť zvyšuje [4].

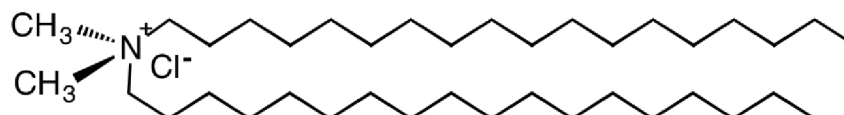


Obr. 2: Štruktúra Septonexu [5].

2.2.2 Dioktadecyldimetylamónium chlorid

Dioktadecyldimetylamónium chlorid skrátene DoDAC, zaradíme medzi kvartérne amoniové soli. Tento kladne nabitý dvojreťazcový surfaktant je za laboratórnych podmienok biela pevná látka šupinkovitého charakteru s molekulovou hmotnosťou 586,64 g/mol. Môžeme ho nájsť ako súčasť v mnohých dezinfekčných či čistiacich prostriedkoch, kde sa vyskytuje ako prísada do kozmetiky a vlasových kondicionérov vďaka svojim antistatickým účinkom [6].

Tento dvojreťazcový tenzid sa využíva ako stabilizačné činidlo pri príprave roztoku vezikulárnych systémov, tým že zvyšuje stabilitu systému. Udeľuje totiž povrchu kladný náboj, čo vedie k zvýšeniu elektrostatického odpudzovania medzi jednotlivými časťami membrán vezikúl [7].



Obr. 3: Štruktúra DoDAC [8].

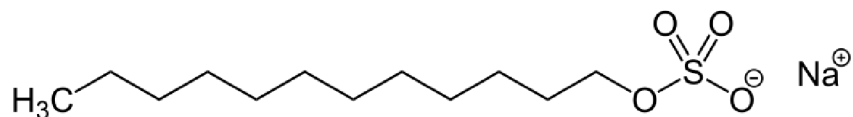
2.3 Anionické tenzidy

Anionické tenzidy sa podľa typu hydrofilnej skupiny delia na karboxyláty (-COO⁻), sulfáty (-OSO₃⁻), sulfonáty (-SO₃⁻), fosfáty (-OPO₃H⁻) a fosfonáty (-PO₃H⁻). Vo vodnom prostredí sú disociované na záporne nabitý ión a tým podporujú sorbciu nečistôt, ktoré väčšinou nesú náboj kladný. Využitie nachádzajú ako súčasť výrobkov pre osobnú hygienu, pracie a čistiace prostriedky, takisto v kozmetických a čistiacich prostriedkoch, kde pôsobia ako emulgátory [9].

2.3.1 Dodecylsulfát sodný

Dodecylsulfát sodný zaradíme medzi anionické povrchovo aktívne látky, ako zobrazuje jeho štruktúra na obr. 4. Skladá sa z 12 uhlíkového nepolárneho reťazca pripojeného k polárnej záporne nabitej sulfátovej skupine. Molekulová hmotnosť SDS je 288,37 g/mol [10]. SDS je neprchavá, vo vode rozpustná látka s rozdeľovacím koeficientom (log_{pow} = 1,6). Nachádza sa v kozmetike pri rozpúšťaní a odstraňovaní nečistôt, ale používa sa napríklad aj

ako emulgátor a prísada, ktorá umožňuje tvorbu peny. Nájde ho teda v šampónoch, kondicionéroch, mydlách, čistiacich kozmetických prípravkoch a podobne [11].

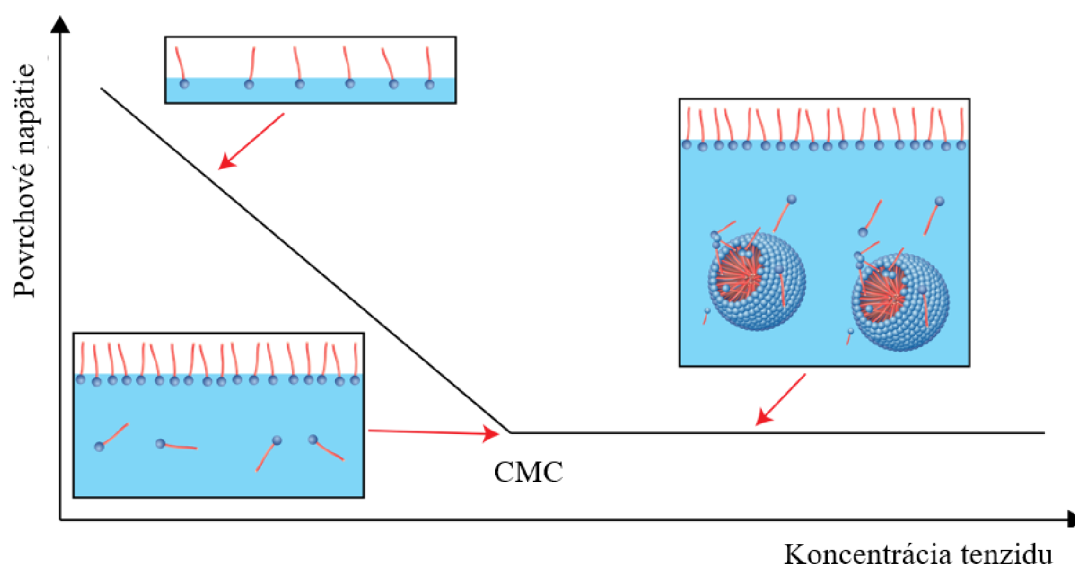


Obr. 4: Štruktúra SDS [12].

2.4 Samousporiadavanie tenzidov

Fyzikálne vlastnosti roztokov tenzidov v závislosti na ich koncentrácii vykazujú zlom, ktorý u nich nastáva vždy pri rovnakej koncentrácii. Ide o fyzikálne vlastnosti ako molárna vodivosť, povrchové napätie, či osmotický tlak [2].

Táto koncentrácia sa nazýva kritická micelárna koncentrácia, z angl. *critical micellar concentration* (CMC). Je to koncentrácia povrchovo aktívnej látky, pri ktorej sa koncentrácia tenzidu ako jednotlivých molekúl už nezvyšuje, roztok je nimi tzv. nasýtený a začínajú sa vytvárať micely. Pohybuje sa obvykle v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-3} mol/dm³. Pre roztok povrchovo aktívnej látky ju možno určiť meraním povrchového napätia pri rôznych koncentráciách. V logaritmickom grafe povrchového napätia v závislosti od koncentrácie povrchovo aktívnej látky sa nachádzajú dve lineárne oblasti, pod a nad CMC (viď obr. 5). CMC sa preto môže odčítať v mieste priesečníka extrapoláciou príslušných vyrovnávacích čiar [13].



Obr. 5: Povrchové napätie ako funkcia koncentrácie povrchovo aktívnej látky [13].

Micely patria medzi najjednoduchšie samousporiadávajúce sa látky. V dnešnej dobe ich vieme charakterizovať pomocou rozličných techník a postupov a tieto poznatky poskytujú základ pre pochopenie zložitejších koloidných systémov, ako napríklad lipozómov či vezikúl. Môžu nadobúdať rôzne tvary, kedy usporiadanie tenzidov v roztoku závisí od charakteru použitého rozpúšťadla. Najčastejší, guľovitý tvar vzniká v polárnom prostredí, teda napr. vo vode. Použitím takehoto rozpúšťadla vznikajú aj micely laminárne či valcovité. V prípade použitia nepolárneho rozpúšťadla vzniknú tzv. reverzibilné (obrátené micely) [14].

Tvorba micel, agregácia, je pochod, kedy sú malé častice (v našom prípade molekuly povrchovo aktívnych látok) zhromažďované do väčších útvarov (agregátov) bez toho, aby dochádzalo k narušeniu fázového rozhrania medzi jednotlivými časticami a disperzným prostredím, či zmenšení plochy ich povrchu. Takéto častice si zachovávajú svoju „identitu“ a strácajú iba svoju kinetickú nezávislosť. Agregát sa teda pohybuje ako celok, tzv. kinetická jednotka [15]. Jedným z charakteristických znakov micely, ktorý udáva počet molekúl tenzidu ňou tvorených je tzv. agregáčn (asociačné) číslo. Všeobecne útvar zložený z molekúl rovnakého tenzidu, môže mať rôzne agregáčn (asociačné) číslo v závislosti na jeho tvare. Platí, že agregáčn (asociačné) číslo stúpa so zvyšujúcou sa dĺžkou hydrofóbneho reťazca a naopak klesá s narastajúcou veľkosťou hydrofilnej časti tenzidu. V praxi sa ako metóda stanovenia agregáčného čísla využíva metóda rozptylu svetla, či technika zhašania fluorescencie, ktoré okrem hodnoty agregáčného čísla poskytujú informácie o distribúcii veľkosti micel, či odhad ich tvaru [16].

Rozhodujúcim faktorom pre usporiadanie tenzidov v roztoku je tzv. kritický zbaľovací parameter (P_s). Je to bezrozmerná veličina daná rovnicou:

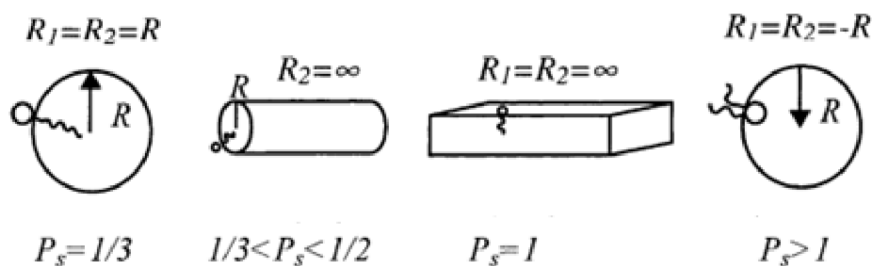
$$P_s = \frac{v}{a_o \cdot l_c}, \quad (1)$$

kde v je objem hydrofóbnej časti tenzidových molekúl, a_o je plocha hydrofilných hláv a l_c udáva maximálnu dĺžku hydrofóbneho reťazca.

Hodnota kritického zbaľovacieho parametra v závislosti na priestorovom usporiadaní povrchovo aktívnej látky je uvedená v *Tab. 1* a na obr. 6 je zobrazené geometrické usporiadanie častíc v závislosti na tomto parametri.

Tab. 1: Priestorové usporiadanie tenzidov na základe hodnoty kritického zbaľovacieho parametra [17].

Hodnota P	Priestorové usporiadanie
$P < 0,33$	Sférické micely
0,33 až 0,50	Cylindrické alebo diskové micely
0,50 až 1,00	Vezikuly
1,00	Planárne dvojvrstvé membrány
> 1	Reverzné (obrátené) micely

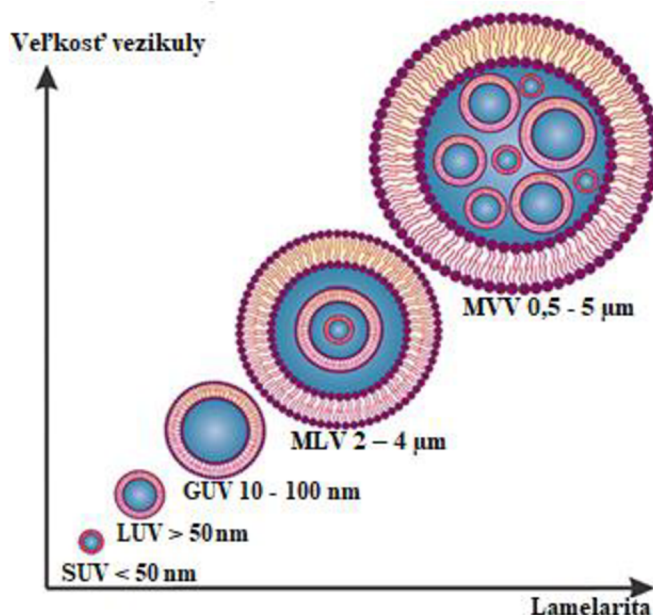


Obr. 6: Hodnota kritického zbaľovacieho parametra prezentovaná geometrickými modelmi [18].

2.5 Vezikuly

Vezikulárne systémy sú vysoko usporiadané zoskupenia, ktoré sa vytvoria, keď sa určité amfifilné látky dostanú do styku s rozpúšťadlom (vodou) a hodnota kritického zbal'ovacieho parametra je v rozmedzí 0,50 až 1,00. Môžu byť tvorené lipidmi (lipozomálne vezikuly), povrchovo aktívnymi látkami, či napríklad blokovými kopolymérmi. Lyofilná časť týchto amfifilných molekúl (hlavičky) budú po kontakte s vodou ochotne smerovať k rozpúšťadlu a naopak hydrofóbna časť (chvostíky) sa budú vyznačovať neochotou kontaktu s rozpúšťadlom a vytvoria tzv. dvojvrstvu [19].

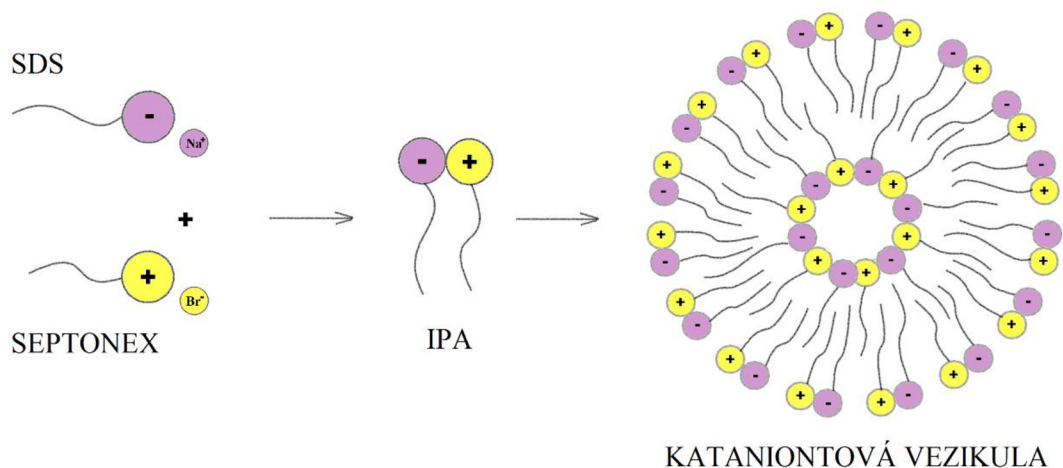
Vezikula môže byť tvorená jednou takouto dvojvrstvou amfifilných látok (unilamelárna) či viacerými (multilamelárna). Ich veľkosť sa môže pohybovať v rozmedzí mikro až nano-rozmerov. Unilamelárne vezikuly zaujímajú veľkosť ≤ 100 nm a delia sa na SUV, LUV a GUV (Small/Large/Giant unilamellar vesicles), a multilamelárne vezikuly (MLV či MVV) s viacerými dvojvrstvovými membránami vo svojom vnútri, ktoré môžu dosahovať veľkostí až 5 000 nm [20]. Na obr. 7 sú znázornené rôzne veľkosti vezikúl, na ktorom je zjavné, že s rastúcou veľkosťou vezikuly rastie aj jej lamelarita.



Obr. 7: Rôzne veľkosti vezikúl [21].

2.5.1 Kataniontové vezikulárne systémy

Prvý príklad spontánnej tvorby kataniontových vezikúl bol uvedený bol autormi *Kaler a kol.* Následne na to bol v roku 2010 tento termín zavedený. Spojením opačne nabitých povrchovo aktívnych látok, teda zmiešaním kationových a aniónových jednoreťazcových tenzidov za určitých dodržaných podmienok prípravy vznikajú amfifilné iontové páry, tzv. IPA (z angl. *ion pair amphiphile*). Sú to napríklad fyzikálne faktory zodpovedné za agregáciu vo vodnom prostredí (hydrofóbne a Van der Waalsove interakcie medzi uhl'ovodíkovými reťazcami a elektrostatické interakcie medzi nabitými hlavami). Takéto amfifilné iontové páry potom tvoria už spomínané kataniontové vezikulárne systémy, ktoré môžu mať rôznu veľkosť, podľa toho akými povrchovo nabitými látkami sú tvorené, ako zobrazuje obr. 8 [23].



Obr. 8: Vznik kataniontovej vezikuly spojením kladne a záporne nabitého tenzidu.

Požadovaná veľkosť pre častice eventuálne použiteľné ako nosiče liečiv je cca 100 nm. Veľkosť a stabilita častíc sa dá ovplyvniť už pri ich príprave, napríklad použitím vhodných parametrov ultrazvukovej dispergácie. Kritický zbalovací parameter je pri tvorbe kataniontových vezikúl v prípade zmesí aniontových a kationtových povrchovo aktívnych látok väčší, čím sa dá zdôvodniť, že tieto amfifilné iontové páry uprednostňujú tvorbu vezikúl pred micelami [24].

Vezikuly tvorené povrchovo aktívnymi látkami sa v posledných rokoch stali predmetom výskumu cieleného transportu látok, ako sú liečivá, či vitamíny. Zistilo sa, že vezikuly majú význam v imunológii, membránovej biológii, diagnostických technikách a najnovšie aj v genetickom inžinierstve. Vezikuly môžu zohrávať významnú úlohu pri modelovaní biologických membrán a pri transporte a celení aktívnych látok [20]. Ďalším predmetom výskumu je interakcia s hyaluronanom, telu vlastného polysacharidu [25].

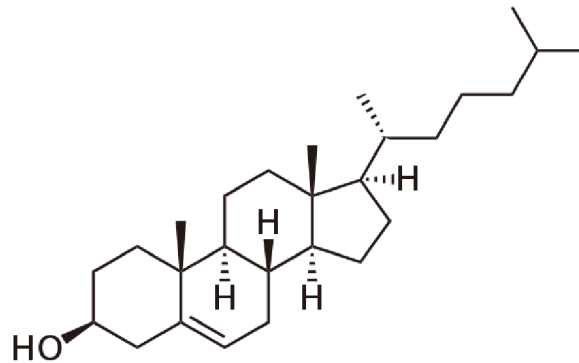
2.5.2 Amfifilné iontové páry

Existujú tri hlavné metódy prípravy amfifilných povrchovo aktívnych látok. Typické príklady formovania IPA sú iónovou výmenou, metódou zrážania a extrakčnou metódou, pričom všetky tri tieto metódy zahŕňajú miešanie ekvimolárnych pomerov dvoch opačne nabitých surfaktantov [18].

Metóda iontovej výmeny zahŕňa použitie vhodnej iontovo-výmennej živice, kedy ide o premenu aniónových a kationtových povrchovo aktívnych látok na ich protonizovanú a hydroxidovú formu. Následne sa zmiešaním týchto upravených látok vykoná acidobázická reakcia, pri ktorej je získaná IPA. Pri **extrakčnej metóde** sa IPA pripravuje zmiešaním ekvimolárnych množstiev opačne nabitých povrchovo aktívnych látok vo vode, po ktorej nasleduje extrakcia vhodným organickým rozpúšťadlom (napríklad chloroformom). Je docielené oddelenie tzv. chloroformovej fázy, v ktorej je rozpustená samotná IPA a vodnej fázy, v ktorej sa nachádzajú protiionty. **Metóda zrážania** sa odlišuje tým, že IPA sa získava ako zrazenina a zvyšné protiionty sú odstránené opakovaným premývaním vodou a následným odstredovaním [23].

2.5.3 Cholesterol ako membránový stabilizátor

Cholesterol je neoddeliteľnou súčasťou membrán eukaryotických buniek. Je to steroidná látka, ktorá má v tele mnoho významov, ako napríklad tvorbu žlčových kyselín, biosyntézu steroidných hormónov, či syntézu vitamínu D. Ako môžeme vidieť na obr. 9, cholesterol nemá náboj, ale vďaka OH skupine je slabo amfifilný. Významne ovplyvňuje štruktúru a fyzikálne vlastnosti membrán, kedy hlavným faktorom, ktorý podmieňuje zmenu fyzikálnej stability dvojvrstvových membrán, je práve štruktúra cholesterolu [7, 26].



Obr. 9: Štruktúra cholesterolu [27.]

Cholesterol je kľúčovou molekulou pri riadení tekutosti a usporiadania membrán a ďalších fyzikálne-chemických parametrov. Pridanie cholesterolu bunečnú membránu stabilizuje, ale zároveň ju do určitej miery necháva fluidnú, keďže fluidita je pre správne fungovanie buniek nepostrádateľná. Hrá tiež regulačnú úlohu v rezistencii voči antibiotikám a imunitnej odpovedi buniek proti vírusom tým, že stabilizuje membránu proti štrukturálnemu poškodeniu [28]. Zabudovanie cholesterolu do dvojvrstvovej membránovej štruktúry spôsobí zväčšenie vzdialenosti medzi nabitými polárnymi skupinami povrchovo aktívnych látok, ktoré sa navzájom odpudzujú. Na druhej strane zníži tendenciu protiiontov viazať sa na povrchu vezikuly, čo vedie k zvýšeniu jej nábojového charakteru. Prítomnosť cholesterolu v dvojvrstvových štruktúrach vezikúl s obsahom dvojreťazcového kladného surfaktantu zlepšuje inter-vezikulárnu elektrostatickú odpudivosť a taktiež upravuje intra-molekulové balenie, čím sa výrazne zlepši fyzikálna stability vezikuly [7].

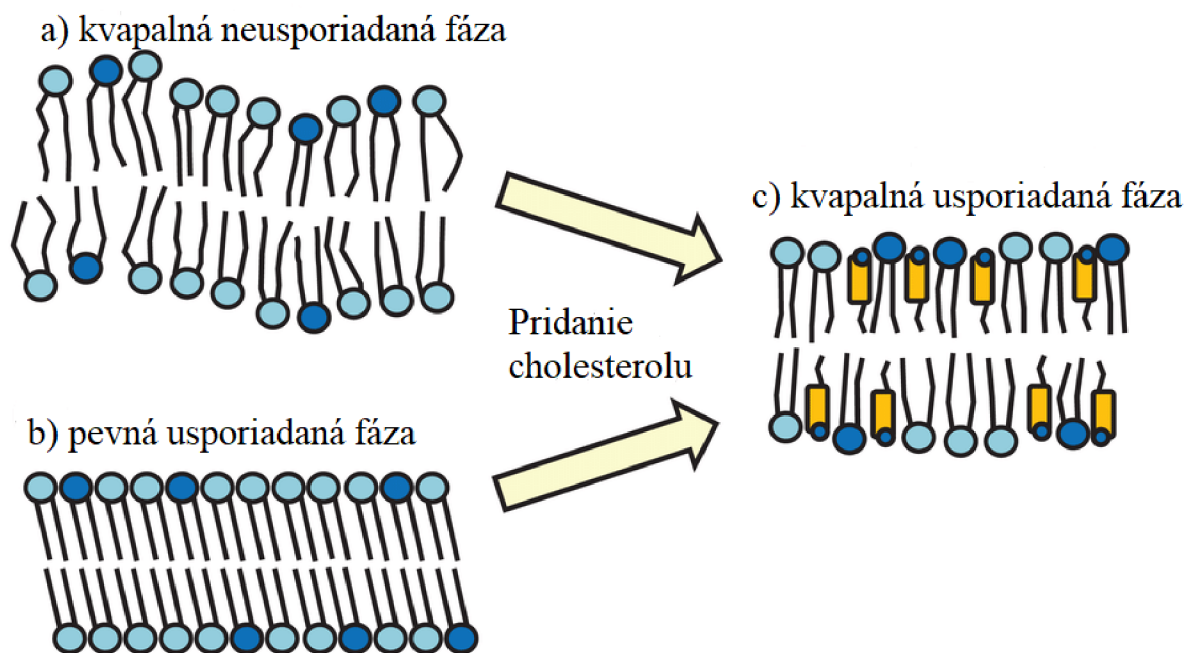
2.6 Štúdium membránových vlastností

Biologické membrány tvoria všadeprítomné ohraničujúce štruktúry, ktoré obklopujú a rozdeľujú všetky bunky a organely. Dvojvrstvé usporiadanie je znak, ktorý je spoločný pre všetky biologické membrány. Od roku 1839, keď Schleiden a Schwann uverejnili teóriu bunky, sa objavilo množstvo teoretických modelov štruktúry membrán. Experimentálne modely poskytujú pohľad na pohybovú dynamiku a statickú štruktúru niektorých izolovaných kompartmentov biologických membrán. Vezikuly sú len jedným typom z mnohých experimentálnych modelov biomembrán [29].

Predpokladá sa, že látky tvoriace dvojvrstvovú membránu, ako napríklad tenzidy vo vezikulárnom systéme majú za fyziologických podmienok tendenciu existovať v tekutej, homogénnej fáze. Obsah prídavných látok, ktoré sú ich súčasťou však môže za správnych

podmienok spôsobiť prechod fázovými prechodmi. Podobne, ako známe prechody medzi kvapalnou, pevnou a plynnou fázou jednoduchších systémov, tieto fázové prechody predstavujú zmeny entropie systému prostredníctvom reorganizácie zložiek systému v reakcii na zmeny voľnej energie systému [30].

Kvapalná–neusporiadaná fáza L_d (z angl. *liquid-disordered phase*) je vysoko tekutý stav membrány, ktorej fluidita je značná a vyznačuje sa nepravidelným usporiadaním jednotlivých kompartmentov. Nastáva to napríklad v prípade, že reťazec obsahuje dvojité väzby a je teda výrazne znížená teplota topenia dvojvrstvy. Naopak vo vezikulách pozostávajúcich z tenzidov tvorených dlhšími uhlíkovými reťazcami sú silnejšie Van de Waalsove interakcie. To vedie k tesnejšiemu usporiadaniu s vyššou teplotou topenia. Takáto fáza sa nazýva **pevná–usporiadaná fáza S_o** (z angl. *solid-ordered phase*) a vyznačuje sa obmedzenou fluiditou (viz obr. 10). Tretia fáza, tzv. **kvapalná– usporiadaná fáza L_o** (z angl. *liquid-ordered phase*) je akýsi hybrid kvapalnej neusporiadanej a pevnej usporiadanej fáze. Pri dostatočne vysokej koncentrácii sterolov, ako napríklad cholesterolu, dochádza ku zmenám fluidity. Pridanie dostatočnej koncentrácie cholesterolu vedie k tesnejšiemu usporiadaniu kompartmentov. Na druhej strane to ale pôsobí proti nadmernej usporiadanosťi, ako je to u pevnej usporiadanej fáze. Výsledkom je teda kvapalná usporiadaná fáza s vlastnosťami usporiadanej gélovej fáze, ale čiastočne pretrvávajúca vo fluidnom stave [29, 30].

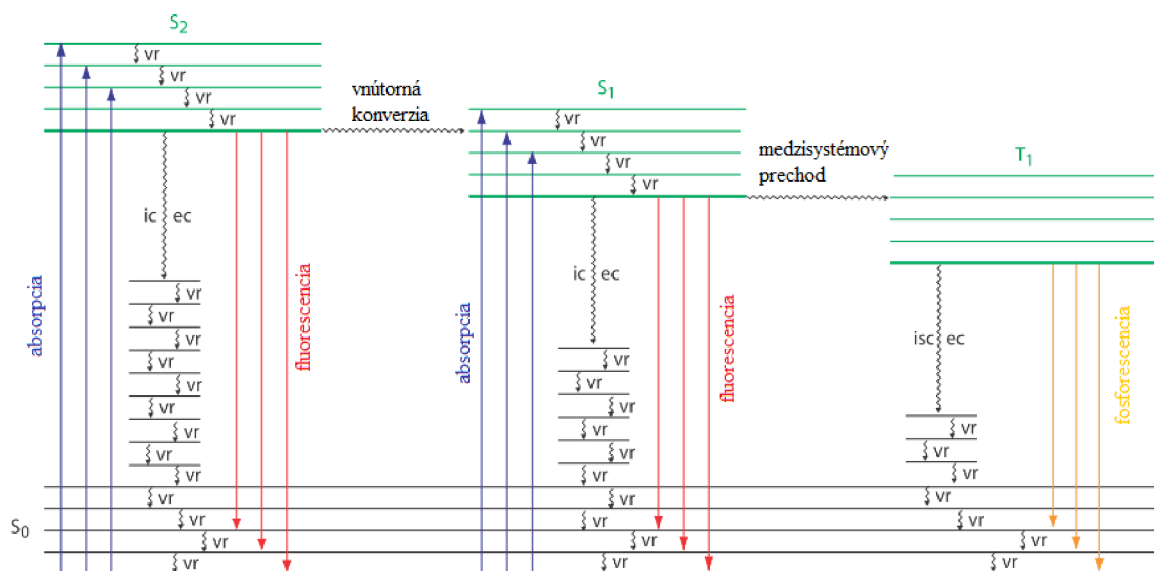


Obr. 10: Membránové fáze: a) kvapalná neusporiadaná fáza, b) pevná usporiadaná fáza, c) vznik kvapalnej usporiadanej fáze pridaním cholesterolu [31].

2.7 Fluorescencia

Fluorescencia je fotoluminiscenčný proces, pri ktorom molekuly niektorých látok absorbujú svetelné žiarenie určitej vlnovej dĺžky (excitácia) a časť takto získanej energie za veľmi krátky čas opäť emituje (emisía) vo forme svetla s dlhšou vlnovou dĺžkou, teda s nižšou energiou a inou farbou. Okamžitá, krátkodobá fotoluminiscencia sa nazýva fluorescencia, zatiaľ čo dlhšie trvajúca oneskorená fotoluminiscencia nesie názov fosforescencia [32]. Fluorescencia nastáva, keď dochádza k emisii žiarenia z excitovaného elektrónového stavu prostredníctvom jedného alebo viacerých spontánných energetických prechodov. Ako zobrazuje obr. 11, na ktorom je znázornený Perrin-Jablonskiho diagram, pri týchto procesoch dochádza vplyvom absorpcie elektromagnetického žiarenia k excitácii elektrónov na energeticky vyššiu hladinu (S_1) a následne dochádza k deexcitácii späť na hladinu základnú (S_0). Elektrón sa môže dostať späť do základného stavu viacerými spôsobmi a to konkrétne žiarivými a nežiarivými prechodmi. Žiarivé prechody sú fluorescencia a fosforescencia. V prípade fluorescence je emisía svetla po excitácii veľmi rýchla a po odstránení zdroja žiarenia fluorescencia okamžite zmizne. Fosforescencia sa vyznačuje tým, že emisía žiarenia prebieha pomaly, pretože elektróny sú v metastabilnom stave, dosahujú energetické hladiny, z ktorých sa nemôžu ľahko vrátiť na základnú úroveň. V prípade fosforescencie teda emisía žiarenia pretrváva určitý čas po odstránení zdroja žiarenia. Preto je čas zhasínania fluorescence a fosforescencie odlišný. Čas zhasínania je priemerný čas, počas ktorého je molekula v excitovanom stave, kým dôjde k emisii žiarenia, u fluorescence je $< 10^{-8}$ a pri fosforescencii je $> 10^{-8}$ sekundy [33, 34].

Pri nežiarivých prechodoch nedochádza k vyžiareniu fotónu a energia je rozptýlená napr. teplom. Príkladom je vnútorná konverzia, prechod, ktorý nastane medzi dvoma elektronickými stavmi rovnakej spinovej multiplicity [35].



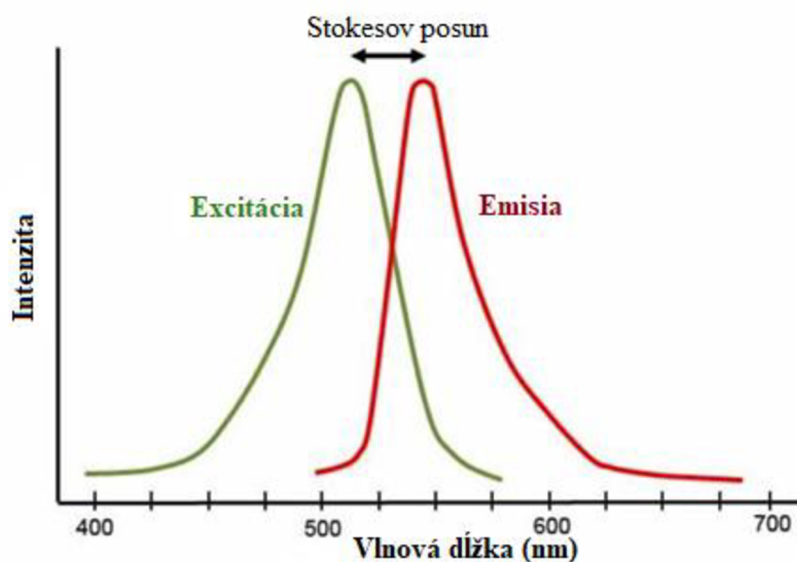
Obr. 11: Diagram energetických hladín molekuly zobrazujúci cesty deaktivácie excitovaného stavu: vr označuje vibračnú relaxáciu, ic je vnútorná konverzia, ec je vonkajšia premena a isc znázorňuje medzisystémový prechod [35].

Ďalším nežiarivým prechodom je napr. vibračná relaxácia, čo je prechod medzi vibračnými hladinami smerom k najnižšej energetickej hladine. Medzisyntémový prechod je nežiarivý prechod, pri ktorom dochádza k zmene multiplicity a nastáva, keď elektrón prejde zo stavu S1 (singletovej hladiny) do tripletového stavu (T1). Tento proces je ale málo pravdepodobný, pretože je spinovo zakázaný a teda trvá dlhšiu dobu ako vyššie opísané nežiarivé prechody [36].

2.7.1 Fluorescenčné zákony

Zrkadlové pravidlo – Tvar emisného spektra je zrkadlovým obrazom spektra absorbného. Tento symetrický charakter spektier je spôsobený rovnakými prechodmi v emisii a absorpcii a podobnosti energetických vibračných hladín S₀ a S₁ [33].

Stokesov posun – Označuje rozdiel medzi excitačnou a emisnou vlnovou dĺžkou. Emisné žiarenie má menšiu energiu ako excitačné, teda nastáva posun k vyšším vlnovým dĺžkam, čo vedie k posunu emisného spektra od excitačného smerom k infračervenej oblasti, ako zobrazuje obr. 12. Táto vlastnosť je využívaná pri použití fluorescenčných sond a farbív, kedy je vlnová dĺžka lasera použitého na excitáciu nižšia, ako vlnová dĺžka emitovaného fluorofóru [35].



Obr. 12: Znážornenie Stokesovho posunu [34].

Kashov zákon – Tento zákon priamo súvisí so Stokesovým posunom a toto pravidlo hovorí, že emisia fotónov nastáva v značnom výťažku iba z najnižšieho excitovaného stavu danej molekuly. Aby tohto stavu mohlo byť dosiahnuté, tak pred vlastnou emisíou fluorescenčného kvanta dochádza k vibračným prechodom a vnútornej konverzii, a to tak, že dochádza k excitácii (fluorescencii) z najnižšej vibračnej hladiny prvého excitovaného stavu, ako je vidieť v Perrin-Jablonskiho diagrame na obr. 11 [35].

Vavilovo pravidlo – dôsledkom Kashovho pravidla je Vavilovo pravidlo, ktoré hovorí, že kvantový výťažok luminiscencie a doba trvania excitovaného stavu molekúl vo všeobecnosti nezávisí od vlnovej dĺžky excitácie [35].

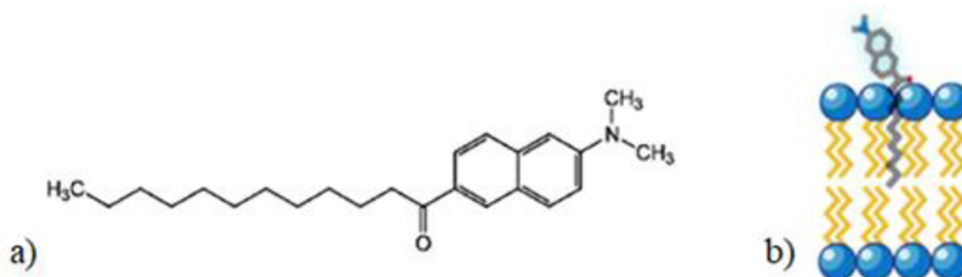
2.7.2 Fluorofóry

Fluorofóry (fluorescenčné farbivá) sú akékoľvek látky, ktoré po ožiarení svetlom určitej vlnovej dĺžky (z viditeľnej alebo UV oblasti) sú schopné spätne vyžarovať svetlo. Absorpciou svetla sú excitované elektróny, a vrátením do základného stavu sa prebytočná energia vyžiari ako svetlo. To spôsobí, že fluorofór začne svietiť v excitačnom svetle. Vyžarované žiarenie má nižšiu energiu a dlhšiu vlnovú dĺžku ako excitačné žiarenie. Vlastné fluorofóry sú zodpovedné za prirodzenú, tzv. autofluorescenciu. Nevlastné fluorochrómy sa po pridaní do systému viažu na cieľové štruktúry buď kovalentne (fluorescenčné značky), alebo nekovalentne (fluorescenčné sondy) [34]. Fluorescenčné sondy sú nevlastné fluorofóry, ktoré sa nekovalentne viažu na skúmanú štruktúru, pričom často menia svoje fluorescenčné vlastnosti. Správna voľba fluorescenčnej sondy je kľúčovou súčasťou experimentu fluorescenčnej spektroskopie, pretože jej vlastnosti umožňujú získať potrebné informácie. Pomocou rôznych fluorescenčných sond sa študujú vlastnosti biologických systémov súvisiacich s bunkovými membránami, ako sú napr. transport a metabolizmus lipidov v živých bunkách, membránový transport, membránový potenciál, či mikroviskozita membrán a tepelné fázové prechody [37].

2.7.2.1 Laurdan

Laurdan (6-dodekánoyl-2-dimetylamo naftalén) je jednou z najpoužívanejších fluorescenčných sond na rozpoznávanie fáz lipidových membrán, tj. na sledovanie prechodu lipidového gélu do tekutej kryštalickej fázy, ktorá vykazuje vysokú citlivosť na polaritu prostredia [38]. Laurdan vložený do lipidových membrán, vykazuje jedinečné vlastnosti v porovnaní s inými fluorescenčnými sondami, ako napr. citlivosť na fázové prechody, prítomnosť vody v membráne, čo nám poskytuje informácie o penetrácii vody, vlastnosti súvisiacej s fluiditou membrány [39].

Na obr. 13 je znázornený štruktúrny vzorec laurdanu. Jeho hydrofóbny koniec umožňuje jeho zabudovanie v lipidovej dvojvrstve. Naftalénová časť laurdanu je umiestnená smerom k rozpúšťadlu (vodnému prostrediu), čo umožňuje preskupenie dipólu rozpúšťadla a emisiu laurdanu. Špecifikou tejto sondy je existencia dvoch typov excitovaných stavov. Keď laurdan absorbuje žiarenie, vytvorí sa tzv. lokálne excitovaný stav LE (z angl. *locally excited*). Tento stav sa môže zmeniť na tzv. stav CT (z angl. *charge-transferred*), teda stav s preneseným nábojom, ktorý je energeticky menej bohatý. Toto preskupenie si vyžaduje energiu, a preto znižuje energiu excitovanej sondy, čo sa prejavuje červeným posunom v emisnom spektre, pretože membrána sa mení z gélovej na tekutokryštalickú fázu [41].



Obr. 13: a) Štruktúra laurdanu, b) Zabudovanie laurdanu do membrány [40].

Zmeny obsahu vody v membráne spôsobujú posuny v emisnom spektre laurdanu ktoré sa kvantifikujú výpočtom generalizovanej polarizácie (GP), ktorá je definovaná vzťahom:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}, \quad (2)$$

kde I_B označuje intenzitu fluorescencie emisného maxima v modrej oblasti spektra viditeľného žiarenia, I_R je intenzita fluorescencie emisného maxima v červenej oblasti spektra viditeľného žiarenia. Vypočítaná hodnota generalizovanej polarizácie potom určuje, či je vzorka v gélovej fáze [42, 43].

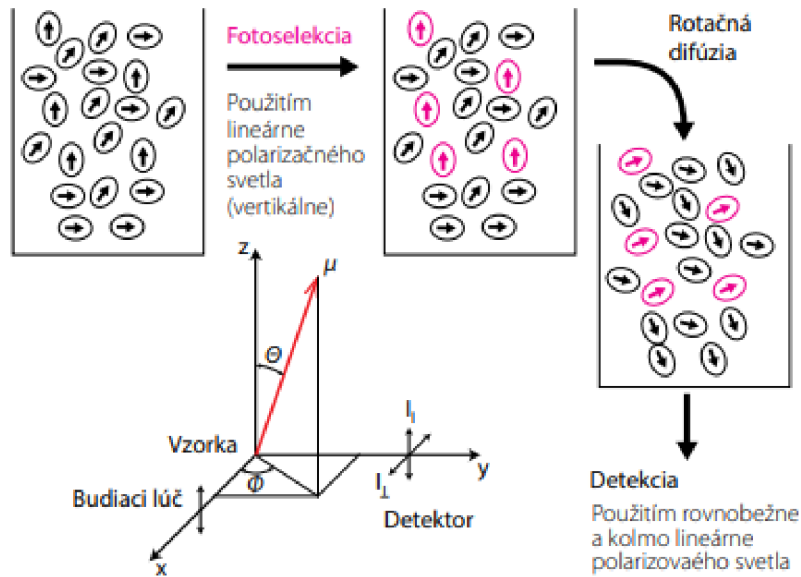
2.7.3 Anizotropia fluorescencie

Vo fyzike je anizotropia jav, pri ktorom sa fyzikálne vlastnosti látky menia v závislosti od smeru, v ktorom sa tieto vlastnosti merajú. Opakom je izotropia. Vo fluorescencii, ak k excitácii dochádza svetlom kmitajúcim v jednej rovine, fluorescenčná emisia sa často polarizuje a táto úroveň polarizácie emisie je vyjadrená veličinou anizotropia. Umožňuje kvantitatívnu analýzu interakcií medzi fluorescenčne označenými a neoznačenými molekulami, čo je kľúčový aspekt merania. Meranie anizotropie fluorescencie je využívané v lekárskech, fyzikálnych či chemických výskumoch., ako napríklad zmena fluidity membrány v rôznych podmienkach [44].

Pôvod polarizovanej fluorescencie je založený na existencii prechodových dipólových momentov pre absorpciu a emisiu žiarenia fluorofóru, kedy sú tieto momenty abstraktne orientované pozdĺž určitých smerov vnútri jeho chemickej štruktúry. Nie sú paralelné, zvierajú navzájom pevný uhol. Interakciu excitačného žiarenia s molekulou je možné popísať ako interakciu elektrickej zložky elektromagnetického poľa svetelnej vlny s absorpčným prechodovým momentom molekuly [45].

Pravdepodobnosť, že molekula absorbuje svetelné kvantum je priamo úmerná druhej mocnine kosínusu uhlu θ , ktorý zvierá vektor intenzity elektrického poľa s vektorom absorpčného prechodového momentu. Molekuly, ktoré majú prechodový moment paralelne orientovaný so smerom budenia ($\theta = 0$), sú excitované s maximálnou pravdepodobnosťou, naopak, pri $\theta = 90^\circ$ je pravdepodobnosť absorpcie nulová. Všeobecne sú teda po excitácii vybudené iba fluorofóry s nenulovým absorpčným prechodovým momentom, pričom táto pravdepodobnosť klesá s rastúcim odklonom od smeru budenia. Tento jav nazývaný fotoselekcia má za následok vyššie spomínanú priestorovú distribúciu vybudených molekúl. O tom, ako sa daná anizotropia prejaví v emisii, rozhodujú depolarizačné mechanizmy, a to hlavne rotačná difúzia (rotačný relaxačný čas fluorofóru). Doba života excitovaného stavu je dosť dlhá na to, aby sa vybudená molekula pohla. Tým sa smer emisného prechodového momentu zmení a molekula vyžiari do nového smeru, čím nastane pokles pôvodnej anizotropie [45].

Anizotropia závisí od viskozity prostredia, veľkosti molekuly (rotačná difúzia) a vlastnej rýchlosti molekuly. Z toho vyplýva, že v prostredí s nízkou viskozitou, kde fluorofóry nie sú brzdené vo svojom pohybe, sa anizotropia bude blížiť nule. Naopak, v prípade veľkej molekuly fluorofóru v prostredí s vysokou viskozitou je nameraná hodnota najvyššia [33].



Obr. 14: Princíp merania anizotropie fluorescence [45].

Jedným z vyjadrení anizotropie fluorescence je stupeň polarizácie p , ktorý sa vyjadruje ako:

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}, \quad (3)$$

kde pri paralelnej (kolmej) orientácii emisného a excitačného polarizátora meriame intenzitu emisie ako $I_{||}$ – vertikálna, emisná a I_{\perp} – horizontálna, excitačná.

Vzťah pre anizotropiu fluorescence potom je:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (4)$$

Tieto zložky sú ale v skutočnosti ovplyvnené citlivosťou detekčného systému a tiež kvantovým výťažkom fluorofóru a ďalšími faktormi. Vzťah je teda korigovaný faktorom:

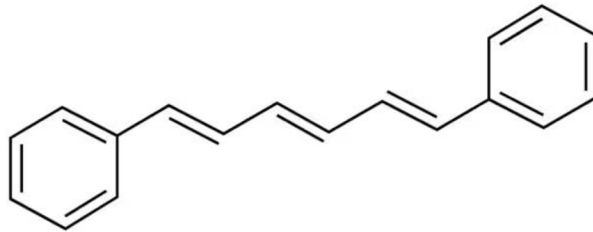
$$G = I_{hv} / I_{hh} \quad (5)$$

Indexy pri danej zložke označujú orientáciu excitačného a emisného monochromátora, ktorá je vertikálna alebo horizontálna. Výsledným vzťahom na výpočet anizotropie potom je:

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}} \quad (6)$$

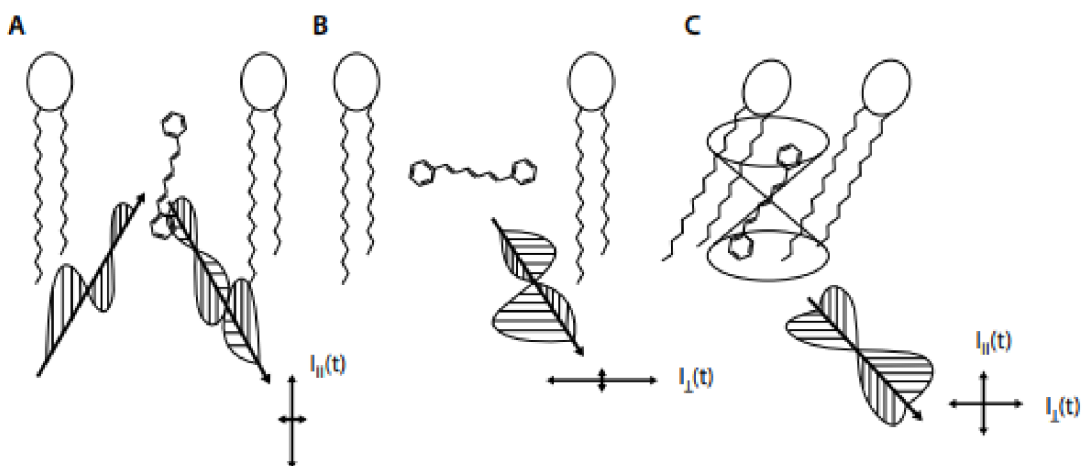
2.7.3.1 DPH

Fluorescenčná sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién, skrátene DPH, je sonda používaná pre stanovenie zmien dynamického stavu systémov obsahujúcich dvojvrstvovú membránu. Táto látka má molekulovú hmotnosť 232,32 g/mol a jej štruktúra je zobrazená na obr. 15 [46]. Je to hydrofóbna sonda, z čoho vyplýva, že má vysokú afinitu k hydrofóbnym oblastiam membrány. Je pre ňu charakteristické, že skoro nevykazuje fluorescenciu vo vodnom prostredí, zato v lipofilnom, membránovom prostredí áno, a to vo vysokej intenzite [47].



Obr. 15: Štruktúra molekuly DPH [48].

Pri žiarení vzorky so zabudovanou sondou DPH, bude svetlo absorbované molekulami DPH, ktoré sú orientované paralelne k smeru polarizovaného svetla. Ak interakcia DPH sondy s membránovými fosfolipidmi umožňuje jej voľnú rotáciu, bude sa orientovať horizontálne. V membránach je pohyb sondy obmedzený polohou fosfolipidov a sonda osciluje s membránou v obmedzenom rozsahu. Sonda sa pohybuje s fosfolipidmi v membráne, a preto sa bežne používa na meranie tekutosti (fluidity) membrány. Z toho vyplýva, že so zvyšujúcou sa nameranou anizotropiou fluorescencie DPH klesá fluidita prostredia a jeho usporiadanosť sa zvyšuje [49].



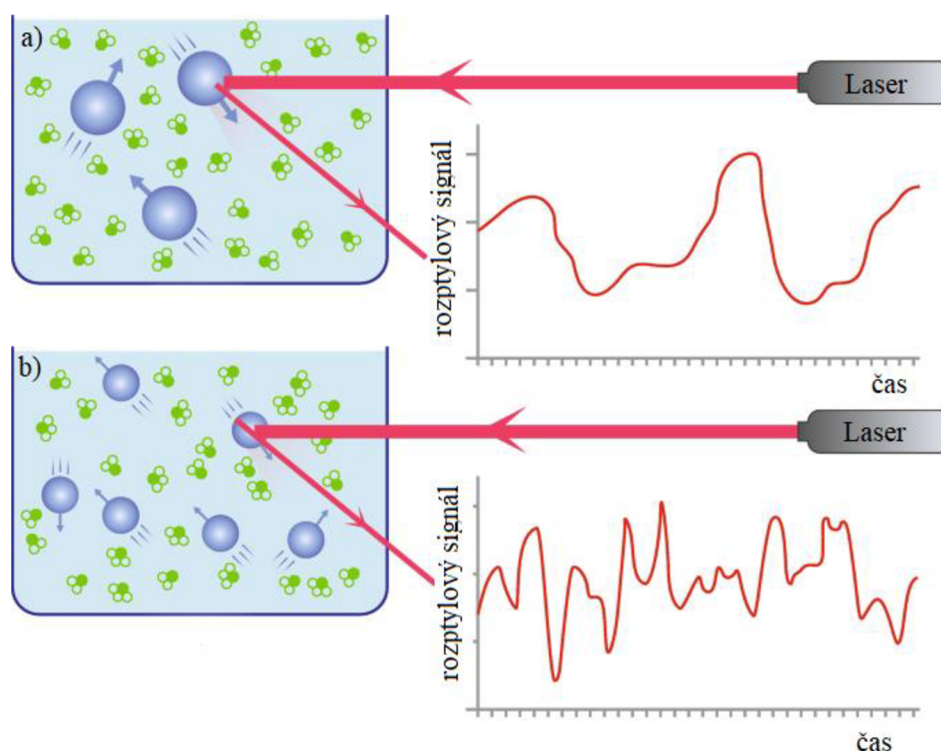
Obr. 16: Anizotropia fluorescencie sondy DPH pri možných umiestneniach jej molekúl v membránovej dvojvrstve [45].

2.8 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (z angl. *Dynamic light scattering*) je technika určovania profilu distribúcie častíc s veľkosťou zasahujúcou až do oblasti pod 1 nm. Medzi takéto častice radíme napr. disperzné, koloidné systémy alebo proteíny. Ide o neinvazívnu techniku merania veľkosti častíc, či molekulovej hmotnosti bez nutnosti predošlej kalibrácie [50].

2.8.1 Stanovanie veľkosti častíc

Typické aplikácie dynamického rozptylu svetla sú charakterizácia častíc, emulzií alebo molekúl, ktoré boli rozptýlené alebo rozpustené v kvapaline. Keď sú častice rozptýlené v kvapaline, pohybujú sa náhodne všetkými smermi. Princíp Brownovho pohybu spočíva v tom, že častice sa neustále zrážajú s molekulami rozpúšťadla. Tieto zrážky spôsobujú prenos určitého množstva energie, ktorá spôsobuje pohyb častíc. Prenos energie je viac-menej konštantný, a preto má väčší účinok na menšie častice. V dôsledku toho sa menšie častice pohybujú väčšou rýchlosťou ako väčšie častice. Analýza týchto fluktuácií intenzity poskytuje rýchlosť Brownovho pohybu [51, 52].



Obr. 17: Rozdiel medzi fluktuáciou intenzity u a) veľkých, b) malých častíc v roztoku [53].

Vzťah medzi rýchlosťou a veľkosťou častíc je daný Stokes–Einsteinovou rovnicou, ktorá nám umožňuje vypočítať hydrodynamický polomer častice (r_H):

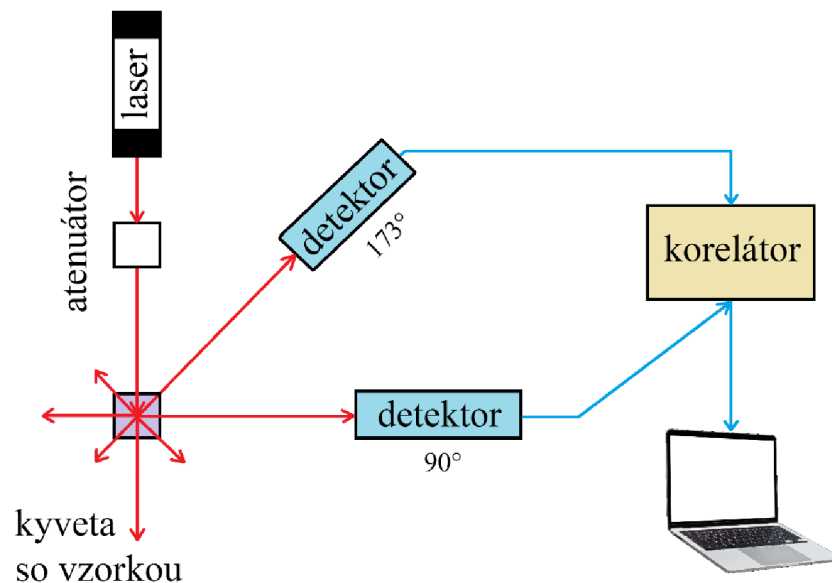
$$r_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta_0 \cdot D} \quad (7)$$

kde k_B je Boltzmannova konštanta, T je termodynamická teplota, η_0 viskozita rozpúšťadla a D je difúzny koeficient zistený pomocou štatistickej analýzy [52].

Základnou požiadavkou Stokes-Einsteinovej rovnice je, že pohyb častíc musí byť založený výlučne na Brownovom pohybe. Ak dochádza k sedimentácii, nedochádza k náhodnému pohybu, ktorý by viedol k nepresným výsledkom. Preto začiatok sedimentácie označuje hornú hranicu veľkosti pre merania DLS. Naopak, spodná hranica veľkosti je definovaná pomerom signál/šum. Malé častice nerozptyľujú veľa svetla, čo vedie k nedostatočnému signálu merania [52].

2.8.2 Inštrumentácia DLS

Hlavnou komponentou prístroja je laser. Najčastejšie používaný laser je 4 mW He\\Ne laser s vlnovou dĺžkou 633 nm. Laserový zdroj poskytuje zväzok koherentného monochromatického svetla. Ďalšou časťou je atenuátor (zosľabovač), možný zmeny intenzity výkonu lasera znížením jeho intenzity. Monochromatické koherentné žiarenie dopadá na kyvetu so vzorkou. Kyvety sú sklenené alebo vyrobené z priesvitného plastu, v závislosti na použitom rozpúšťadle. Minimálny požadovaný objem vzorky je 1-2 ml. Žiarenie je následne zachytené optickými prvkami. V novších prístrojoch je intenzita rozptýleného svetla meraná na detektoroch umiestnených pod uhlom 173 stupňov na detekciu spätného rozptylu používaný na detekciu častíc o vyššej koncentrácii. Detektor umiestnený pod uhlom 90 stupňov bol používaný v starších prístrojoch. Poslednými časťami sú korelátor, ktorý spracováva intenzitu rozptylu svetla jednotlivých meraní a software, ktorý informáciu o veľkosti častíc vyhodnocuje [54, 55].

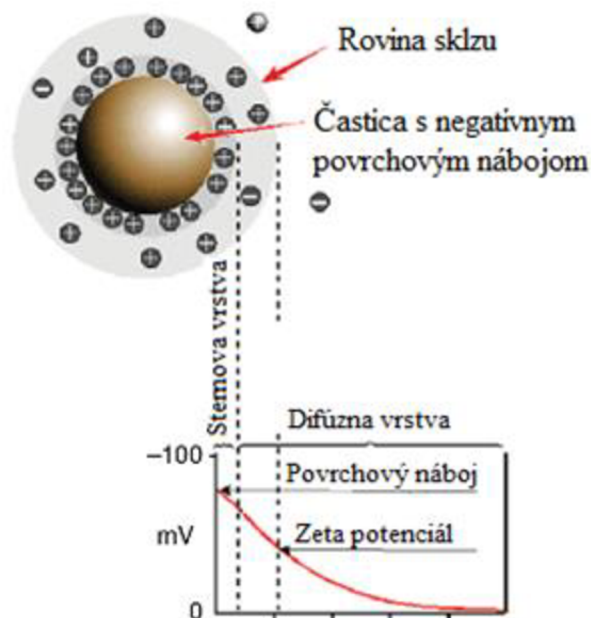


Obr.18: Schematické zobrazenie inštrumentácie prístroja na meranie DLS [54].

2.9 Elektroforetický rozptyl svetla a stanovenie zeta potenciálu

Elektroforetický rozptyl svetla, bežne označovaný ako ELS (z angl. *Electrophoretic light scattering*), je analytická metóda, ktorou sa meria elektroforetická pohyblivosť suspenzie častíc alebo makromolekúl. Pri elektroforetickom rozptyle svetla spôsobuje pohyb častíc oscilujúce elektrické pole, ktoré pôsobí na častice a vzniká elektroforéza. Pri tomto jave sú nabité častice suspendované v elektrolyte priťahované smerom k elektróde s opačným nábojom [54].

Monochromatické laserové žiarenie prechádza časticami vzorky, ktorá je prevedená do sklenenej kyvety, s vloženou dip celou s meracou elektródou, ktorá do systému vnáša napätie. Vrstva kvapaliny obklopujúca časticu je rozdelená na dve: vnútorná oblasť, nazývaná Sternova vrstva, kde sú ióny pevne viazané, a vonkajšia, difúzna oblasť, kde sú ióny viazané menej pevne. V difúznej vrstve existuje teoretická hranica, v rámci ktorej ióny a častice tvoria stabilný celok. Keď sa častica pohybuje (napr. v dôsledku gravitácie), ióny vnútri hranice sa pohybujú spolu s ňou, ale všetky ióny za hranicou sa s časticou nepohybujú. Táto hranica sa nazýva tzv. rovina sklzu. Potenciál, ktorý existuje na tejto hranici, je známy ako potenciál zeta [56].



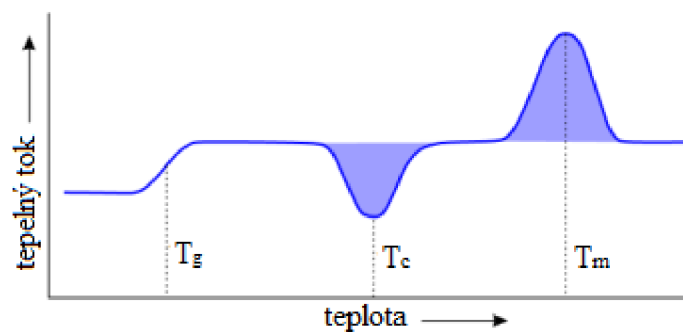
Obr. 19: znázornenie elektrickej dvojvrstvy a zeta potenciálu [56].

Veľkosť zeta potenciálu naznačuje potenciálnu stabilitu koloidného systému. Ak majú všetky častice v suspenzii veľký záporný alebo kladný zeta potenciál, potom majú tendenciu sa navzájom odpudzovať a nemajú tendenciu flokulovať (vločkovat'). Systém je elektrostaticky stabilný, ak má dostatočne záporný alebo dostatočne kladný zeta potenciál a odpudivé sily sú dostatočne veľké. Ak však majú častice nízke hodnoty zeta potenciálu, potom neexistuje sila, ktorá by zabránila zhlukovaniu častíc a ich flokulácii. Všeobecná deliaca čiara medzi stabilnou a nestabilnou suspenziou sa zvyčajne nachádza na úrovni +30 mV alebo -30 mV. Častice považujúce sa za stabilné majú zeta potenciál pozitívnejší ako +30 mV, alebo negatívnejší ako -30 mV. Faktory, ktoré ovplyvňuje zeta potenciál, sú pH, iónová sila, koncentrácia a pod. [56].

2.10 Diferenčná skenovacia kalorimetria

Diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC) je analytická technika, ktorá meria množstvo uvoľneného alebo absorbovaného tepla počas zahrievania alebo chladenia v určitom rozsahu teplôt. DSC sa používa na meranie zmien entalpie fyzikálnych a chemických vlastností materiálu v závislosti od teploty alebo času. Táto metóda umožňuje identifikáciu a charakterizáciu tepelných vlastností materiálov a taktiež sa používa na určenie teploty, pri ktorej dochádza k určitým fázovým prechodom, fúzii či kryštalizácii [57].

Táto metóda je veľmi citlivá a ľahko použiteľná a jej použitím vieme zistiť teplotu fázového prechodu jednotlivých látok v roztoku. Pri meraní je vzorka ohrievaná a následne chladená a meranie prebieha spolu s referenčnou (kontrolnou) vzorkou, kedy signál fázového prechodu vychádza z momentálneho tepelného rozdielu oboch vzoriek. Dochádza buď k uvoľňovaniu tepla (exotermickej reakcii) alebo k spotrebovávaniu tepla, teda reakcii endotermickej a pri meraní DSC je charakterizovaná ako pík v grafe. Obr. 20 prezentuje schematické zobrazenie DSC termogramu s typickými termálnymi prechodmi charakterizovanými príslušnou teplotou, kedy T_g je teplota skelného prechodu odčítaná v inflexnom bode plynulého nárastu tepelného toku (J/s), T_c je teplota kryštalizácie odčítaná v lokálnom minime exotermického píku a T_m je teplota topenia v maxime píku endotermického prechodu. Celkové teplo topenia alebo kryštalizácie sa získa integráciou píku [57, 58].



Obr. 20: DSC termogram [57].

Rozlišujeme dva základné typy DSC analyzátorov a to DSC s kompenzáciou príkonu alebo s tepelným tokom. Hlavný rozdiel je v umiestnení meranej a referenčnej vzorky, kedy u **DSC s kompenzáciou príkonu** sú vzorky umiestnené v dvoch identických kalorimetrických celách. Ak v meranej vzorke neprebíha žiadny dej, tak sú obe vzorky zahrievané rovnakou rýchlosťou určenou zadaným teplotným programom. Ak ale v študovanej vzorke prebehne dej endotermického či exotermického charakteru, začne jeho teplota zaostávať alebo je naopak vyššia ako teplota referenčnej vzorky a dôjde k vyrovnaniu teplôt vzoriek prídáním či ubratím energie. U **DSC s tepelným tokom** sú referenčná aj študovaná vzorka umiestnené v rovnakej kalorimetrickej cele na samostatných teplotných čidlách. Sú spojené tepelným mostom. Rozdiely teplôt spôsobené endotermickými či exotermickými dejmi sú zaznamenávané ako tepelný tok, ktorý je následne prevedený na energetický ekvivalent [59].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

V nasledujúcej kapitole je uvedená literárna rešerš, v ktorej je študovaný vplyv cholesterolu na prípravu a stabilitu kataniontových vezikulárnych systémov. Sú využité aj štúdie zaoberajúce sa týmto vplyvom na lipozómy, ktoré sú svojou funkciou a štruktúrou najviac týmto systémom podobné. Uvedené štúdie sa zaoberali účinkami cholesterolu na membránové vlastnosti vezikulárnych systémov, ako sú hydratácia membrány a fluidita, využitím techník fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie na objasnenie štruktúry membránových vlastností kataniontových vezikulárnych systémov.

3.1 Využitie fluorescencie Laurdanu na sledovanie zmien fluidity fosfolipidovej membrány

Laurdan je fluorescenčná sonda, ktorá zisťuje zmeny fázových vlastností membrán vďaka svojej citlivosti na polaritu prostredia membránových dvojvrstiev. V tejto práci sa **Faith M. Harris a kol.** venovali testovaniu, či sa metóda fluorescencie Laurdanu dá použiť na rozlíšenie zmien vo fluidite membrány skúmaním teplotnej závislosti GP laurdanu a fluorescenčnej anizotropie vo vezikulách tvorených DPPC (dipalmitoylfosfatidil cholínom). Bol pozorovaný fázový prechod z pevnej usporiadanej fáze (S_o – *solid-ordered*) do kvapalnej neusporiadanej fáze (L_d – *liquid-disordered*) ako pokles hodnôt generalizovanej polarizácie laurdanu z 0,7 na 0,14 a takisto znížením hodnôt fluorescenčnej anizotropie z 0,25 na 0,12. Skúmané boli aj rôzne množstvá pridaného cholesterolu (0 až 40 mol. %) Pridaním cholesterolu nenastal posun v teplote fázového prechodu DPPC, avšak účinkom cholesterolu došlo k zníženiu rozdielov medzi jednotlivými nameranými hodnotami anizotropie a teda prídavok väčšieho množstva cholesterolu spôsobil, že membrána bola viac rigidná. Pomocou meraní GP Laurdanu sa zistili zmeny v usporiadaní fosfolipidov a tekutosti membrány [60].

3.2 Vplyv cholesterolu na stabilitu kladne nabitých kataniontových vezikúl

An-Tsung Kuo a kol. sa zaoberali vplyvom rôzneho obsahu cholesterolu na fyzikálnu stabilitu a molekulárne balenie kataniontových vezikúl zložených z amfifilného iontového páru HTMA-DS s pridaním dvojreťazcového kladne nabitého surfaktantu DTDAB. Efekt cholesterolu na fyzikálnu stabilitu vezikúl bol skúmaný pomocou dynamického a elektroforetického rozptylu svetla k zisteniu veľkosti častíc a zeta potenciálu a taktiež pomocou infračervenej analýzy s Fourierovou transformáciou. Výsledky ukázali, že prídanie cholesterolu k roztoku zvýšilo fyzikálnu stabilitu týchto vezikúl. Začlenením sterolového kruhu do vezikulárnej membrány sa totiž zväčšila vzdialenosť medzi nabitými funkčnými skupinami a tým sa zvýšil samotný náboj vezikuly (inter – vezikulárny efekt) a začlenenie cholesterolu takisto spôsobilo mechanické spevnenie membrány (intra – vezikulárny efekt) [61].

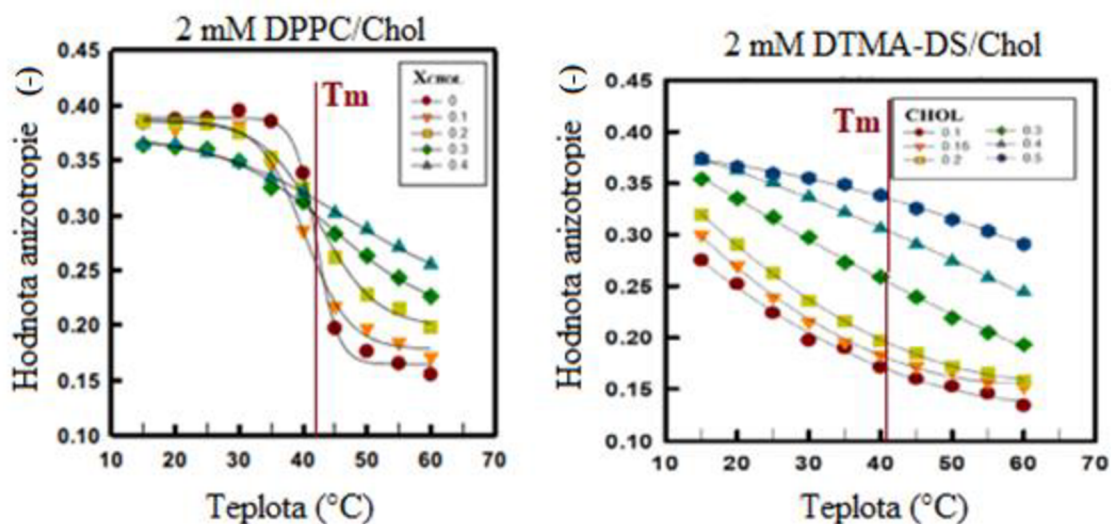
Martina Havlíková a kol. sa v rámci štúdie zaoberali vlastnosťami spojenými s vplyvom cholesterolu na stabilitu vezikulárnych systémov HTMA-DS s prídavkom DoDAC. Pridaná koncentrácia cholesterolu sa pohybovala v rozmedzí 0 mol. % až 73 mol. %. Vlastnosti týchto systémov boli študované pomocou DLS, ELS a doplnené technikami ultrazvukovej spektroskopie (HRUS) a generalizovanej polarizácie. Bolo zistené, že systémy s obsahom cholesterolu pod 23 mol. % vykazovali nestabilitu, keďže hodnota zeta-potenciálu týchto vzoriek sa nachádzala v nestabilnej oblasti. Vizualne pozorovanie taktiež ukazovalo na

nestabilné vzorky, keďže boli pomerne dosť zakalené. Systémy s obsahom cholesterolu v rozmedzí 33 až 53 mol. % boli vizuálne číre a stabilita bola potvrdená aj hodnotou zeta-potenciálu v stabilnej oblasti. V oblasti nad 63 mol. % cholesterolu boli vzorky už znova zakalené a menej stabilné, čo súvisí s už veľmi vysokým obsahom cholesterolu. Ak systém obsahuje príliš vysoké množstvo cholesterolu, nastáva kryštalizácia hydrofóbných reťazcov povrchovo aktívnych látok, čo spôsobuje destabilizáciu celého vezikulárneho systému. Na štúdium membránových vlastností boli využité techniky ultrazvukovej spektroskopie a generalizovanej polarizácie. Prostredníctvom merania GP bolo zistené, že u vzoriek s obsahom cholesterolu 23, 53, 63 a 73 mol. % je hodnota generalizovanej polarizácie vyššia, čo značí nízku fluiditu systému a systém sa teda nachádza vo fáze *So* (*solid-ordered*). Vzorky s prídavkom 33 a 43 mol. % cholesterolu mali zo všetkých uvedených vzoriek najnižšie hodnoty GP, čo predpokladá vyššiu fluiditu systému a teda to, že systém sa nachádzal vo fáze *Ld* (*liquid-disordered*) a teda mal aj vyššiu solvataciu membrány. Porovnaním všetkých uvedených techník a teda DLS, ELS, GP a HRUS bol značný výsledok, že kataniontové vezikulárne systémy HTMA-DS s prídavkom DoDAC v pomere 9:1 vykazujú najstabilnejší systém, ak je k nim pridaných 43 mol % cholesterolu [62].

3.3 Účinky cholesterolu na štruktúru a tekutosť membrán lipozómov a kataniontových vezikúl

Chia-Yu Cheng a kol. sa v tejto štúdií zaoberali účinkami cholesterolu na usporiadanie a tekutosť dvojvrstvových membrán vo vezikulárnych systémoch DeTMA-DS, DeTMA-TS a DTMA-DS. Na porovnanie boli použité lipozomálne vezikuly tvorené lipidmi DPPC. Tieto látky boli vybrané na základe svojej teploty fázového prechodu, kedy u DTMA-DS je táto teplota (41,4 °C) podobná teplote fázového prechodu DPPC (42,2 °C). DeTMA-DS a DeTMA-TS boli vybrané na pozorovanie vplyvu asymetrických reťazcov. Tieto látky majú teplotu fázového prechodu 30,9 °C (DeTMA-DS) a 30,6 °C (DeTMA-TS) Membránové aspekty boli skúmané pomocou metódy fluorescenčnej anizotropie a veľkosť častíc pomocou metódy dynamického rozptylu svetla. K roztokom vezikulárnych systémov bol prídavaný 2 mM cholesterol v rozmedzí 0 – 50 mol. %. Tieto systémy boli ďalej sonifikované a bola stanovená veľkosť a zeta potenciál pomocou DLS a ELS a taktiež vyobrazené pomocou transmisného elektrónového mikroskopu. Na meranie pomocou metódy anizotropie fluorescencie bola použitá sonda DPH. Meranie prebiehalo pomocou fluorescenčného spektrometra LS-55, kedy bola sonda DPH excitovaná pri vlnovej dĺžke 360 nm a jeho emisia bola pri vlnovej dĺžke 460 nm a meranie prebiehalo v rozmedzí teplôt od 15 do 60 °C. Z výsledkov vyplynulo, že veľkosť kataniontových vezikúl sa zväčšovala s rastúcou koncentráciou cholesterolu, ale táto veľkosť odpovedala vzniku kataniontových vezikulárnych systémov, čo sa potvrdilo aj metódou TEM. Z meraní anizotropie DPPC vyplýva, že pri teplote nižšej ako je teplota fázového prechodu konkrétnej látky sa znižovala aj hodnota anizotropie, čo naznačuje zvýšenú fluiditu dvojvrstvy a zníženie jej usporiadanosť. Naopak, prídanim cholesterolu do dvojvrstvy nad teplotou fázového prechodu prišlo k zvýšeniu hodnôt anizotropie, čo naznačuje zníženú fluiditu membrány a zvýšené usporiadanie dvojvrstvy. Tento efekt sa označuje ako tzv. *disordering effect*. Z výsledkov taktiež vyplýva, že za hranicou $X_{\text{CHOL}} = 0,3$ prešli termogramy fluorescenčnej anizotropie DPPC lipozómov od sigmoidálneho k monotónnemu znižovaniu so zvyšujúcou sa teplotou, čo naznačuje, že sa vytvorila fáza membrány tzv. *Lo* (z angl. *liquid*

ordered), teda kvapalná usporiadaná fáza. Tento graf hodnôt fluorescenčnej anizotropie DPPC lipozómov zobrazuje obr. 21 vľavo. Vpravo na obrázku sú zobrazené hodnoty fluorescenčnej anizotropie pre kataniontové vezikulárne systémy tvorené komplexom DTMA-DS a cholesterolom [63].



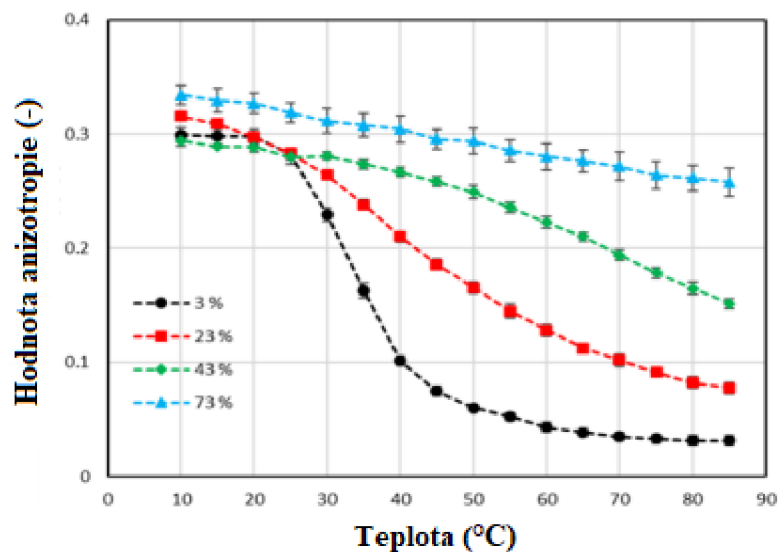
Obr. 21: Grafy hodnôt anizotropie DPPC a IPA (DTMA-DS) v závislosti na teplote [63].

Zaujímavé je, že termogramy hodnôt fluorescenčnej anizotropie membrán kataniontových vezikúl sa monotónne zvyšovali s prídavkom cholesterolu pri všetkých testovaných teplotách. To naznačuje, že cholesterol má len kondenzačné a usporiadacie účinky na kataniontové vezikuly nad aj pod T_m . Týmto sa líši od typického *disordering efektu* a kondenzačných účinkov cholesterolu pozorovaných v DPPC dvojvrstve pod a nad T_m . Výsledkom štúdie vznikol predpoklad, že membrány kataniontových vezikulárnych systémov majú vyššiu fluiditu a nižšiu usporiadanosť v porovnaní s dvojvrstvovou membránou DPPC s nízkym obsahom cholesterolu. Toho je dosiahnuté z dôvodu, že kataniontové dvojvrstvy vo fáze *So* (*solid-ordered*) sú viac neusporiadané a tekutejšie v porovnaní s fázou *So* membrány DPPC. To naznačuje, že kataniontové dvojvrstvy a DPPC dvojvrstvy majú podobnú štruktúru a fluiditu membrán vo fáze *Ld* (*liquid-disordered*). So zvyšovaním koncentrácie cholesterolu sa termogramy fluorescenčnej anizotropie monotónne zvyšujú. To naznačuje, že kondenzácia cholesterolu pridaním k dvojvrstvám DPPC vezikúl postupne znižuje rozdiel medzi katanionovými a DPPC dvojvrstvami [63].

3.4 Vplyv cholesterolu na membránové vlastnosti kataniontových párov amfifilných vezikúl pri rôznych teplotách

Martina Havlíková a kol. študovali vplyv cholesterolu na vlastnosti vezikulárnych membrán amfifilných iónových párov pri rôznych teplotách. Bol vybraný komplex HTMA-DS s prídavkom 10 mol. % DoDAC. Skúmaný bol široký rozsah koncentrácií cholesterolu a to v rozmedzí (0 – 73) mol. % v teplotnom rozsahu (10 – 80) °C. Bola sledovaná distribúcia veľkosti častíc pomocou DLS, tekutosť membrány pomocou fluorescenčnej anizotropie

s využitím fluorescenčných sond DPH a TMA-DPH a zmena pohyblivosti vody v povrchovej vrstve membrány pomocou generalizovanej polarizácie s použitím sondy Laurdan. Bolo zistené, že v stabilných systémoch (s prídavkom cholesterolu v rozsahu 23 -53 %), ktoré spĺňajú podmienku unimodálnej veľkosti s hodnotou PDI nižšou ako 0,3, teplota prakticky nemá vplyv na veľkosť vezikulárnych systémov. Naopak, pri skúmaní hydratácie a tekutosti membrány sa zistili významné zmeny týchto parametrov, ktoré však nemajú vplyv na krátkodobú stabilitu týchto vezikulárnych systémov. Z výsledkov štúdie je zjavné, že pri zvyšovaní teploty hodnota fluorescenčnej anizotropie klesala. Ako zobrazuje obr. 22, krivka hodnôt fluorescenčnej anizotropie systémov s nízkym prídavkom cholesterolu vykazovala sigmoidný charakter, ktorý však s narastajúcou koncentráciou cholesterolu pomaly mizol a hodnoty krivky sa znižovali monotónne. Znamená to teda, že so zvyšovaním prídavku cholesterolu je pokles fluorescenčnej anizotropie s narastajúcou teplotou menší. Dá sa teda predpokladať že s rastúcou teplotou rastie aj fluidita membrány a znižuje sa jej usporiadanosť. Bola premeraná aj hodnota generalizovanej polarizácie, ktorá poskytuje predstavu o solvatačných vlastnostiach daného vezikulárneho systému. Tak ako pri hodnotách fluorescenčnej anizotropie, aj pri generalizovanej polarizácii sa so zvyšujúcou sa teplotou znižovala hodnota GP a pri nízkych koncentráciách pridaného cholesterolu mala krivka sigmoidný charakter a s vyšším obsahom cholesterolu sa charakter krivky stával monotónne klesajúcim. Znamená to teda, že pri vyšších teplotách sú vezikuly solvatované viac a sú v tzv. *Lo* (*liquid-ordered*) fáze a pri nižších teplotách zasa v *So* (*solid-ordered*) fázi [64].



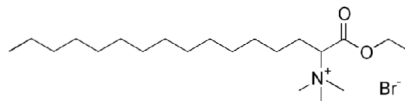
Obr. 22: Závislosť hodnôt anizotropie na teplote pre vybrané koncentrácie cholesterolu [64].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

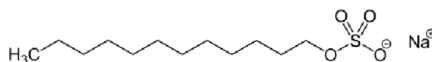
**Karbethopendicinium
bromid (Septonex)**

M_w = 422,49 g/mol
CAS: 10567-02-9
GNB chem a.s.
č. šarže: 511SEP003



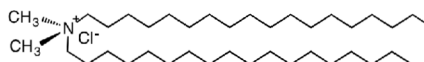
Dodecylsulfát sodný (SDS)

M_w = 288,38 g/mol
CAS: 151-21-3
Sigma Aldrich
č. šarže: SLBT3991



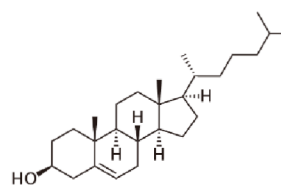
**Dioktadecyldimetylamónium
chlorid (DoDAC)**

M_w = 586,64 g/mol
CAS: 107-64-2
Alfa Aesar
č. šarže: 10147338



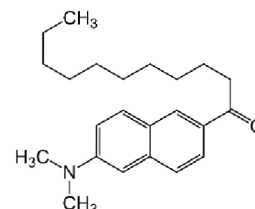
Cholesterol

M_w = 386,65 g/mol
CAS: 67-66-3
Sigma Aldrich
č. šarže: 26732-25G-F



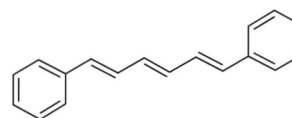
**6-lauroyl-2-(N,N-
dimethylamino)
naftalén (Laurdan)**

M_w = 353,54 g/mol
CAS: 74515-25-6
Sigma Aldrich
č. šarže: BCBK4653V



**1,6-difenyl -1,3,5-hexatrién
(DPH)**

M_w = 232,33g/mol
CAS: 1720-32-7
Sigma Aldrich
č. šarže: 1054132



Chloroform

CAS: 67-66-3
Penta s.r.o.
č. šarže: 602-006-00-4



Acetón

CAS: 67-64-1
Lach-Ner s.r.o.
č.šarže: PP/2013/00914



Deionizovaná voda

Milipore,
Purelab: ELGA



4.2 Použité přístroje

<i>Analytické váhy</i>	Denver Instrument, Mdi BC 100
<i>Vibračné miešadlo</i>	IKA MS2 Minishaker
<i>Vortex</i>	MS2 Minishaker
<i>Ultrazvukový sonifikátor</i>	Bandelin SONOPULS UW 3200 so sondou VS 70 T
<i>Fluorescenčný spektrometer FS5</i>	Edinburgh Instruments
<i>Zetasizer NANO ZS</i>	Malvern Instruments, UK
<i>Mikro-kalorimeter PEAQ-DSC</i>	Malvern Instruments, UK

4.3 Zhrnutie cieľov práce

Vzhľadom na súčasný stav riešenej problematiky, teda literárnej rešerše uvedenej v kapitole 3 boli vybrané vhodné techniky na štúdium a charakterizáciu membránových vlastností týchto systémov. Jedným z cieľom práce bolo vybrať vhodný postup prípravy a charakterizácie systémov na báze iontového páru obsahujúceho karbethodendicinium bromid, teda Septonex. Tento tenzid je špecifický pre Českú republiku a jeho výhodou je teda dobrá dostupnosť aj finančná stránka. Bol zvolený postup prípravy IPA metódou extrakcie a následne štandardná príprava vezikulárnych systémov pridaním dvojreťazcového surfaktantu z dôvodu zvýšenia stability a použitie metódy ultrazvukovej dispergácie k dosiahnutiu unilamelárnych vezikúl.

Na základe nájdených výskumov zaoberajúcich sa štúdiom membránových vlastností boli zvolené techniky merania fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie, ktoré prezentujú vlastnosti membrány ako tekutosť (fluidita) a hydratácia u vzoriek s rôznym prídavkom cholesterolu. Na meranie fluorescenčnej anizotropie bola zvolená sonda DPH a na techniku generalizovanej polarizácie fluorescenčná sonda Laurdan. DPH je sonda, ktorá pri meraní anizotropie dokáže odhaliť zmeny vo vnútri vezikulárnej membrány a Laurdan zasa na povrchu vezikuly. Taktiež na základe literárnej rešerše bola zvolená koncentrácia pridaného cholesterolu v rozmedzí 0 až 40 mol. % a to konkrétne 0, 10, 20, 30 a 40 mol. % cholesterolu. Nakoniec technika dynamického rozptylu svetla spolu s elektroforetickým rozptylom svetla boli zvolené na charakterizáciu vezikulárnych systémov ako celku, a to konkrétne zmeraním ich veľkosti a stability v deň prípravy a doplnková technika diferenčnej skenovacej kalorimetrie na zistenie teploty fázového prechodu jednotlivých vzoriek týchto systémov.

4.4 Pracovné postupy

4.4.1 Príprava zásobného prášku IPA

Bola zvolená koncentrácia povrchovo aktívnych látok nad hodnotou ich kritickej molárnej koncentrácie. Na získanie tejto koncentrácie bola na analytických váhach navážaná potrebná navážka karbethodendicinium bromidu (Septonex) a dodecylsulfátu sodného (SDS). Obe tieto navážky boli rozpustené v 250 ml deionizovanej vody. Tieto zásobné roztoky tenzidov boli ponechané na magnetickej miešačke do druhého dňa, aby sa docielilo úplnej homogenizácie. Tieto roztoky boli ďalší deň zmiešané v ekvimolárnom pomere a opäť ponechané na magnetickej miešačke na docielenie dostatočnej homogenizácie. Po dostatočnom čase (približne 3 dni) bol k tomuto roztoku postupne prídavaný chloroform, v pomere 1:1. Následným vytrepávaním bolo zanedlho dosiahnuté oddelenie tzv. chloroformovej a vodnej fáze. IPA, teda v tomto prípade komplex SEPT-DS, je vo vode nerozpustný a teda bol súčasťou chloroformovej fáze. Vo vodnej fáze sa nachádzali protiióny, ktoré sa oddelili od ostatných molekúl. Chloroformová fáza bola ponechaná na pozvoľné odparenie a tak vznikol biely prášok IPA, ktorý bol kvantitatívne prevedený do suchej vialky a uchovávaný pri laboratórnej teplote.

4.4.2 Príprava vzoriek IPA s prídavkom kladne nabitého tenzidu a rôznymi obsahmi pridaného cholesterolu

Na základe potreby dosiahnutia vhodnej koncentrácie kataniontových vezikulárnych systémov vychádzajúci z predošlých už prebehnutých výskumov, bol určený požadovaný objem na 60 ml a požadovaná koncentrácia na 120 mM. Navážky zásobného prášku IPA a DoDAC boli rozpustené v príslušnom objeme chloroformu. Tieto hodnoty sú uvedené v *Tab. 2* a *Tab. 3*.

Tab. 2: Vypočítaná hodnota navážky IPA a objemu chloroformu na dosiahnutie požadovanej koncentrácie IPA.

c IPA [mM]	m IPA [mM]	V_{chloroform} [ml]
120	0,3647	5

Tab. 3: Vypočítaná hodnota navážky DoDAC a objemu chloroformu na dosiahnutie požadovanej koncentrácie DoDAC.

c DoDAC [mM]	m DoDAC [mM]	V_{chloroform} [ml]
120	0,0483	0,7

Na prípravu všetkých vzoriek bol použitý rovnaký postup pozostávajúci zo zmiešania zásobného roztoku IPA a zásobného roztoku DoDAC v pomere IPA:DoDAC 9:1 k dosiahnutiu 1 ml roztoku kladne nabitého kataniontového vezikulárneho systému (cIPA). Tento objem bol následne doplnený navážkou cholesterolu vypočítanou v *Tab. 4* k dosiahnutiu koncentrácií 10, 20, 30 a 40 mol. % cholesterolu v roztoku cIPA. Na dosiahnutie 0 mol. % cholesterolu v roztoku nebol pridaný k roztoku cIPA žiaden cholesterol.

Tab. 4: Vypočítané hodnoty navážky cholesterolu k dosiahnutiu roztoku cIPA s obsahom požadovaných mol.% cholesterolu.

c cholesterol [mol. %]	m cholesterol [g]	V_{cIPA} [μl]	V_{DoDAC} [μl]
0	0	900	100
10	0,0052	900	100
20	0,0116	900	100
30	0,0199	900	100
40	0,0309	900	100

Do sklenenej 100 ml nádoby z pyrex skla, ktorej obsah tvorilo príslušné množstvo IPA, DoDAC a cholesterolu boli pridané sklenené guľôčky. Obsah bol zvortexovaný, aby bolo dosiahnuté čo najväčšej homogenizácie roztoku. Následne boli otvorené nádoby ponechané 24 hodín na odparenie chloroformu v digestore s odťahom. Výsledkom bol vznik tenkého filmu na sklenených guľôčkach. Nasledovala technika ultrazvukovej dispergácie. Použitie tejto metódy je v procese prípravy kataniontových vezikúl zásadné, pretože použitím dostatočne veľkej ultrazvukovej energie je dosiahnutý vznik unilamelárnych vezikúl z väčších, multilamelárnych. Prítomnosť unilamelárnych vezikúl je nevyhnutné pre pozorovanie membránových vlastností vezikulárnych systémov pomocou ďalších techník. K vzniknutému

tenkému filmu po odparení cholesterolu bol nasledujúci deň pridaný objem 60 ml deionizovanej vody. Roztoky s rôznymi mol. % cholesterolu boli sonifikované pomocou ultrazvukového dispergátora Bandelin SONOPULS UW 3200 pomocou príslušnej ultrazvukovej sondy. Sonifikácia prebiehala pri najvhodnejších parametroch dispergácie na prípravu kataniontových vezikulárnych systémov. Bola konkrétne použitá energia 25 000 J a amplitúda 50 %. Postupne boli sonifikované všetky pripravené vzorky.

4.4.3 Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál

Metóda dynamického a elektroforetického rozptylu svetla bola využitá na kontrolu veľkosti a stability pripravených vezikulárnych systémov. Bol použitý prístroj ZetaSizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments, UK, ktorý má ako zdroj žiarenia 10 mW He-Ne laser s vlnovou dĺžkou 633 nm. **Distribúcia veľkosti častíc** bola určená pomocou dynamického rozptylu svetla v režime *size*. Meranie prebiehalo v sklenených kyvetách pri teplote 25 °C. Bol nastavený čas kalibrácie a meranie prebiehalo v troch sériách po 10 meraní. Taktiež bola nastavená aj poloha v kyvete, kedy laser snímal rozptyl jednotlivých častíc vo vzorke, na fixnú hodnotu 1,00. Z týchto troch sérií meranie bol následne vytvorený priemer.

Zeta potenciál bol určený pomocou elektroforetického rozptylu svetla v režime *zeta*. Hodnota zeta potenciálu určuje stabilitu vzorky a meria sa pomocou sklenenej kyvety, do ktorej je vložená dip cela s meracou elektródou. Tá do systému púšťa napätie a následne sa na tomto vloženom napätí sleduje odozva. Hodnoty zeta potenciálu sú potom vypočítané pomocou Smoluchovského modelu, ktorý sa využíva na meranie zeta potenciálu u vzoriek v polárnom prostredí. Parametre prístroja boli nastavené podobne ako pri režime *size*, avšak počet sérií bol nastavený na 5 opakovaní. Z týchto opakovaní bol následne takisto vytvorený priemer. Boli premerané 3 série vzoriek s rôznym obsahom cholesterolu v rozmedzí (0 – 40 mol. %). Distribúcia veľkosti častíc aj zeta potenciál boli premerané pre jednotlivé vzorky vypočítané ako priemer týchto 3 sérií.

4.4.4 Príprava značených vezikúl fluorescenčnými sondami

Fluorescenčné sondy (DPH a Laurdan) boli rozpustené vo vhodnom rozpúšťadle, v našom prípade v acetóne tak, aby výsledná koncentrácia zásobného roztoku bola 10^{-4} mol·dm⁻³. Do sklenej vialky bol napipetovaný objem 4 ml vezikúl zo všetkých roztokov s rôznym obsahom cholesterolu. Do každej vialky bola potom pridaná fluorescenčná sonda Laurdan v acetóne o objeme 40 µl k dosiahnutiu výslednej koncentrácie 10^{-6} mol·dm⁻³. Keďže acetón je prchavé rozpúšťadlo, vzorky boli ponechané 10 minút stáť, občasne boli premiešané a následne boli vzorky so sondou ponechané na solubilizáciu na trepačke do druhého dňa, kedy bola zmeraná generalizovaná polarizácia. Rovnaký postup bol zvolený aj pre sondu DPH, ktorá bola pridaná do vzoriek na meranie fluorescenčnej anizotropie.

4.4.5 Štúdium membránových vlastností kataniontových vezikulárnych systémov

Meranie **generalizovanej polarizácie** prebiehalo prostredníctvom fluorescenčného spektrometra FS5 od firmy Edinburgh Instruments (s modulom SC-25). Jednotlivé vzorky vezikulárnych systémov s rôznymi prídavkami cholesterolu a solubilizovanou sondou Laurdan boli premerané v kremennej kyvete do ktorej bolo vložené magnetické miešadlo. Miešanie vzorky bolo zapnuté a boli nastavené jednotlivé parametre prístroja. Štrbiny boli nastavené

podľa intenzity, v rozmedzí 2 až 3 nm. Excitačné maximum 350 nm, emisné maximum 480 nm, bez použitia polarizátorov. Emisné spektrum bolo merané v rozsahu 400 až 550 nm, s krokom 1 nm, dwell time 0,15 s. Premeriavaná teplota bola zvolená v rozmedzí 15 až 80 °C s krokom 5 °C v reverznom teplotnom móde. Stabilizačný čas činil 180 sekúnd. Boli premerané 3 série vzoriek s rôznym obsahom cholesterolu v rozmedzí (0 – 40 mol. %). Generalizovaná polarizácia bola taktiež premeraná aj u roztokov micel SDS a Septonex, taktiež v troch sériách meraní.

Pre meranie **fluorescenčnej anizotropie** bol takisto využitý fluorescenčný spektrometer FS5 – Edinburgh Instruments. Vzorky s pridanou sondou DPH boli pomocou kremennej kyvety vložené do prístroja, miešanie bolo zapnuté a nastavili sa jednotlivé parametre. Nastavenie štrbín sa takisto odvíjalo podľa intenzity, v rozmedzí 2 – 3 nm. Excitačné maximum 350 nm, emisné maximum 430 nm so zapnutými polarizátormi. Metóda merania: Emisné anizotropné spektrum s rozsahom 395 až 495 nm, s krokom 4 nm, dwell time 0,4 s. Premeriavaná teplota takisto zvolená v rozmedzí 15 až 80 °C s krokom 5 °C v reverznom teplotnom móde. Stabilizačný čas taktiež činil 180 sekúnd. Premerané boli znova 3 série vzoriek s rôznym obsahom cholesterolu v rozmedzí (0-40 mol. %). Fluorescenčná anizotropia bola premeraná aj u roztokov micel SDS a Septonex, taktiež v troch sériách meraní, ako u generalizovanej polarizácie.

4.4.6 Príprava micelárnych systémov Septonex a SDS značených fluorescenčnými sondami

Na porovnanie výsledkov boli pripravené aj micely z tenzidov Septonex a SDS. Potrebná navážka jednotlivého tenzidu bola rozpustená v príslušnom objeme deionizovanej vody a ponechaná miešať do druhého dňa na dosiahnutie maximálnej homogenizácie. Nasledujúci deň bol do sklenej vialky napipetovaný objem 4 ml roztoku micel a do každej vialky bol pridaný objem 40 µl fluorescenčnej sondy Laurdan alebo DPH v acetóne k dosiahnutiu výslednej koncentrácie 10^{-6} mol·dm⁻³. Vzorky boli ponechané 10 minút stáť, občasne boli premiešané a následne boli ponechané na solubilizáciu na trepačke do druhého dňa, kedy bola zmeraná generalizovaná polarizácia u vzoriek s pridanou sondou Laurdan a fluorescenčná anizotropie u vzoriek s nasolubilizovanou sondou DPH.

4.4.7 Meranie teploty fázového prechodu pomocou techniky diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie

Vzorky kataniontových vezikúl, pripravené rovnako ako pri predošlých metódach boli na druhý deň po sonifikácii zmerané pomocou kalorimetru PEAQ-DSC od firmy Malvern Instruments, UK. Na meranie bolo použitých 200 µl vzorky a rozsah teplôt bol nastavený v rozmedzí 5 – 40 °C. Rýchlosť ohrevu bola nastavená na 90 °C/h a rýchlosť chladenia na 60 °C/h. Vzorky boli merané spolu s referenčnou vzorkou, ktorá bola v tomto prípade voda a meranie referenčnej vzorky prebiehalo rovnakým spôsobom ako vzoriek kataniontových vezikúl. Následne boli výsledky spracované.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky práce v tejto časti sú rozdelené do 4 podkapitol. Je potrebné, aby častice vzoriek kataniontových vezikulárných systémov spĺňali určité podmienky, aby sa s nimi ďalej dalo pracovať na úrovni ďalších výskumov. Tieto parametre, ako sú veľkosť častíc, stabilita a disperzita boli preverené u všetkých vzoriek pomocou metódy DLS a ELS. V druhej časti výsledkov je potom uvedený samotný výskum membránových vlastností častíc týchto vopred skontrolovaných vzoriek. Pomocou techniky fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie boli zmerané a stanovené zmeny ako vo vnútri vezikulárnej membrány, tak na povrchu samotnej vezikuly, kedy boli zmerané aj jednotlivé micelárne koloidy používaných tenzidov. V poslednej podkapitole je pomocou techniky DSC stanovená teplota fázového prechodu jednotlivých vzoriek.

5.1 Veľkosť a stabilita vezikulárných systémov s rôznym obsahom cholesterolu

Jednotlivé vzorky kataniontových vezikul s rôznym obsahom cholesterolu boli premerané v deň prípravy, ihneď po rehydratácii požadovaným objemom deionizovanej vody a po ultrazvukovej dispergácii. Veľkosť a stabilita častíc v týchto vzorkách bola určená pomocou metódy dynamického a elektroforetického rozptylu svetla.

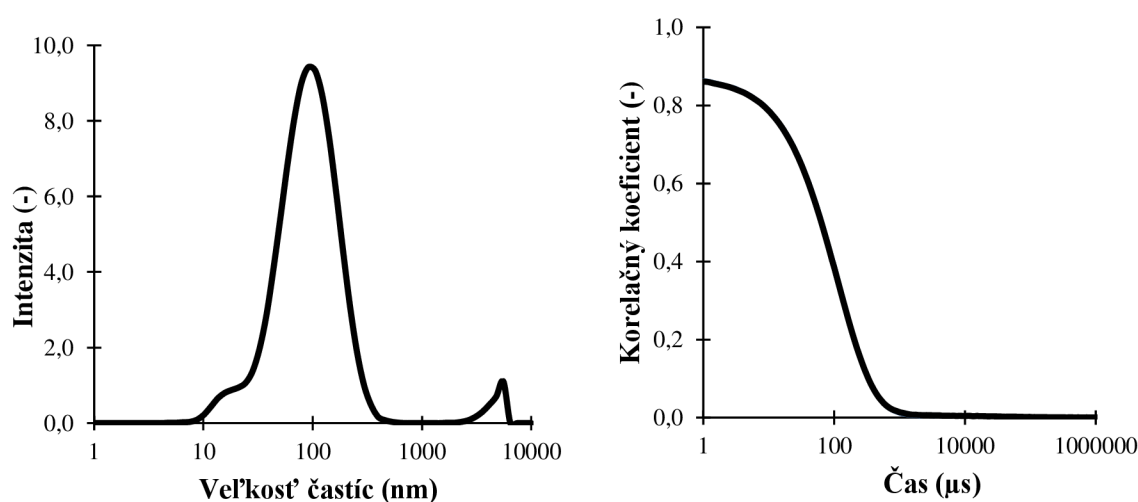


Obr. 23: Vzorky vezikulárných systémov s rôznym obsahom cholesterolu krátko po aplikácii ultrazvukovej dispergácie.

Boli pripravené a následne premerané 3 sady vzoriek SEPT-DS s prídavkom DoDAC a s obsahom cholesterolu v rozmedzí (0 – 40) mol. %. Pomocou metódy dynamického rozptylu svetla bola určená veľkosť a koeficient polydisperzity jednotlivých častíc v konkrétnych vzorkách. Požadovaná veľkosť častíc, v tomto prípade kataniontových vezikul sa pohybuje v rozmedzí (90 – 120) nm. Dôležitým faktorom, ktorý je možné získať pomocou techniky dynamického rozptylu svetla je koeficient polydisperzity PdI. Je to parameter, ktorý reprezentuje distribúciu veľkostných populácií častíc vo vzorke. Jeho číselná hodnota sa pohybuje medzi 0 – 1, kedy hodnota 0,0 reprezentuje úplne monodisperznú vzorku a hodnota 1,0 vysoko polydisperzný systém. Požadovaná hodnota PdI vezikulárných systémov je udávaná do hodnoty $\pm 0,3$. Za touto hranicou sa systém totiž už nepovažuje za dostatočne monodisperzný a nie je vhodný a použiteľný na ďalší výskum [65, 66].

Pomocou techniky elektroforetického rozptylu svetla bol u všetkých 3 sérií vzoriek určený potenciál zeta. Hodnota zeta potenciálu určuje stabilitu vzorky. Vzorku možno považovať za nestabilnú, ak je jej zeta potenciál v oblasti od -30 do + 30 mV, v opačnom prípade sú považované za stabilné [56].

Ako príklad merania distribúcie veľkosti častíc je obr. 24. uvedená vzorka s prídavkom 40 mol.% cholesterolu spolu s korelačnou krivkou. Graf zobrazuje distribúciu veľkosti častíc, ktorá vznikla spriemerovaním výsledkov 3 sérií vzoriek. Korelačná krivka zobrazuje hladký priebeh merania. Veľkosť častíc bola stanovená na 104 ± 7 nm. Túto hodnotu distribúcie veľkosti môžeme považovať za vhodnú, s čím súvisí aj koeficient polydisperzity, nachádzajúci sa na hranici hodnoty 0,3 ako je uvedené v Tab. 5. Hodnota zeta potenciálu sa nachádza v stabilnej oblasti, teda nad 30 mV. Zeta potenciál je kladný, hodnota 56 ± 10 mV, čo potvrdzuje aj fakt pridania kladného náboja dvojreťazcového surfaktantu DoDAC.



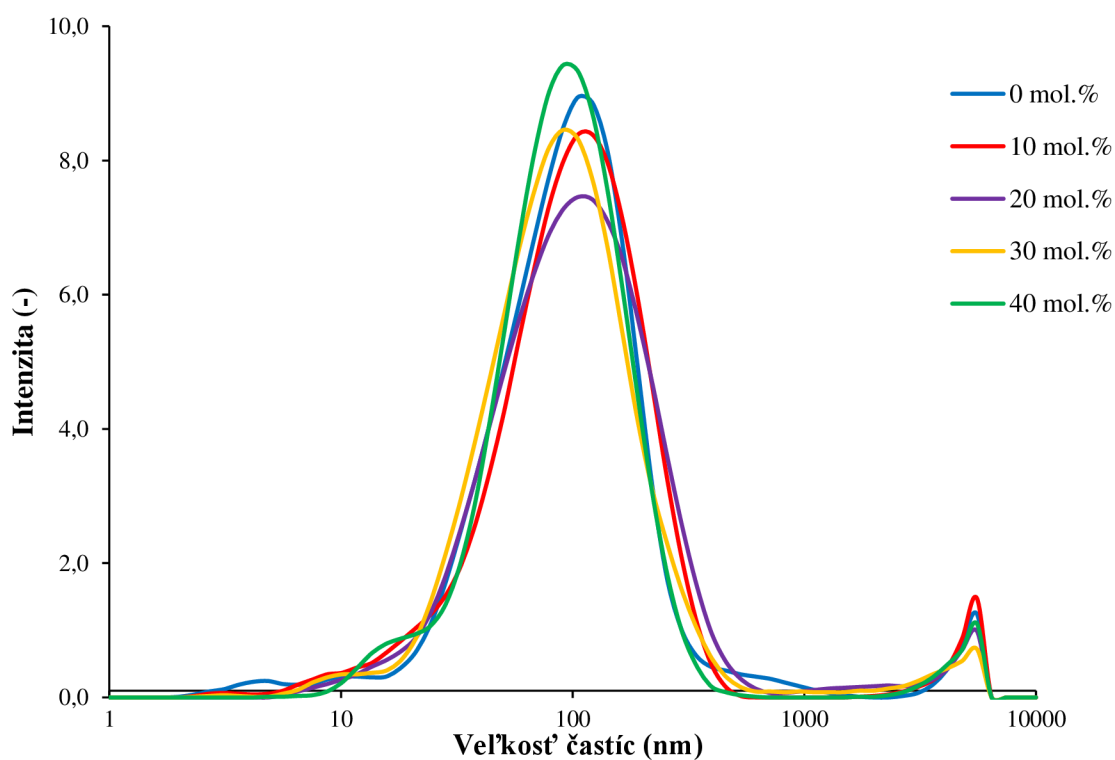
Obr. 24: Nalavo graf veľkosti častíc vzoriek s prídavkom 40 mol. % cholesterolu a napravo korelačná krivka.

Grafy veľkosti častíc systémov s prídavkami cholesterolu 10, 20, 30 a 40 mol % aj s príslušnými korelačnými krivkami sú znázornené v PRÍLOHE na obr. 34 až obr. 37. Súhrnné výsledky distribúcií častíc, koeficienty polydisperzity a zeta potenciálu vzoriek sú uvedené v Tab. 5. Tieto výsledky nezobrazujú až tak veľké rozdiely vo veľkosti a stabilite jednotlivých vzoriek. Avšak, vzhľadom na výsledky meraní jednotlivých sérií, konkrétne u vzoriek s prídavkom 0 a 10 mol. % cholesterolu, najmä vzhľadom na vyššiu priemernú veľkosť častíc a vyšší koeficient polydisperzity, nie je takto nízky, či dokonca žiadny prídavok cholesterolu vhodnou voľbou pre prípravu kataniontových vezikulárnych systémov SEPT-DS s prídavkom DoDAC.

Tab. 5: Výsledky veľkosti častíc, koeficientu polydisperzity a zeta potenciálu vzoriek s rôznymi prídavkami cholesterolu.

cchol [mol. %]	Z- average [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]
0	116,5 ± 21,3	0,450 ± 0,120	51,9 ± 3,5
10	124,5 ± 10,9	0,460 ± 0,063	42,5 ± 11,0
20	123,6 ± 22,4	0,393 ± 0,063	51,7 ± 6,3
30	101,7 ± 13,5	0,394 ± 0,075	55,6 ± 5,3
40	103,5 ± 6,50	0,395 ± 0,140	56,2 ± 9,7

Vzorky s prídavkami 30 a 40 mol. % cholesterolu sa javia pomocou týchto metód ako vhodnou voľbou. Ich hodnoty veľkostí častíc sa nachádzajú v oblasti cca 100 nm, na základe hodnôt koeficientu polydisperzity možno systém považovať za hranične monodisperzný a zeta potenciál týchto častíc sa nachádza v stabilnej kladnej oblasti. Nasledujúci graf na obr. 25 zobrazuje priemerné veľkosti jednotlivých vzoriek s prídavkami cholesterolu v rozmedzí (0 – 40) mol. %.



Obr. 25: Graf priemerných hodnôt veľkostí častíc vzoriek s prídavkom cholesterolu v rozmedzí (0 – 40) mol. %.

5.2 Štúdium membránových vlastností kationtových vezikulárnych systémov s prídavkom cholesterolu

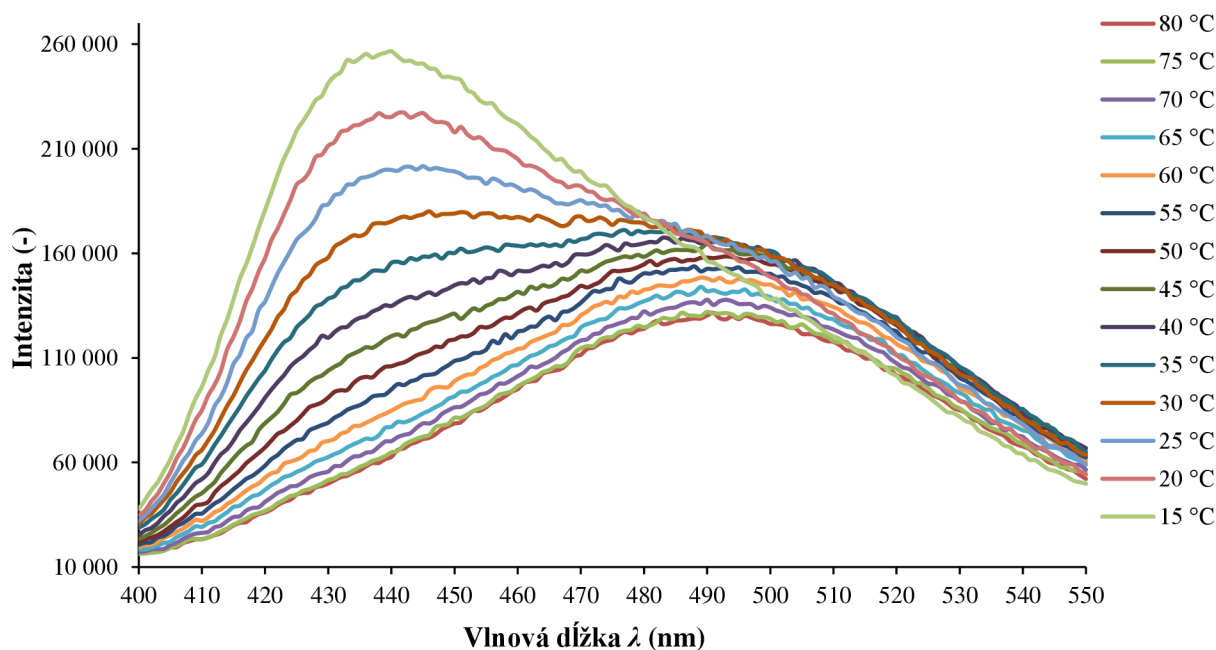
5.2.1 Určenie hydratácie membrány pomocou výpočtu generalizovanej polarizácie

Charakter generalizovanej polarizácie je zaznamenávanie intenzity emisie pri dvoch rôznych polarizáciách. Výhodou použitia sondy 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino) naftalénu (Laurdan) je, že táto sonda vykazuje vlastnosti polarizácie v dvoch rôznych oblastiach. Pri výpočte generalizovanej polarizácie bol použitý nasledujúci vzorec:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \rightarrow GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (8)$$

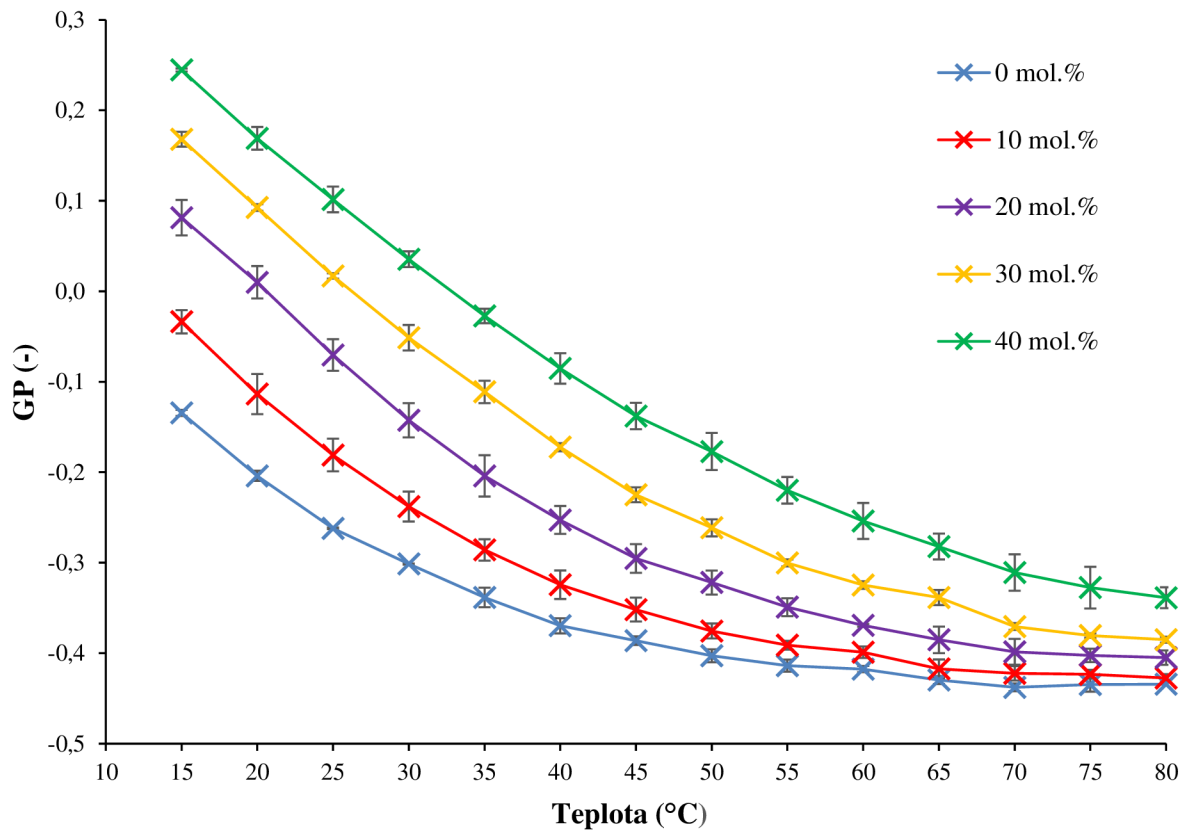
kedy I_B zobrazuje emisiu v modrej oblasti (konkrétne pre Laurdan pri maxime 440 nm) a I_R zobrazuje emisiu v červenej oblasti (konkrétne pre Laurdan pri maxime 490 nm), pričom hodnota generalizovanej polarizácie nadobúda rozmedzie od -1 do +1. Hodnota GP +1 označuje nehydratovanú, úplne usporiadanú membránu. Hodnota GP -1 zasa presný opak, a to úplne neorganizovanú, fluidnú membránu. Platí teda, že čím je hodnota generalizovanej polarizácie vyššia, tým je fluidita membrány nižšia a klesá aj hydratácia a rastie usporiadosť [67].

Meranie generalizovanej polarizácie prebehlo podľa nastavenia uvedeného v kap.4.4.5. pre všetky vzorky, pričom u každej vzorky boli zmerané jej 3 sady. Na obr. 26 je zobrazený príklad emisného spektra Laurdanu pre vzorku s prídavkom cholesterolu 40 mol. %. Postupným znižovaním teploty nastáva posun kriviek grafu k vyšším intenzitám emisie, kedy je značne veľký posun pri vlnovej dĺžke 440 nm, teda v modrej oblasti spektra. Narastá teda hodnota I_B , čo sa premietne vo výpočte ako zvýšená konečná hodnota generalizovanej polarizácie.



Obr. 26: Graf závislosti intenzity fluorescence sondy Laurdan v závislosti na vlnovej dĺžke (pre vzorku s prídavkom 40 mol% cholesterolu).

Tieto namerané hodnoty intenzity fluorescence pre rôzne teploty boli pomocou vzorca (8) vyššie prepočítané a výsledná hodnota generalizovanej polarizácie pre všetky vzorky je zobrazená na obr. 27.



Obr. 27: Závislosť hodnôt generalizovanej polarizácie na teplote pre vzorky s rôznymi koncentraciami mol. % cholesterolu.

Vyhodnotenie výsledkov generalizovanej polarizácie jednotlivých vzoriek zobrazuje, že najvyššia hodnota generalizovanej polarizácie u všetkých vzoriek bola nameraná pri najnižšej teplote (15 °C), čo ukazuje na vysokú rigidnosť a teda nízku fluiditu membrány, čo znamená, že membrána sa nachádzala v stave usporiadanej fáze. Postupným zvyšovaním teploty sa ale hodnota GP u všetkých vzoriek postupne znižuje, čo znamená že membrána vezikuly sa postupne stáva fluidnejšou, rastie neusporiadanosť, teda tekutosť, čo súvisí v väčšou solvatáciou a teda obsahom väčšieho množstva vody. Je zrejmé, že hodnoty generalizovanej polarizácie sú tým vyššie, čím vyšší je prídavok mol. % cholesterolu. Znamená to, že so zvyšujúcim sa prídavkom cholesterolu sa membrána stáva viac usporiadanejšou, dochádza k nižšej intenzite hydratácie membrány, čo sa ale so zvyšujúcou teplotou znižuje.

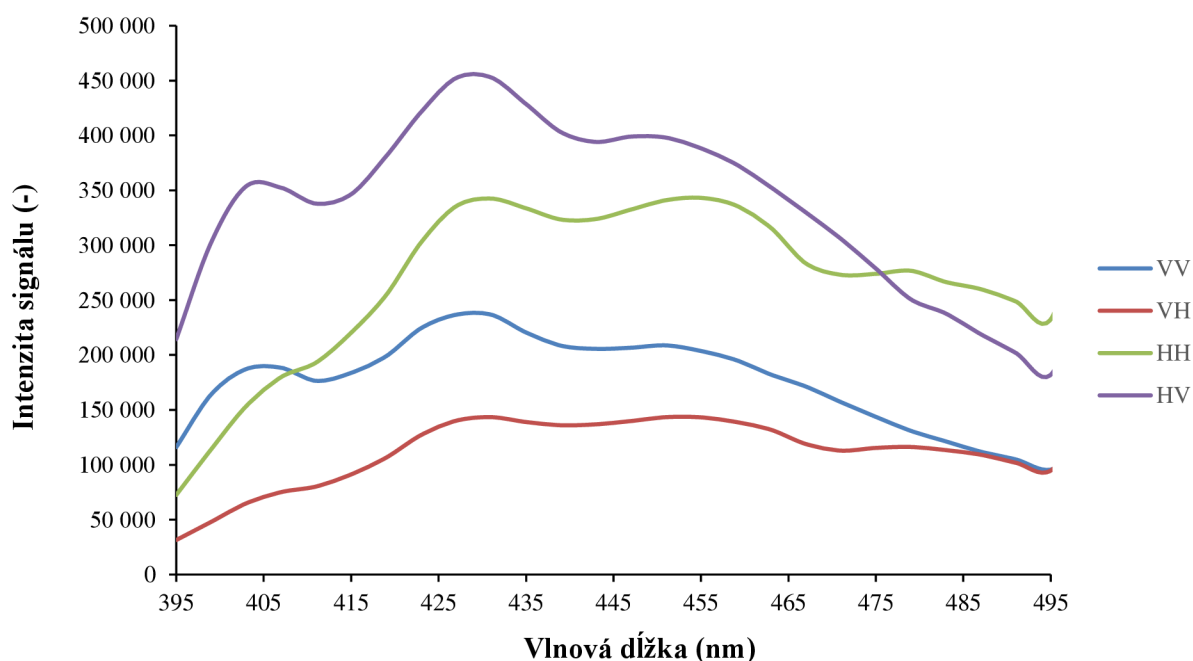
5.2.2 Určenie mikroviskozity membrány prostredníctvom fluorescenčnej anizotropie

Stanovenie anizotropie fluorescencie bolo určené ako rozsah lineárnej polarizácie emisie fluorescencie po fotoselekcii jednotlivých vzoriek. Jednotlivé merania všetkých sérií vzoriek s rôznym obsahom cholesterolu prebiehali v rozmedzí teplôt od 15 do 80 °C, pričom vzorka bola zahriata na teplotu 80 °C, pri ktorej bola zmeraná hodnota anizotropie a ďalšie meranie prebiehali vždy pri teplote o 5 °C nižšej. Pri každej teplote bol nasnímaný sken intenzity fluorescenčného signálu a následné vypočítaná fluorescenčná anizotropia pomocou vzťahu:

$$r = \frac{G(\lambda_{em}) \cdot I_{VV}(\lambda_{em}) - I_{VH}(\lambda_{em})}{G(\lambda_{em}) \cdot I_{VV}(\lambda_{em}) + 2 \cdot I_{VH}(\lambda_{em})} \quad (9)$$

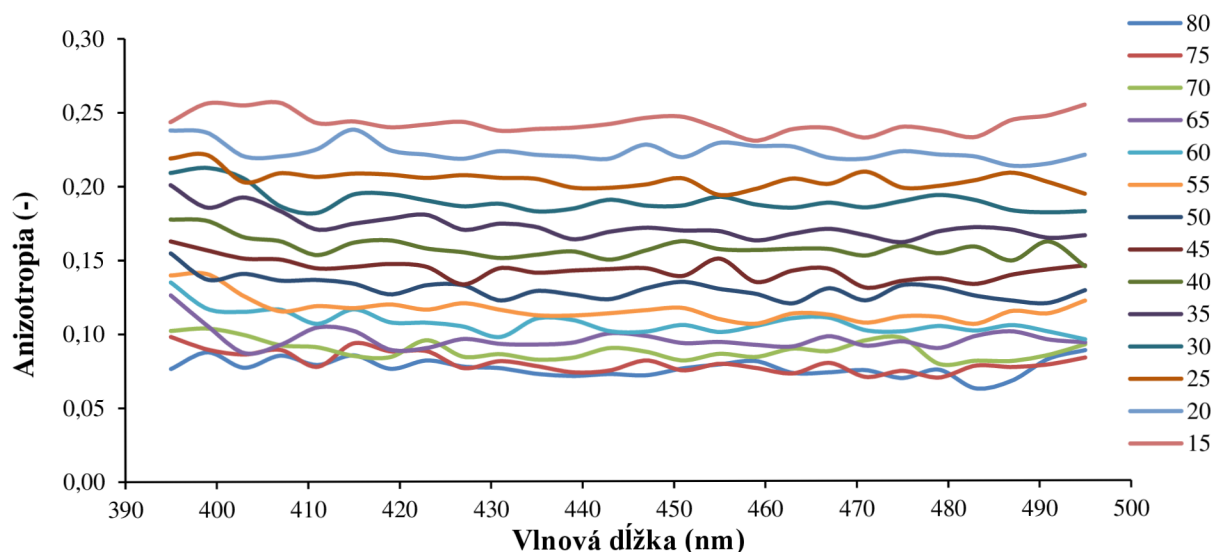
kedy G označuje G faktor, viac vysvetlený v kap. 2.7.3, I_{VV} a I_{VH} sú intenzity signálu vertikálne a horizontálne vzhľadom na orientáciu lúča budiaceho žiarenia.

Meranie fluorescenčnej anizotropie prebehlo podľa nastavenia uvedeného v kap.4.4.5. pomocou fluorescenčnej sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (DPH) u všetkých vzoriek s rôznym prídavkom mol.% cholesterolu, kedy pre každú vzorku bolo meranie uskutočnené pre 3 sady. Pridaním práve tejto sondy k systémom kationtových vezikúl možno sledovať viskozitu mikroprostredia, ktorá je priamo úmerná hodnote anizotropie. Výhodou tejto sondy je aj to, že je schopná sa po solubilizácii zabudovať do lipofilnej časti membrány, kde sa nachádza aj cholesterol a teda sme vďaka nej schopní sledovať účinok prídavku cholesterolu a nadobudnúť informácie o celkových zmenách stavu membrány. Na obr. 28 je zobrazený príklad emisného skenu pre vzorku s prídavkom cholesterolu 40 mol. % pri teplote 80 °C.



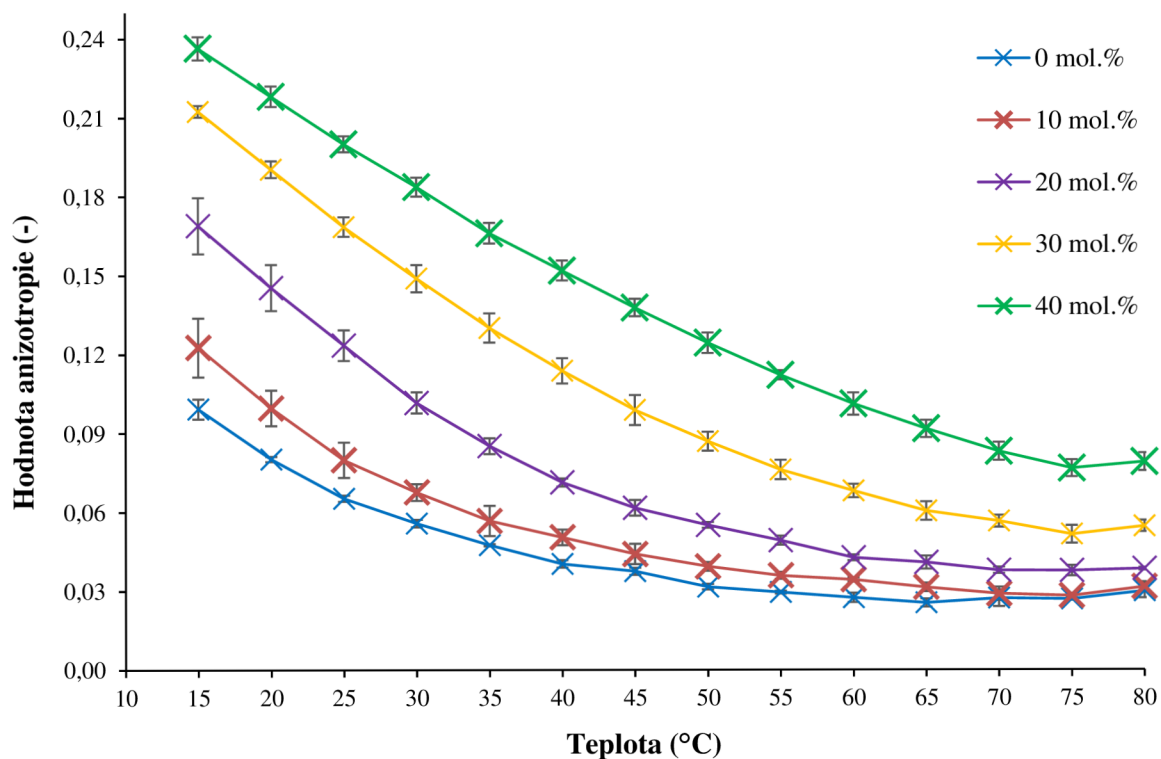
Obr. 28: Príklad emisného skenu vzorky s prídavkom 40 mol.% cholesterolu a sondou DPH pri teplote 80 °C.

Na obr. 29 sú uvedené hodnoty fluorescenčnej anizotropie v závislosti na vlnovej dĺžke, ktoré boli vypočítané pomocou vzorca (9). Namerané hodnoty sa nachádzajú pod limitnou hodnotou anizotropie DPH sondy (0,4) a priebeh kriviek je monotónny, čo naznačuje vhodne namerané dáta [68].



Obr. 29: Príklad nameraných hodnôt anizotropie vzorky s prídavkom 40 mol. % cholesterolu.

Súhrnné priemerné hodnoty fluorescenčnej anizotropie pre všetky pripravené vzorky sú uvedené na obr. 30.

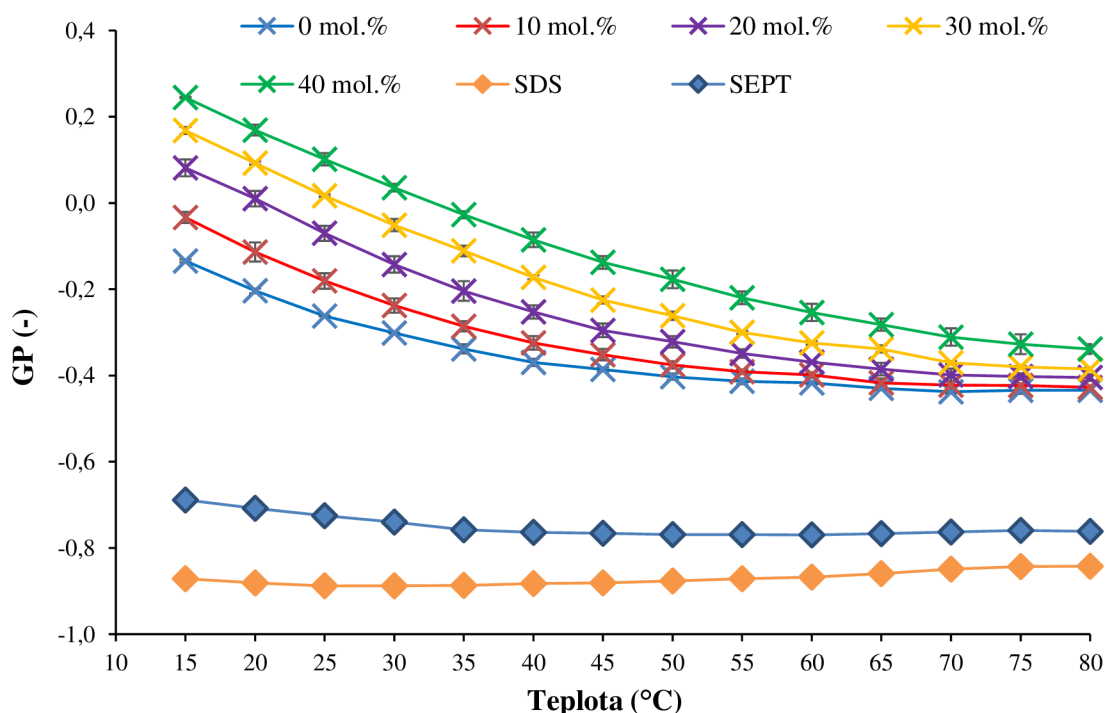


Obr. 30: Závislosť hodnôt fluorescenčnej anizotropie na teplote pre vzorky s rôznymi prídavkami mol. % cholesterolu.

Vyhodnotenie výsledkov merania fluorescenčnej anizotropie jednotlivých vzoriek zobrazuje, že najvyššia hodnota anizotropie u všetkých vzoriek bola takisto nameraná pri najnižšej teplote (15 °C) a je viditeľný pokles so zvyšujúcou sa teplotou vzorky. Znižovaním hodnoty anizotropie sa zvyšuje fluidita membrány. Naopak, pridaním cholesterolu k systému kataniontových vezikúl prišlo k zvýšeniu hodnôt anizotropie, čo naznačuje zníženú fluiditu membrány a zvýšené usporiadanie dvojvrstvy, nastáva teda tzv. *disordering effect*.

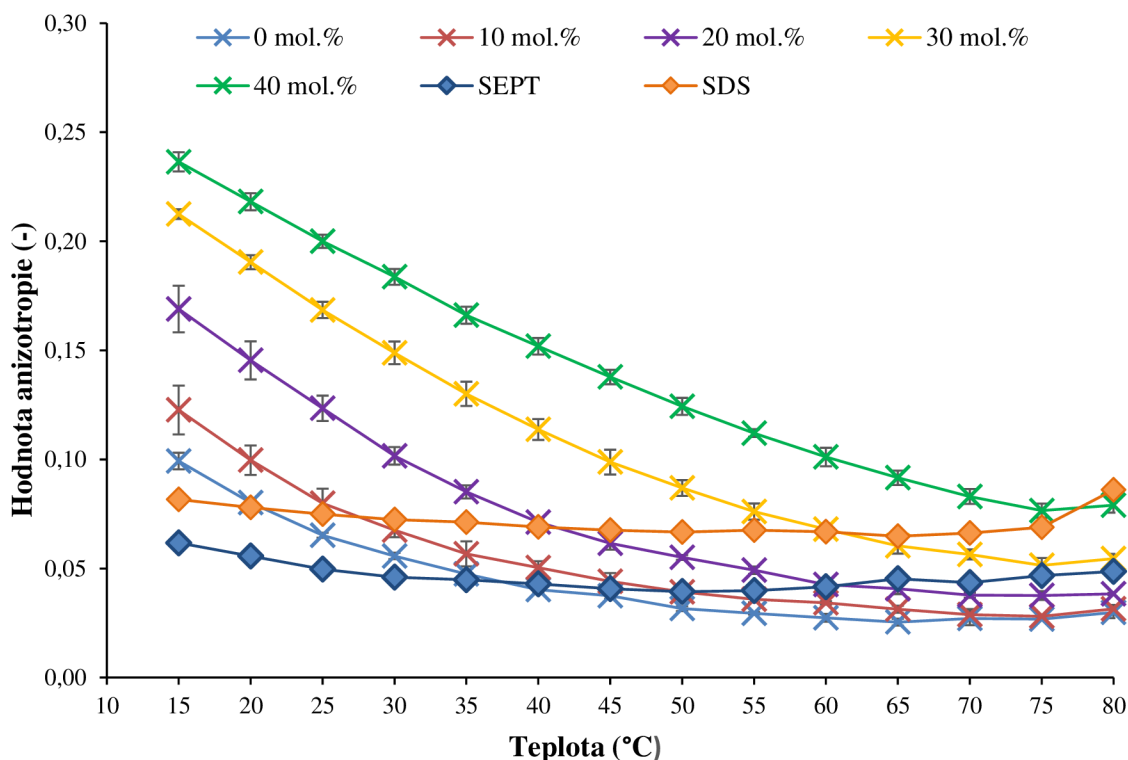
5.2.3 Štúdium membránových vlastností micel tvorených tenzidmi Septonex a SDS

Určenie hodnôt generalizovanej polarizácie micelárnych systémov tvorených tenzidmi Septonex a SDS prebiehalo rovnako ako u predošlých vzoriek. Obr. 31 prezentuje porovnanie vypočítaných hodnôt generalizovanej polarizácie vezikúl s rôznym pridaným množstvom cholesterolu a micel tvorených rovnakými povrchovo aktívnymi látkami ako skúmané vezikuly. Ako je už na prvý pohľad zjavné, hodnoty GP micelárnych systémov sú veľmi nízke, avšak nezasahujú prípustnú hranicu -1, ktorá označuje úplne neorganizovanú, fluidnú membránu. Je vidieť, že hodnoty generalizovanej polarizácie sa so zvyšujúcou teplotou skoro nemenia. Hodnoty generalizovanej polarizácie micel tvorených tenzidom SDS sú nižšie, ako hodnoty namerané pre micely obsahujúce Septonex, čo vypovedá o tom, že tieto micely sa nachádzajú v mierne usporiadanejšom stave ako micely tvorené tenzidom SDS. Z grafu taktiež vyplýva, že namerané hodnoty generalizovanej polarizácie sa skoro nemenia v závislosti na teplote, čo dokazuje o plnej hydratacii týchto micel.



Obr. 31: Porovnanie hodnôt generalizovanej polarizácie v závislosti na teplote u kataniontových vezikúl s rôznym obsahom cholesterolu a micelárnych systémov.

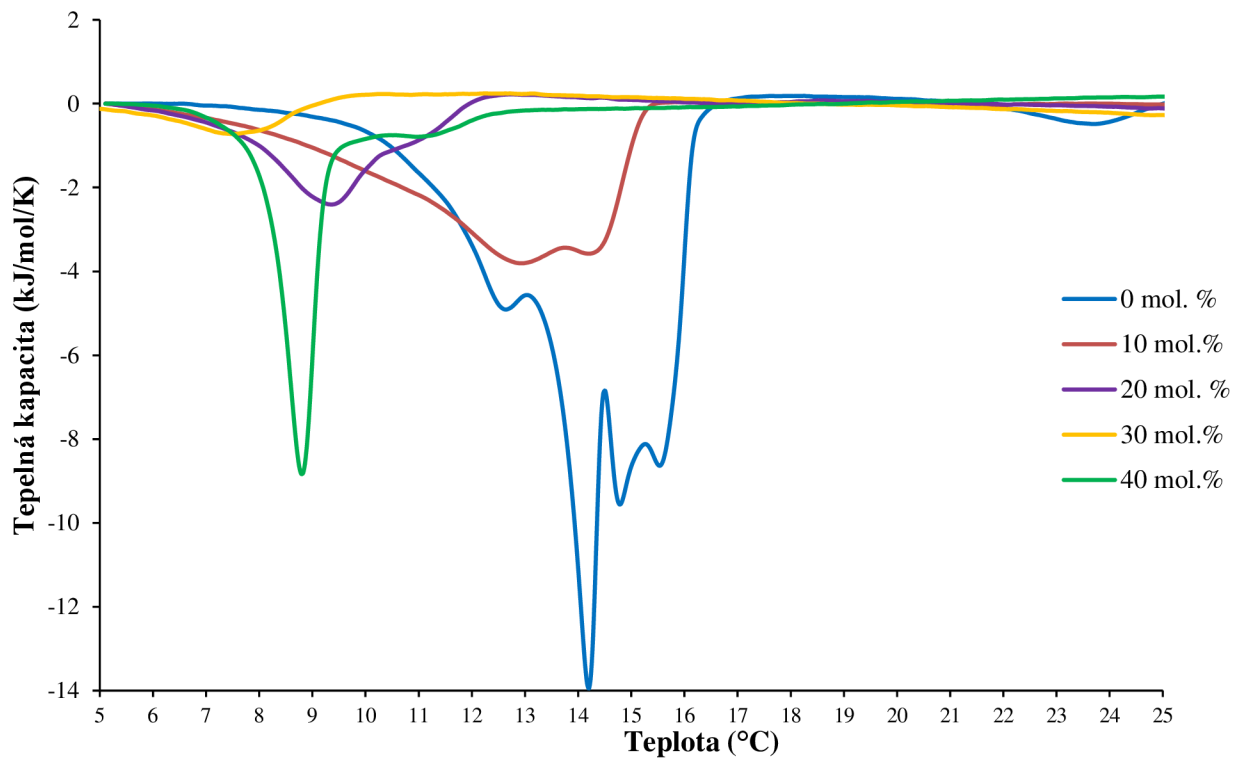
Hodnoty fluorescenčnej anizotropie micelárnych systémov tvorených tenzidmi Septonex a SDS takisto prebiehalo rovnako ako u predošlých vzoriek kataniontových vezikúl. Na obr. 32 je zobrazená porovnanie vypočítaných hodnôt anizotropie vezikúl s rôznym pridaným množstvom cholesterolu a micel tvorených rovnakými tenzidmi ako skúmané vezikuly. Hodnoty anizotropie jednotlivých micel nevykazujú v závislosti na teplote významné zmeny a tieto hodnoty dokazujú zvýšenú fluiditu membrány micel, takže ich plnú hydratovanosť.



Obr. 32: Porovnanie hodnôt fluorescenčnej anizotropie v závislosti na teplote u kataniontových vezikúl s rôznym obsahom cholesterolu a micelárnych systémov.

5.3 Meranie fázového prechodu pomocou DSC

Stanovenie teploty fázového prechodu bolo u všetkých vzoriek určené pomocou techniky mikrokolorimetrie a výsledky sú zobrazené na obr. 33. Uvedený graf obsahuje iba informácie získané postupným chladením vzoriek, teda pri znižovaní teploty, postupne v rozsahu 40 – 5 °C. Je to z dôvodu porovnania informácie o membránach jednotlivých vzoriek s predošlými informáciami získanými pomocou techniky fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie, kde takisto prebiehalo meranie za postupného znižovania teploty. Výsledky merania udávajú, že s postupným nárastom prídavku cholesterolu sa znižuje teplota, pri ktorej začína zmena fázového prechodu vzoriek. Tieto oblasti teplôt, v ktorých fázový prechod nastáva, sa pohybujú v oblasti 15 °C a nižšej. Vďaka tomuto poznatku je teda zjavné, prečo u vzoriek kataniontových vezikulárnych systémov tvorených tenzidmi Septonex a SDS nedochádza pri meraní fluorescenčnej anizotropie a generalizovanej polarizácie k sigmoidnému prechodu membrán z S_0 – pevnej usporiadanej fáze do L_0 – kvapalnej usporiadanej fáze. Merania totiž prebiehali v teplotnej oblasti za teplotou fázového prechodu, kedy sa membrána už nachádzala v stave kvapalnej usporiadanej fáze.



Obr. 33: Hodnoty teplôt fázového prechodu vzoriek vezikul s rôznym obsahom cholesterolu.

6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium membránových vlastností kataniontových vezikulárnych systémov tvorených novými amfifilnými párami pozostávajúcich z povrchovo aktívnych látok Septonex a SDS. Septonex (Karbethopendicinium bromid) je povrchovo aktívny kationický surfaktant, ktorého výskyt a výskum je charakteristický pre Českú republiku. Výskum kataniontových vezikulárnych systémov obsahujúcich tento tenzid je v začiatkoch, avšak zistením vhodnosti použitia tejto látky sa otvárajú nové možnosti vo výskume kataniontových vezikulárnych systémov ako potenciálnych nosičových systémov liečiv.

V rešeršnej časti diplomovej práce boli vyhľadané a následne zvolené vhodné techniky pre charakterizáciu vzniknutých častíc vezikulárnych systémov obsahujúcich amfifilný pár SEPT–DS s obsahom kladného dvojreťazcového surfaktantu DoDAC. Na základe literárnej rešerše bol zvolený aj prídavok mol. % cholesterolu, ktorý by dostatočne reprezentoval rozmedzie pridaného cholesterolu. Zvolené vzorky obsahujúce žiadny cholesterol, 10, 20, 30 a 40 % cholesterolu boli ihneď po príprave premerané pomocou metódy dynamického a elektroforetického rozptylu svetla. Výsledky distribúcie veľkosti častíc a určenie stability častíc pomocou hodnoty zeta potenciálu udávajú, že vzorky s prídavkom cholesterolu v rozmedzí (20 – 40) mol. % vykazujú vhodnejšie častice, keďže veľkosti častíc a hodnoty koeficientu polydisperzity sa pohybujú v požadovaných hodnotách.

Najvhodnejšie výsledky boli pozorované u vzoriek s prídavkom 40 mol. % cholesterolu, kedy koeficient polydisperzity PdI bol u všetkých vzoriek najnižší, s hodnotou $0,395 \pm 0,140$, distribúcia veľkosti častíc sa nachádzala v požadovanom rozmedzí (90 – 120) nm, častice vykazovali veľkosť 104 ± 7 nm a zeta potenciál sa nachádzal v stabilnej, kladnej oblasti s hodnotou 56 ± 10 mV. Cholesterol totiž zabudovaním do dvojvrstvovej membrány spôsobí zväčšenie vzdialenosti medzi nabitými polárnymi skupinami povrchovo aktívnych látok, ktoré sa navzájom odpudzujú, čím upravuje ako intra–molekulové vlastnosti, tak aj zlepšuje inter–vezikulárnu elektrostatickú odpudivosť a tým sa zlepšuje stabilita vezikuly. Je teda zrejmé, že nižšie hodnoty prídavku cholesterolu neudávajú dostatočné výsledky pre požadované častice. Na základe literárnej rešerše bol zvolený maximálny prídavok mol. % cholesterolu na 40 mol. %, keďže sa predpokladá, že vyššie hodnoty prídavku cholesterolu by vykazovali nestabilné systémy, pretože prídanie vyššieho množstva cholesterolu spôsobí, že v systéme je vyšší pomer cholesterolu ako samotných IPA a dochádza k vzniku tzv. lipidových raftov, čo sú domény bohaté na steroly a sfingolipidy, nachádzajúce sa v membráne. Môžu ovplyvňovať fluiditu samotnej membrány [69]. Ku konkrétnejšiemu stanoveniu najvhodnejšieho množstva cholesterolu by bolo však potrebné previesť aj testy dlhodobej stability jednotlivých vzoriek.

Techniky použité k štúdiu membránových vlastností vzniknutých kataniontových vezikúl boli takisto zvolené na základe literárnej rešerše. Pomocou fluorescenčnej anizotropie s použitím sondy DPH bola skúmaná fluidita membrány, konkrétne jej vnútornej časti. Meranie všetkých vzoriek prebiehalo v rozsahu teplôt (15 – 80) °C. Najvyššia hodnota anizotropie u všetkých vzoriek bola nameraná pri najnižšej teplote (15 °C) a so zvyšujúcou sa teplotou vzorky sa postupne hodnota anizotropie znižovala. Znižovanie hodnoty anizotropie udáva zvyšovanie fluidity membrány. Postupným zvyšovaním prídavku cholesterolu dochádzalo k zvýšeniu

hodnôt anizotropie. Z čoho napokon vyplýva, že najvyššiu hodnotu anizotropie vykazovala vzorka s prídavkov cholesterolu 40 mol. % pri najnižšej teplote (15 °C) čo naznačuje zníženú fluiditu membrány a teda udáva najviac usporiadanú dvojvrstvu.

Metóda výpočtu generalizovanej polarizácie vykazuje obdobné výsledky. Bola použitá fluorescenčná sonda Laurdan, ktorá vďaka svojej chemickej štruktúre sprostredkováva informácie o vonkajšej časti membrány a teda o hydratačnom obale vezikuly. Najvyššia hodnota generalizovanej polarizácie u všetkých vzoriek bola nameraná pri najnižšej teplote (15 °C), čo ukazuje na vysokú rigidnosť. Postupným zvyšovaním teploty až k teplote 80 °C sa hodnota GP u všetkých vzoriek postupne znižuje, čo znamená že rastie neusporiadanosť membrán a teda sa zvyšuje aj tekutosť, čo súvisí s väčšou hydratáciou a teda obsahom väčšieho množstva vody. Postupným zvyšovaním prídavku cholesterolu dochádzalo k zvýšeniu hodnôt generalizovanej polarizácie. Znamená to teda, že najvyššiu hodnotu GP vykazovala vzorka s prídavkov cholesterolu 40 mol. % pri najnižšej teplote (15 °C) čo naznačuje zníženú fluiditu a hydratáciu membrány, a teda udáva najviac usporiadanú dvojvrstvu s najnižším obsahom vody.

Tieto výsledky možno vysvetliť tým, že teplota fázového prechodu, teda prechod membrán z fázy neusporiadanej do fázy usporiadanej sa u SEPT-DS nachádza v oblasti pod meraných 15 °C, ako zobrazuje doplnkové meranie pomocou metódy diferenčnej skenovacej kalorimetrie (DSC). Keďže teplota fázového prechodu všetkých vzoriek je pod hranicou 15 °C, nedochádza u meraní anizotropie aj generalizovanej polarizácie k sigmoidnému charakter kriviek, ale nastáva postupné monotónne klesanie hodnôt. Znamená to, že v rozsahu teplôt 15 – 80 °C, zostupným meraním nenastane membránový prechod z *Lo* – kvapalnej usporiadanej fáze do *So* – pevnej usporiadanej fáze ani pri rôznych prídavkoch cholesterolu, keďže k tomuto prechodu pravdepodobne dochádza pri teplotách pod 15 °C a nižších. Toto nastavenie sa odvíjalo od nastavení pre predošlé skúmané vzorky s obsahom tenzidov CTAB, avšak záverom tejto práce je, že kataniontové vezikulárne systémy s obsahom tenzidu Septonex majú fázový prechod posunutý k nižším teplotám.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes: *Chemické listy*. Praha, 1999, (93) 421-427.
- [2] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [3] *Český lékopis 1997: Pharmacopoea bohemica MCMXCVII: (Ph. B. XCVII)*. 3. díl, Léčivé a pomocné látky, 3. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-625-0.
- [4] ARCHIVUS MEDICUS, 2003. Bratislava: vydavateľská spoločnosť TPEQ, s. 85, ISBN 80-968766-2-7.
- [5] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 160944, Septonex. Retrieved September 6, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160944>.
- [6] Smulders, E.; Sung, E. "Laundry Detergents, 2. Ingredients and Products". Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. doi:10.1002/14356007.o15_013 (https://doi.org/10.1002%2F14356007.o15_013).
- [7] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science*. 2018, 67(6), 727-735. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess18008.
- [8] Dimethyldioctadecylammonium chloride [online]. In: [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/40167?lang=en®ion=CZ>
- [9] Surfactants. *The Essential Chemical Industry - online* [online]. The Essential Chemical Industry (ECI) - online, 2013, 2013 [cit. 2023-01-13]. Dostupné z: <https://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/surfactants.html>
- [10] *Bezpečnostní list: Identifikace látky/směsi a společnosti/podniku*. In: . Nemecko: Department Health, Safety and Environment, 2015, 1907/2006. Dostupné z: https://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/5/SDB_5136_CZ_CS.pdf
- [11] A. M. BONDI, Cara, Julia L. MARKS a Lauren B. WROBLEWSKI. Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. *Environmental Health Insights*. Libertas Academica, 2015, 9, 27-32. Dostupné z: doi:10.4137/EHI.S31765
- [12] PRASAD NIRULA, Tulasi, Ajaya BHATTARAI a Sujeet KUMAR CHATTERJEE. Sodium dodecylsulphate: A very useful Surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*. Department of Chemistry, Mahendra Morang Adarsh Multiple Campus, Tribhuvan University, Biratnagar, Nepal, 2014, 2(1), 111-113. ISSN 2350-8884(P).
- [13] Tenside & Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC). In: *Dataphysics Understanding Interfaces* [online]. Germany: DataPhysics Instruments, 2019 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: <https://www.dataphysics-instruments.com/de/wissen/grenzflaechen-verstehen/tenside-cmc>
- [14] ATKINS, Peter a Julio DE PAULA. Fyzikální chemie. *Atkin's Physical Chemistry*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, s. 633-634. ISBN 978-80-7080-830-6.

- [15] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii: výkladový slovník* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005 [cit. 2022-6-9]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/
- [16] SEDLAŘÍKOVÁ, JANA. *CHEMIE A TECHNOLOGIE TENZIDŮ II* [online]. Zlín [cit. 2022-6-9]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [17] RAY, Krishanu. From fission to fusion: A perspective on the research that won the Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2013. *Journal of Biosciences*. 2014, 39(1), 3- 11. DOI: 10.1007/s12038-014-9416-1. ISSN 0250-5991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-014-9416-1>
- [18] MARQUES, E.F., O. REGEV, A. KHAN a B. LINDMAN. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2003, (100-102), 83-104. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(02)00068-4
- [19] TONDRE, Christian a Céline CAILLET. Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from a literature analysis. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2001, 93(1-3), 115-134. DOI: 10.1016/S0001-8686(00)00081-6. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868600000816>.
- [20] BIJU, S.S., Sushuma TALEGAONKAR, P.R. MISHRA a R.K.Khar. Vesicular systems: An overview. *The Indian Journal of Pharmacy*. 2006, 2(68), 141-153. DOI: 10.4103/0250-474X.25707.
- [21] Castañeda-Reyes ED, Perea-Flores MJ, Davila-Ortiz G, Lee Y, de Mejia EG. Development, Characterization and Use of Liposomes as Amphipathic Transporters of Bioactive Compounds for Melanoma Treatment and Reduction of Skin Inflammation: A Review. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:7627-7650 <https://doi.org/10.2147/IJN.S263516>
- [22] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG. Recent strategies in the Development of Catanionic Vesicles. *Journal of Oleo Science*. Japan, 2016, 5(65), 377-384. DOI: 10.5650/jos.ess.15249
- [23] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double - chained surfactant. *Colloid and polymer science*. 292, 589-597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9.
- [24] Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir*. 2005, 21(14), 6179-6184. Dostupné z: doi:10.1021/la047207
- [25] HAVLÍKOVÁ, Martina a Adam JUGL. Interactions between Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles and Hyaluronan—A Physicochemical Study. *Langmuir*. 2021, 37(28), 8525-8533. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.1c00993
- [26] ATWOOD, Harold L. a W.A. MACKAY. *Essentials Of Neurophysiology*. In: *Plasma membrane*. Philadelphia: B.C. Decker Inc., Toronto, 1989. ISBN 1556640552.

- [27] Cholesterol. In: *Merck* [online]. Germany: Merck KGaA, Darmstadt, 2022 [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/c3045>
- [28] The Lipid Bilayer. In: ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS a Martin RAFF. *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [29] Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:111-36. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.111. PMID: 9891780.
- [30] Scott, H. L. (1974). A model for phase transitions in lipid bilayers and biological membranes. *Journal of Theoretical Biology*, 46(1), 241–253. doi:10.1016/0022-5193(74)90150-7
- [31] [26] J. JOHNSON, Emily, Tessa MOSES a Susan J. ROSSER. The wide-ranging phenotypes of ergosterol biosynthesis mutants, and implications for microbial cell factories. *Yeast Wiley*. 2020, **37**, 27-44. Dostupné z: doi:10.1002/yea.3452
- [32] SKOOG, Douglas A. a Donald M. WEST. *Analytická chemie: s.693-694*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [33] LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy: Introduction to Fluorescence*. Boston, MA: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-46312-4.
- [34] Fluorochromy. *LAB Guide* [online]. 4WORKS Solutions, 2022 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: <https://labguide.cz/reagencie/fluorochromy/>
- [35] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2002 [cit. 2023-02-17]. ISBN 9783527299195.
- [36] Teoría de Fluorescencia y Fosforescencia. *LibreTexts Espanol* [online]. Spain: Department of Education Open Textbook Pilot Project, 2010 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/An%C3%A1lisis_Instrumental_\(LibreTextos\)/15%3A_Luminiscencia_Molecular/15.01%3A_Teor%C3%ADa_de_Fluorescencia_y_Fosforescencia](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/An%C3%A1lisis_Instrumental_(LibreTextos)/15%3A_Luminiscencia_Molecular/15.01%3A_Teor%C3%ADa_de_Fluorescencia_y_Fosforescencia)
- [37] FIŠAR, Zdeněk. Principy fluorescenční spektroskopie. [online]. [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
- [38] YAN-LIANG, Zhang, John A. FRANGOS a Mirianas CHACHISVILIS. Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, (347), 838-841. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.152
- [39] Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(10), 1541–1556. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.019
- [40] Pilkington, E., Gurzov, E., Kakinen, A. *et al.* Pancreatic β -Cell Membrane Fluidity and Toxicity Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide Species. *Sci Rep* **6**, 21274 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep21274>
- [41] PARASASSI, Tiziana, Ewa K. KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence*. 1998, 8(4), 365-373. DOI: 10.1023/A:1020528716621. ISSN 10530509. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020528716621>.
- [42] Harris FM, Best KB, Bell JD. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid

- order. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 20;1565(1):123-8. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00514-x. PMID: 12225860.
- [43] KRASNOWSKA, E. K., E. GRATTON a T. PARASASSI. Prodan as a Membrane Surface Fluorescence Probe: Partitioning between Water and Phospholipid Phases. *Biophysical Journal* [online]. 1998, 74(4), 1984-1993 [cit. 2023-02-18]. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77905-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349598779056>
- [44] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch: Principy fluorescenční spektroskopie [online]. 2009 [cit. 2023-02-19]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>.
- [45] UHRÍKOVÁ, D. *Biofyzika - vybrané kapitoly*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2015. ISBN 978-80-223-3800-4.
- [46] Litman, B. J., & Barenholz, Y. (1982). [91] Fluorescent probe: Diphenylhexatriene. *Biomembranes - Part H: Visual Pigments and Purple Membranes - I*, 678–685. doi:10.1016/s0076-6879(82)81093-8
- [47] LITMAN, Burton J. a Y. BARENHOLZ. [91] Fluorescent probe: Diphenylhexatriene. *Biomembranes - Part H: Visual Pigments and Purple Membranes - I*. Elsevier, 1982, 1982, 81(1), 678-685. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121819811. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(82)81093-8.
- [48] 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene. In: *Merck* [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2023 [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/aldrich/d208000>
- [49] SCHNITZKY, M. In: *Physiology of Membrane Fluidity*. Florida: CRC Press, 1983, s. 2-39. ISBN 978-0849361418.
- [50] Zetasizer Nano ZS90. Malvern Panalytical [online]. Velká Británie: Malvern Panalytical Ltd, 2015 [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>
- [51] *Dynamic Light Scattering (DLS)* [online]. In: . Malvern Panalytical, 2023 [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [52] The principles of dynamic light scattering. *Anton Paar* [online]. Austria: Anton Paar GmbH - Company Overview Information, 2023 [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>
- [53] Weiss, J.N. (2022). Dynamic Light Scattering (DLS) Spectroscopy. In: *Dynamic Light Scattering Spectroscopy of the Human Eye*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06624-5_3
- [54] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*. 2016, **235**, 337-351. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [55] Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics. AZO Nano [online]. [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>
- [56] Zeta potenciál zeta: Potenciál zeta a elektrická dvojrstva. In: *Czech and Slovak Crystallographic Association* [online]. Praha, 2021 [cit. 2023-02-12]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>

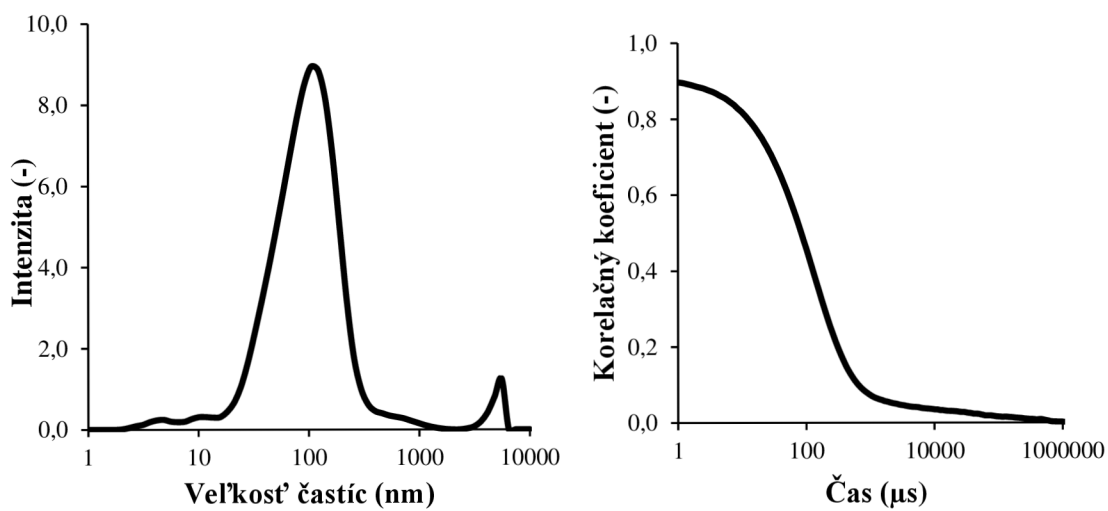
- [57] ZVARÍK, Milan a Iveta WACZULÍKOVÁ. *Experimentálne metódy biofyziky a lekárskej fyziky*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2022. ISBN 978-80-8147-128-5.
- [58] GABBOT, P. *Principles and Applications of Thermal Analysis: A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry*. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2008. ISBN 9780470697702.
- [59] Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). *Meller Toledo* [online]. Praha [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: https://www.mt.com/cz/cs/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/TA_Family_Browse/DSC.html
- [60] HARRIS, Faith M, Katrina B BEST a John D BELL. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2002, 1565(1), 123-128. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(02)00514-X
- [61] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2018, 92, 29-35 [cit. 2023-03-10]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [62] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of cationic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, 607 [cit. 2023-03-11]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526
- [63] CHENG, Chia-Yu, Yu-Fang LAI a Yu-Ling HSIEH. Divergent effects of cholesterol on the structure and fluidity of liposome and cationic vesicle membranes. *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 2022, (596), 1827-1838. Dostupné z: doi:10.1002/1873-3468.14375
- [64] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Ludmila MRAVCOVÁ, Tereza VENEROVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Miloslav PEKAŘ, Adam JUGL a Filip MRAVEC. Cholesterol Effect on Membrane Properties of Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles at Different Temperatures. *Langmuir*. 2021, 37(7), 2436-2444. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c03504
- [65] DANAIEI, M., M. DEGHANKHOLD, F.H. DAVANARI a R. JAVANMARD. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier System. *Pharmaceutics*. 2018, 10(57), 1-17. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [66] VERMA, D.D., S. VERMA, G. BLUME a A. FAHR. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, (258), 141-151. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00183-2.

- [67] PARASASSI, T., G. DE STASIO, A. D'UBALDO a E. GRATTON. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* [online]. 1990, 57(6), 1179-1186 [cit. 2023-03-19]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(90)82637-0
- [68] Other Nonpolar and Amphiphilic Probes, section 13.5: DPH and DPH Derivatives. *Life technologies* [online]. [cit. 2021-03-02]. Dostupné z <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-lipids-and-membranes/other-nonpolar-and-amphiphilic-probes>
- [69] Thomas S, Preda-Pais A, Casares S, Brumeanu TD. Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol*. 2004 Jun;41(4):399-409. doi: 10.1016/j.molimm.2004.03.022. PMID: 15163537.

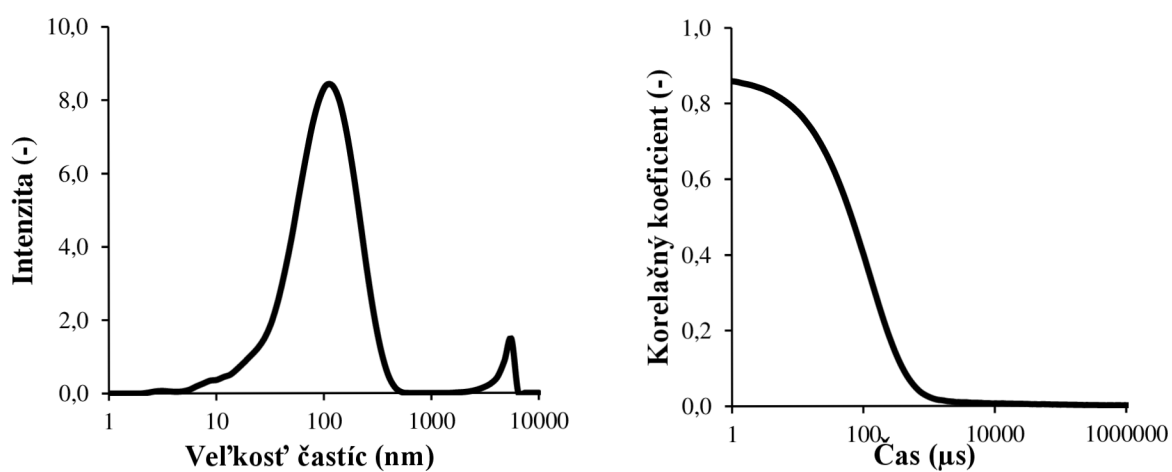
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Skratka	Význam skratky
<i>a</i>	Plocha
<i>c</i>	Koncentrácia
CMC	Kritická micelárna koncentrácia
<i>D</i>	Difúzny koeficient
DLS	Dynamický rozptyl svetla
DoDAC	Dioktadecyldimetylamónium chlorid
DPH	Difenylhexatrién
DSC	Diferenčná skenovacia kalorimetria
ELS	Elektroforetický rozptyl svetla
GP	Generalizovaná polarizácia
GUV	Obrovské unilamelárne vezikuly
IPA	Amfifilný iontový pár
<i>k_B</i>	Boltzmannova konštanta
<i>l</i>	Dĺžka
Ld fáza	Kvapalná neusporiadaná fáza
Lo fáza	Kvapalná usporiadaná fáza
LUV	Veľké unilamelárne vezikuly
MLV	Multilamelárne vezikuly
<i>N_s</i>	Úložný faktor
PdI	Koeficient polydisperzity
<i>r_H</i>	Hydrodynamický polomer častice
<i>r</i>	Anizotropia
SDS	Dodecylsulfát sodný
So fáza	Pevná usporiadaná fáza
SUV	Malé unilamelárne vezikuly
<i>T</i>	Termodynamická teplota
<i>T_k</i>	Krafftova teplota
<i>V</i>	Objem
π	Eulerovo číslo

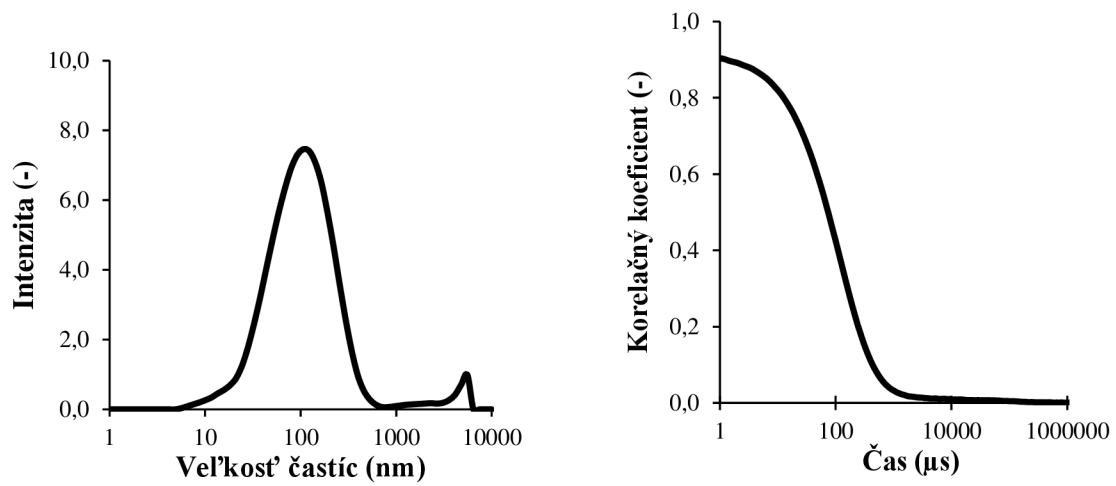
9 PRÍLOHA



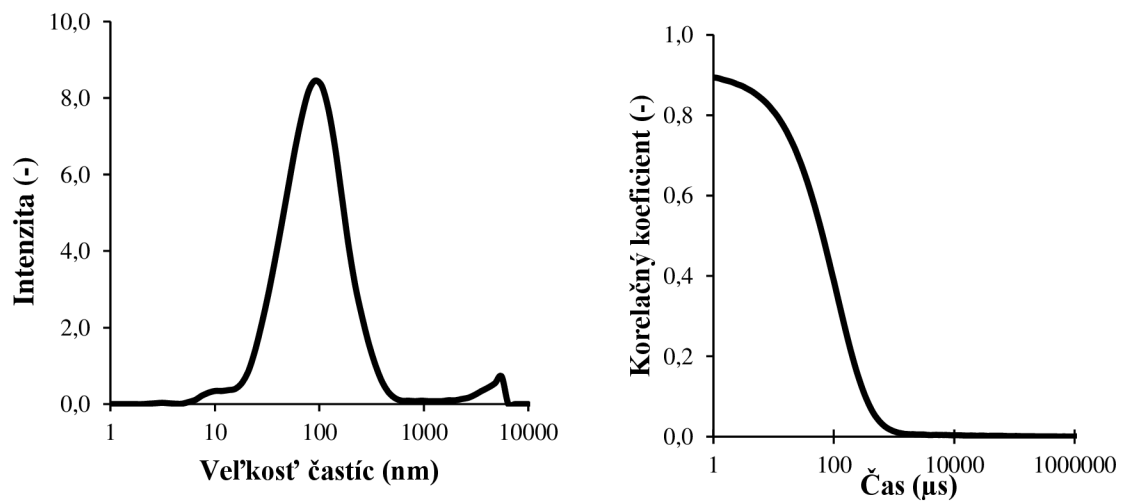
Obr. 34: Graf veľkosti častíc a distribučná krivka vzoriek bez prídavku cholesterolu



Obr. 35: Graf veľkosti častíc a distribučná krivka vzoriek s prídavkom 10 mol.% cholesterolu



Obr. 36: Graf veľkosti častíc a distribučná krivka vzoriek s prídavkom 20 mol.% cholesterolu



Obr. 37: Graf veľkosti častíc a distribučná krivka vzoriek s prídavkom 30 mol.% cholesterolu