



# 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

# INTERAKCE ZÁPORNĚ NABITÝCH VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ NA BÁZI IONTOVÝCH AMFIFILNÍCH PÁRŮ S POLYKATIONTY

INTERACTION OF NEGATIVELY CHARGED VESICULAR SYSTEMS BASED ON IONIC AMPHIPHILIC PAIRS  
WITH POLYCATIONS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Fardová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1631/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Lucie Fardová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Interakce záporně nabitých vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů s polykationty

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše zaměřená na přípravu komplexů polyaktiont– záporně nabitý vezikulárních systém s přihlédnutím k problematice iontových amfifilních párů a vhodných metod studia.
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodné metody přípravy a studia záporně nabitého systému na bázi amfifilního páru Cetyltrimethylamonium–dodecylsírán a hydrochloridu diethylamino dextranu.
- 3) Na základě výsledků zhodnotit použité postupy přípravy a studia.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Lucie Fardová  
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato práce je zaměřena na přípravu záporně nabitých vezikulárních systémů z amfifilních párů zbavených protiiontů a jejich interakce s polykationem. Nejprve byly připraveny vezikulární systémy z povrchově aktivních látek dodecylsírany sodného a cetyltrimethylamonium bromidu. Přídavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové došlo ke stabilizaci a zároveň získání záporného náboje. Následně proběhla interakce s polykationem hydrochloridu diethylaminoethyl-dextranu. Systémy byly zkoumány měřením velikosti částic, zeta potenciálu, generalizované polarizace a anizotropie. Měření generalizované polarizace bylo umožněno pomocí sondy laurdan a měření anizotropie bylo uskutečněno zavedením sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien. Výsledky ukazují na úspěšnou přípravu stabilních systémů se záporným nábojem, které interagovaly s kladným hydrochloridem diethylaminoethyl-dextranem, ten ovlivnil chování vnější membrány, ale vnitřní nikoli. Systémy se stále držely ve stabilní oblasti.

## **ABSTRACT**

This work is focused on the preparation of negatively charged vesicular systems from amphiphilic pairs deprived of counterions and their interaction with the polycation. First, vesicular systems were prepared from the surfactants sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide. The addition of cholesterol and phosphatidic acid stabilized and at the same time gained a negative charge. Subsequently, there was an interaction with the polycation diethylaminoethyl-dextran hydrochloride. The systems were investigated by the measuring of particle size, zeta potential, generalized polarization and anisotropy. The measurement of generalized polarization was enabled with the laurdan probe and measurement of anisotropy was performed with the introduction of the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene probe. The results indicate the successful preparation of stable, negatively charged systems that interacted with positive diethylaminoethyl-dextran hydrochloride, which affected the behavior of the outer membrane but not the inner. The systems were still stable.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Katanionický vezikulární systém, cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), dodecylsírany sodný (SDS), kyselina fosfatidová (PA), cholesterol, hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dx·HCl), dynamický rozptyl světla, zeta potenciál, generalizovaná polarizace, anizotropie

## **KEYWORDS**

Catanionic vesicular system, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS), phosphatidic acid (PA), cholesterol, diethylaminoethyl-dextran hydrochloride (DEAE-Dx·HCl), dynamic light scattering, zeta potential, generalized polarization, anisotropy

FARDOVÁ, Lucie. *Interakce záporně nabitých vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů s polykationty* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-17]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131420>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za možnost pracovat pod jeho vedením, odborné rady a čas při konzultacích. Obrovské poděkování patří Ing. Janě Szabové za její ochotu, podporu, velkou trpělivost, věnovaný čas a poskytnuté cenné rady s různými nápady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat celé rodině, partnerovi a přátelům za jejich trpělivost a ochotu, ovšem největší poděkování patří mým rodičům za jejich podporu během celého studia.*

## OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
2.1 Tenzidy a tvorba micel .....	8
2.1.1 Dodecylsulfát sodný .....	9
2.1.2 Cetyltrimethylamonium bromid .....	10
2.2 Vezikuly .....	10
2.2.1 Druhy vezikul .....	11
2.2.2 Příprava vezikul .....	12
2.3 Směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek .....	13
2.3.1 Katanionické směsi .....	14
2.3.2 Amfifilní páry a možnosti stabilizace .....	14
2.4 Polyelektrolyty .....	16
2.4.1 Dextran a hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran .....	17
2.5 Polykationty a záporné vezikulárními systémy složené z IPA .....	18
2.6 Dynamický rozptyl světla .....	19
2.7 Zeta potenciál .....	21
2.8 Fluorescenční spektroskopie .....	22
2.8.1 Fluorescenční spektrum .....	23
2.8.2 Anizotropie fluorescence .....	24
2.8.3 Fluorofory .....	24
<b>3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>27</b>
3.1 Záporně nabitě vezikuly .....	27
3.2 Interakce polykationtů s vezikulárními systémy .....	28
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
4.1 Chemikálie .....	30
4.2 Příprava vzorků .....	31
4.2.1 Amfifilní páry .....	32
4.2.2 Katanionické vezikulární systémy .....	32
4.2.3 Interakce záporně nabitého katanionického vezikulárního systému s polykationtem	
33	
4.2.4 Sondy .....	33
4.3 Měření a zpracování výsledků .....	33
4.3.1 Velikost částic a zeta potenciál .....	33
4.3.2 Generalizovaná polarizace .....	34
4.3.3 Anizotropie .....	34
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>36</b>
5.1 Katanionický vezikulární systém CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu .....	36

5.1.1 Katanionické vezikulární systémy CTA-DS s přídavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové .....	36
5.2 Interakce záporně nabitého katanionického vezikulárního systému s DEAE-Dx·HCl 38	
5.2.1 Záporně nabité katanionické systémy s přídavkem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl....	38
5.2.2 Záporně nabité katanionické systémy s přídavkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl.....	39
5.3 Měření generalizované polarizace.....	41
5.4 Měření anizotropie .....	44
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>48</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>54</b>
8.1 Seznam zkratek .....	54
8.2 Seznam symbolů .....	55
<b>9 PŘÍLOHY .....</b>	<b>56</b>
9.1 Distribuce velikosti částic .....	56
9.2 Závislosti generalizované polarizace na teplotě.....	57
9.3 Závislost anizotropie na teplotě.....	58

# 1 ÚVOD

Slibnou budoucnosti pro medicínu představují nanotechnologie, konkrétně nosiče léčiv. V dnešní době se spousta výzkumů zabývá zlepšením možnosti dopravy léčiv do těla. Výhod nosičových systémů je spousta, především jde o cílení léčiva do požadované oblasti a možnost delší doby uvolňování, což je výhodné pro pacienty, kteří musejí brát léky pravidelně v krátkých časových intervalech. Čím dál tím více se do popředí dostávají vezikulární systémy, které jsou připraveny z relativně levných i dostupných povrchově aktivních látek na rozdíl od liposomů.

Fakulta chemická je zapojena do mezinárodního projektu GAČR (14-14024J), který probíhá ve spolupráci s Cheng Kung University na Taiwanu. Jejich studie se zabývá především kladně nabitými vezikulárními systémy. Právě tato bakalářská práce spadá pod výše zmíněný výzkum mezi fakultou a taiwanskou univerzitou.

Cílem práce je příprava a studium záporně nabitých katanionických vezikulárních systémů s polykationem. K získání fyzikálně-chemických informací o systémech jsou zvoleny tři různé metody – dynamický rozptyl světla, elektroforetický rozptyl světla a fluorescenční spektroskopie (generalizovaná polarizace a anizotropie). Díky těmto metodám můžeme získat cenné informace jako je velikost, náboj, stabilita vezikul a fluidita membrán. Zároveň je věnována pozornost vlivu různých koncentrací přidávaných látek na vlastnosti systémů.

Katanionické vezikulární systémy byly připraveny právě z levných látek, kterými jsou cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a dodecylsírán sodný (SDS). Na stabilizaci systémů byla použita kyselina fosfatidová (PA), která dodává záporný náboj. Další stabilizační prvek byl cholesterol, který svou přítomností v membránách ovlivní jejich fluiditu. Díky zápornému náboji vezikul můžeme ovlivnit jejich vlastnosti navázáním polykationtu hydrochloridu diethylaminoethyl-dextranu (DEAE-Dx·HCl).

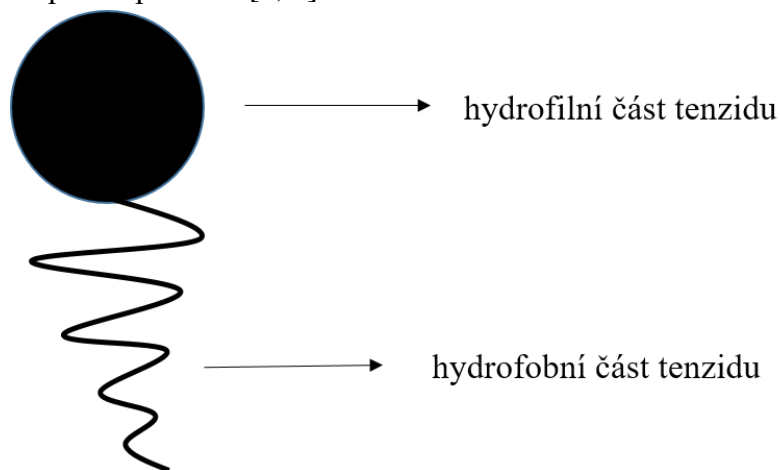
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tenzidy a tvorba micel

Tenzid je povrchově aktivní látka, která snižuje mezifázovou energii soustavy na fázovém rozhraní. Tenzidy se hromadí na fázovém rozhraní už při nízkých koncentracích a skládají se z polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní) části, jsou tedy amfifilní, což je znázorněno na *obr. 1*. Podle schopnosti hydrofilní skupiny podléhat elektrolytické disociaci se dělí na ionogenní a neionogenní. Ionogenní tenzidy se ještě dále dělí na:

- Amfoterní tenzidy, které obsahují v polární části molekuly kladný i záporný náboj.
- Kationaktivní tenzidy (kladný náboj) disociují ve vodném prostředí na kationty a mohou se adsorbovat na záporně nabitý pevný povrch.
- Anionaktivní tenzidy (záporný náboj) nejsou v kyselém prostředí příliš stálé [1].

Postupným zvyšováním koncentrace dochází k agregaci tenzidů a vzniká koloidní roztok. Při dosažení určité koncentrace se začnou vytvářet polymolekulární útvary (koloidní disperzní částice) zvané micely. Koncentrace, při které začínají vznikat micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Když nastane kritická micelární koncentrace, změní se chemické a fyzikální vlastnosti roztoku s povrchově aktivní látkou. Konkrétně se mění viskozita, hustota, osmotický tlak a již zmíněné povrchové napětí [2]. Kritická micelární koncentrace je také ovlivněna různými vlivy – teplotou, vlastnostmi hydrofilní skupiny, délkou a strukturou uhlovodíkového řetězce. Uhlovodíkový řetězec ovlivní kritickou micelární koncentraci zejména svou délkou, čím je řetězec delší, tím je CMC nižší a jsou menší odpudivé síly hydrofilních skupin na povrchu [3, 4].



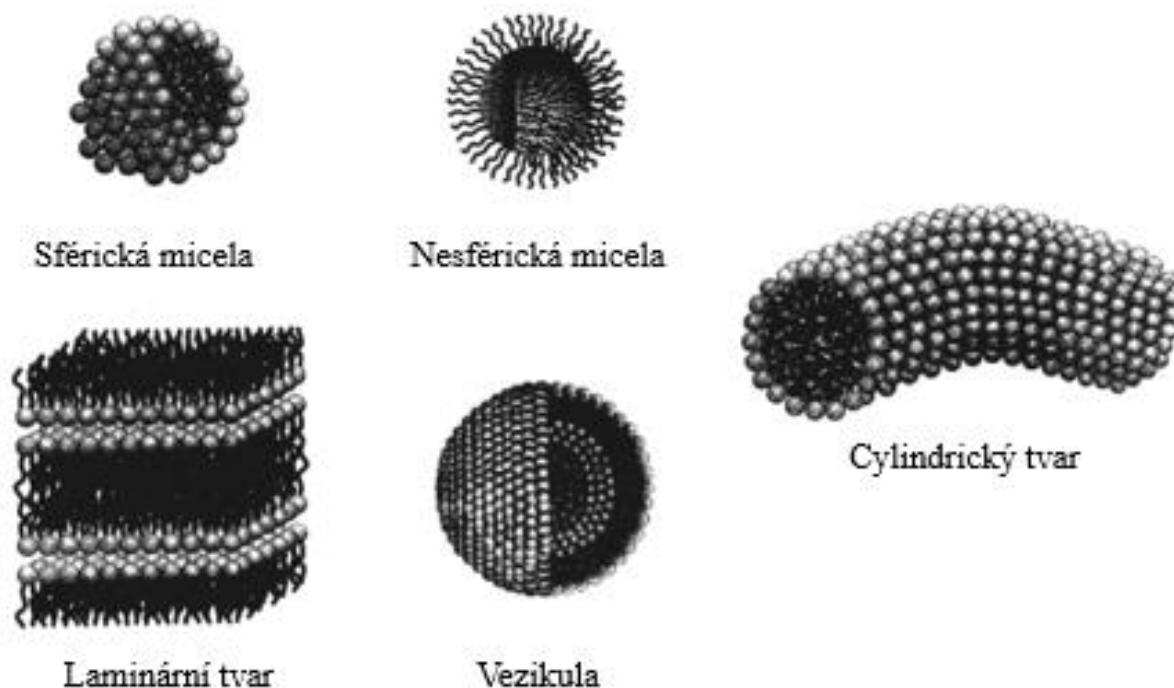
*Obr. 1: Schéma tenzidu*

Micely jsou kulovité koloidní nanočástice spontánně tvořené ve vodném prostředí z mnoha amfifilních molekul. Vlastnosti micely jako je tvar, struktura a průměr závisí na fyzikálních podmínkách a vlastnostech systému. Pokud micela vznikne v polárním prostředí, tak jsou jednotlivé tenzidy poskládány hydrofobní částí směrem do středu a hydrofilní skupiny se nachází na vnější straně micely, tvoří tedy její obal. Když micela vznikne v nepolárním prostředí, je uspořádána opačně. Polární skupiny jsou směřovány do středu a nepolární řetězce směřují ven do prostředí, takto opačně orientované micely se nazývají reverzní [3].

Micely se ještě dělí na sférické a nesférické. Sférické micely mají kulatý tvar a poloměr micely je zhruba stejný jako délka tenzidu (povrchově aktivní látky), pokud se zvýší



koncentrace povrchově aktivních látek v roztoku, tak bude uspořádání micel rovnoběžné. Jednoduše řečeno, pokud se zvyšuje koncentrace povrchově aktivních látek, nevznikají kulovité micely, ale micely rovnoběžné. Při ještě větší koncentraci vznikne laminární micela, kterou tvoří dvě vrstvy povrchově aktivních látek, nepolární řetězce směřují k sobě a polární skupiny směřují ven. Laminární micely se řadí k n esférickým micelám. Nesférické micely mohou být cylindrické, válcovité a již zmíněné laminární. Některé ze zmíněných tvarů jsou zobrazeny na obr. 2. Z hydrofobních řetězců mohou vznikat dvojitě vrstvené membrány a vezikuly [2, 3, 5].



Obr. 2: Ukázka micel a možných dalších tvarů [4]

Kritický sbalovací parametr je veličina, která souvisí s tím, jaké systémy budou agregací vznikat, vypočítá se podle vzorce:

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

kde  $a_0$  je plocha hydrofilní skupiny,  $v$  je objem a  $l_c$  je délka hydrofobního řetězce. Rozhodující je jeho velikost. Pokud je kritický sbalovací parametr menší než 0,33, vznikají micely, pokud bude velikost kritického sbalovacího parametru mezi 0,33 a 0,5, vznikají tvary válcovité nebo diskovité, pokud je velikost  $v$  v rozmezí 0,5 a 1 vznikají vezikuly. Při velikosti kritického sbalovacího parametru 1 se tvoří dvojitě vrstvené membrány. Když je kritický sbalovací parametr větší než 1, tak vznikají obrácené micely [6].

### 2.1.1 Dodecylsulfát sodný

Jako jeden z nejčastěji využívaných anionaktivních tenzidů je dodecylsulfát sodný (SDS). Dodecylsulfát sodný je organická sodná sůl [7]. Má roli jako detergent a denaturační protein. Jiný název je laurylsulfát sodný (SLS) [8].

Dodecylsulfát sodný obsahuje uhlíkový řetězec, který se skládá z 12 uhlíků, a tento řetězec je napojen na záporně nabitou sulfátovou skupinu. SDS je bílá až světle žlutá látka a může

se vyskytovat ve formě pasty, krystalů, vloček a prášku nebo jako kapalina, má mírný zápach. Jedná se o látku s nízkou toxicitou, ale hořlavou [7, 9].

SDS se často využívá u SDS-PAGE elektroforéze v polyakrylamidovém gelu, dále se využívá v řadě čisticích prostředků například prací prostředky a bytové chemie, jako jsou prací prášky, čističe pro domácnosti i průmysl, WC tablety, pasty na ruce, pěny na holení a podobně [8].

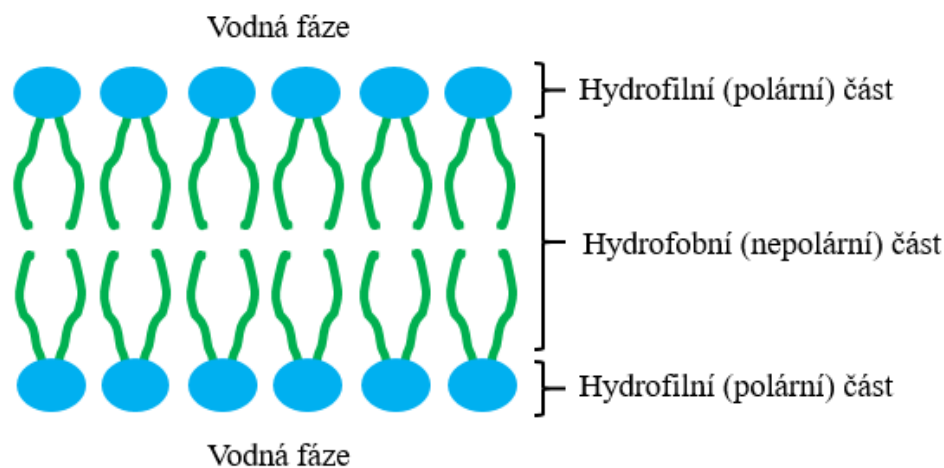
### 2.1.2 Cetyltrimethylamonium bromid

Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) se také nazývá hexadecyltrimethylamonium bromid (HTMAB) nebo cetrimoniumbromid. Jedná se o kvartérní amoniovou sůl a organickou bromidovou sůl. Řetězec je sestaven z 16 uhlíků a kladně nabitého dusíku se třemi methylovými skupinami. CTAB je zástupce kationaktivních tenzidů.

Sloučenina obsahuje cetyltrimethylamoniový ion, který má antiseptické účinky vůči houbám a bakteriím. CTAB je bílá pevná látka a využívá se například v čisticích prostředcích, v kosmetice nebo při izolaci DNA [9, 10].

## 2.2 Vezikuly

V kapitole 2.1 už bylo zmíněno, že na základě velikosti kritického sbalovacího parametru vznikají agregací různé systémy včetně vezikul. Vezikuly se obecně skládají z amfifilních částic a mohou tvořit buď jednu, nebo více vrstev. Amfifilní dvojvrstva je schématicky znázorněna na obr. 3. Jednotlivé molekuly jsou poskládány tak, že hydrofilní skupiny jsou z vnější a vnitřní strany vezikuly. Hydrofobní řetězce jsou směřovány do vnitřku dvojvrstvy [11].

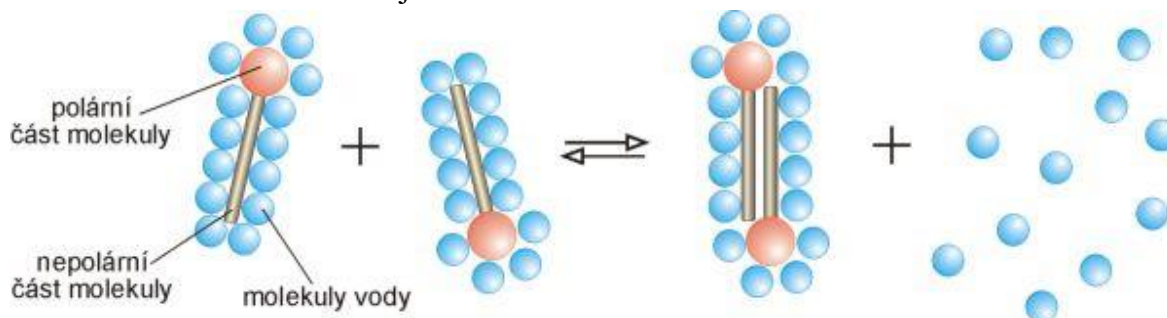


Obr. 3: Amfifilní dvojvrstva

Vezikuly se běžně připravují i v laboratořích. Jsou tvořené z lipidů, pokud se konkrétně jedná o fosfolipidy, tak se nazývají liposomy. Vytvořené liposomy jsou biokompatibilní, protože se skládají především z fosfolipidů a cholesterolu, který se v těle běžně vyskytuje [12].

Důležitý děj pro tvorbu vezikul i micel se nazývá hydrofobní interakce. Hydrofobní interakce působí vždy ve vodném prostředí a jsou důležité pro stabilizaci biomakromolekul a biomakromolekulárních celků, jako jsou například i již zmíněné fosfolipidové dvojvrstvy. Fosfolipidy se skládají z hydrofilní skupiny, ta je polární, ve vodě rozpustná, a dvou hydrofobních řetězců, které jsou nepolární, a tedy ve vodě nerozpustné [5]. Pokud má látka

hydrofobní i hydrofilní část, stane se ve vodě to, že nepolární část molekuly se snaží co nejvíce zmenšit kontakt s vodným prostředím, a to tak, že začínají agregovat [13]. Shlukování částic a tím zmenšení kontaktu s vodou je znázorněno na *obr. 4*.



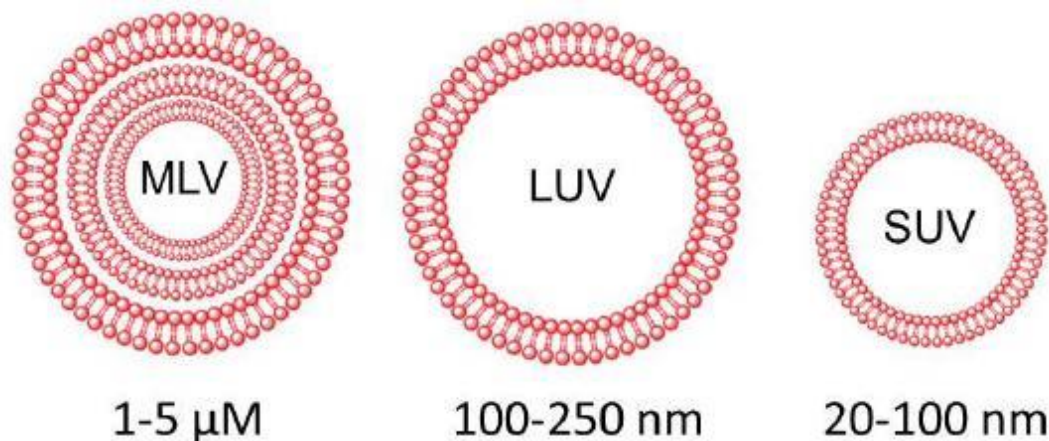
*Obr. 4: Schématické znázornění hydrofobní interakce [13]*

Pokud vezikulu tvoří pouze jedna vrstva, nazýváme je unilamelární, zatímco pokud se vezikuly skládají z více dvojvrstev, nazývají se multilamelární. Velikost vezikul závisí především na množství vrstev, z kterých je sestavena. Velikost vezikul se většinou pohybuje v rozmezí nanometrů, protože jedna lipidová dvojvrstva má 3-6 nm, některé vezikuly mohou být menší (řády mikrometrů) [11].

Vezikuly se využívají v organismu k přepravě materiálu z jednoho místa na druhé například na inkorporaci enzymů. Mohou obsahovat kapaliny nebo plyny [14]. V současné době se vezikuly hojně využívají k transportu léčiv, jejichž umístění závisí na fyzikálně-chemické povaze léčiva. Mohou se vyskytovat buď přímo v jádře, které je obklopeno hydrofilními skupinami, nebo v hydrofobní dvojvrstvě, popřípadě i na povrchu vezikuly [3]. Využívání vezikul jako nosiče léčiv má výhody, sníží se tím toxicita a léčivo je chráněno před hydrolýzou i oxidací [12, 15].

### 2.2.1 Druhy vezikul

Nejčastější dělení vezikul je podle velikosti a lamelarity. Základní typy vezikul jsou malé unilamelární vezikuly (SUV – small unilamellar vesicles), velké unilamelární vezikuly (LUV – large unilamellar vesicles), velké oligolamelární vezikuly (OLV – oligolamellar large vesicles), velké multilamelární vezikuly (MLV – multilamellar large vesicles) a multivezikulární vezikuly (MVV – multivesicular vesicles). Porovnání velikostí některých typů vezikul pro představu je na *obr. 5*.

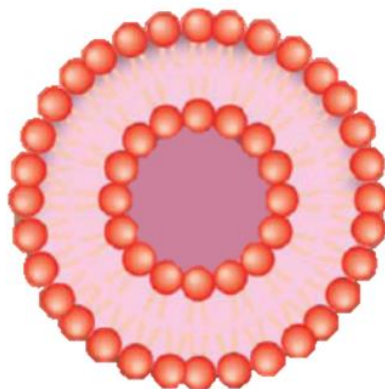


*Obr. 5: Porovnání různých typů vezikul [16]*

### **Malé unilamelární vezikuly (SUV – small unilamellar vesicles)**

Vezikuly jsou tvořené jednou lipidovou dvojrůstvou a průměr se pohybuje mezi 20 až 100 nm, ukázka vezikuly je zobrazena na obr. 6.

Jejich membrána je hodně zakřivená a z toho důvodu mají tyto vezikuly vysoké membránové napětí. Nejmenší vezikuly mají velikost okolo 23 nm. Výhodou těchto malých vezikul je v tom, že dokážou unikat z cévního řečiště extravaskulárně přes endotel kapilár do okolních tkání. Stabilita malých vezikul není velká kvůli deformaci membrán, zvýšené permeabilitě membrány pro hydrofilní molekuly a náchylnosti k interakcím s většími molekulami.



*Obr. 6: Ukázka vezikuly (SUV) [17]*

### **Velké unilamelární vezikuly (LUV - large unilamellar vesicles)**

Velké unilamelární vezikuly mají průměr kolem 100 až 250 nm, nízké membránové napětí a větší stabilitu. Tyto vezikuly jsou vhodné jako nosiče pro hydrofilní léčiva, obsahují totiž velké množství vody, mohou být využívány jako modely přirozených biologických membrán.

### **Velké oligolamelární vezikuly (OLV - oligolamellar large vesicles)**

Oligolamelární vezikuly mají několik vrstev membrán a díky těmto vrstvám se léčiva uvolňují pomaleji, mohou se tak podávat ve vyšších dávkách. Tyto vezikuly vznikají jako vedlejší produkt při přípravě velkých unilamelárních vezikul.

### **Velké multilamelární vezikuly (MLV - multilamellar large vesicles)**

Velikost velkých multilamelárních vezikul se pohybuje kolem 1 000 až 5 000 nm. Mají mnoho lipidových dvovrstev a enkapsulovaná hydrofilní léčiva se tak uvolňují velmi pomalu, musejí projít přes všechny vrstvy lipidových dvovrstev.

### **Multivezikulární vezikuly (MVV - multivesicular vesicles)**

Tento typ molekul vzniká jako vedlejší produkt při výrobě hlavně velkých multilamelárních vezikul. Multivezikulární vezikula je velká vezikula, které má v sobě enkapsulované další menší vezikul [17].

## **2.2.2 Příprava vezikul**

Současně existuje několik metod, kterými se dají vezikuly připravit. Typ metody přípravy ovlivňuje vlastnosti vezikul, včetně jejich tvaru, velikosti, stability a účinnosti inkorporace léčiva [18]. Mezi nejčastější metody se řadí hydratace lipidového filmu, metoda založená na odstranění detergentu, proliposom – liposomální metoda, reverzní fázová evaporizace, ethanolová nebo éterová injekce.

U metody hydratace lipidového filmu je lipidový film tvořen z více lipidových vrstev, ty důsledkem hydratace začínají bobtnat a nakonec vznikají multilamelární vezikuly. Nejprve je potřeba rozpustit lipidy ve vhodném organickém rozpouštědle. Jako organické rozpouštědlo se často využívá chloroform nebo směs chloroformu a methanolu. Koncentrace lipidů je typicky v rozmezí 10–20 mg/ml při volbě vhodné koncentrace záleží i na rozpustnosti lipidů. Po rozpuštění lipidů se rozpouštědlo odpaří na rotační odparce a vznikne tenký lipidový film. Takto vytvořený film se suší tak dlouho, jak je potřeba, a následně se hydratuje. Hydratace suchého lipidového filmu se provádí přidáním vodného roztoku (například destilovaná voda, tlumivý roztok, fyziologický roztok nebo neelektrolyty). Po dokončení hydratace se vytvoří multilamelární vezikuly (MLV), jejichž velikost se pohybuje kolem 200 až 1 000 nm. Tyto MLV se rozdělují na menší vezikuly sonifikací nebo extruzí [16].

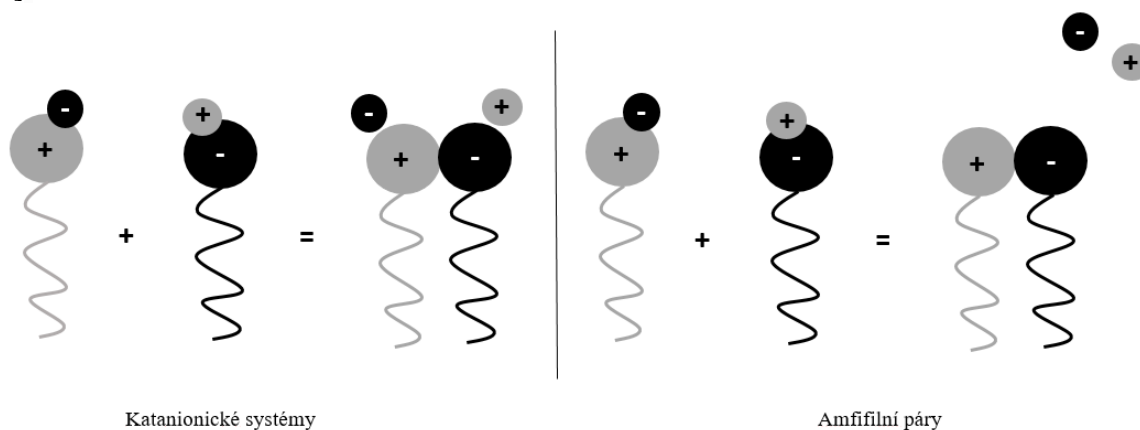
Sonifikace je jedna z nejrozšířenějších metod pro přípravu SUV. Při této metodě dochází ke vzniku SUV z MLV o velikosti kolem 20–100 nm. Existují dvě techniky, a to sonifikační sondy nebo sonifikační vodní lázně.

Sonifikace sondou probíhá takovým způsobem, že špička sonifikátoru je ponořena do vezikulové disperze, tím se do roztoku uvolní energie, vzniká teplo a vzorek se zahřívá, částice se rozkmitají, dojde k mechanickému poškození částic a vznikají menší částice (SUV). Nádoba se vzorkem může být kvůli teplotě umístěna v ledové vodní lázni. Tato metoda má dvě nevýhody, dochází k přehřívání vzorku a sonifikační sonda může uvolňovat částice titanu, které vzorek kontaminují.

Sonifikace ve vodní lázni je používanější metoda sonifikace. Probíhá tak, že zkumavka obsahující suspenzi se vloží do vodní lázně. Konečná velikost vezikul závisí nejen na době a energii ultrazvuku, ale také na mnoha faktorech, včetně složení lipidů, koncentrace a objemu suspenze. Vzniklé částice nejsou moc stabilní a rády tvoří větší vezikuly [16, 19, 20].

### 2.3 Směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek

Vezikuly díky svým vhodným vlastnostem v oblasti dodávání léčiv se staly poměrně populární tematikou vědeckých studií. Vezikuly se široce používají jako nosiče léků nebo DNA. Nevýhodou použití vezikul (převážně liposomů) je jejich finanční náročnost. Jako vhodnou alternativou jsou směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek. Směsi opačně nabitých povrchově nabitých látek se dělí na dvě skupiny: katanionické systémy (obsahují protiionty) a amfifilní páry (neobsahují protiionty), rozdíl mezi těmito skupinami je znázorněn na *obr. 7* [21].

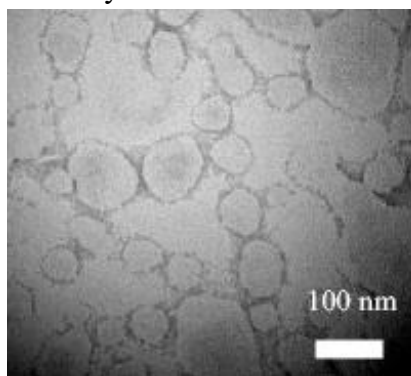


Obr. 7: Katanionické systémy a amfifilní páry

### 2.3.1 Katanionické směsi

Katanionické vezikuly jsou připravené z levných opačně nabitých povrchově aktivních látek, ty se díky opačnému náboji přitahují a vznikají stabilní katanionické agregáty (vezikuly, micely, sraženiny,...), které obsahují protiionty. Katanionické systémy se tedy dají považovat za vhodné náhrady liposomů. Velikost, náboj a propustnost katanionické vezikuly mohou být dále upraveny změnou teploty, koncentrace, molárního poměru a délkou řetězce kationtových a aniontových povrchově aktivních látek. Katanionické vezikuly mohou účinně zapouzdřit a udržet molekuly látek po dlouhou dobu, z toho důvodu jsou vhodné jako nosiče léků, které se budou v těle uvolňovat po delší dobu [22].

Tvar katanionických systémů závisí na velikosti parametru kritického balení  $P_c$ , který určuje druh agregátů a byl vysvětlen v kapitole 2.1. Sražení povrchově aktivních látek opačného náboje nastává, když jsou náboje ve stejném poměru. Pokud je záporná nebo kladná povrchově aktivní látka v přebytku, vznikají různě nabitě asociáty [22]. Při určitých poměrech opačně nabitých tenzidů mohou vznikat vezikuly zobrazené na obr. 8.



Obr. 8: Ukázka vzhledu katanionických vezikul (transmisní elektronový mikroskop) [23]

Hustota povrchového náboje katanionických vezikul může být upravována molárním poměrem kationtových a aniontových povrchově aktivních látek. Katanionické vezikuly mohou tedy interagovat s nabitými biopolymery, jako jsou proteiny, RNA, DNA nebo syntetické polyelektrolyty skrz elektrostatické interakce. Jedná se o možnost, jak vytvořit biokompatibilní katanionické vezikuly, které mají sníženou cytotoxicitu (schopnost ničit buňky) a zvýšenou transfekci (buňky schopné přijmout DNA) [22, 24].

Vezikuly mají hydrofilní i hydrofobní oblasti, dokážou tak enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látky, a proto jsou vhodné jako nosiče léčiv, která se mohou v těle delší dobu uvolňovat (řízené uvolňování léčiv) [21].

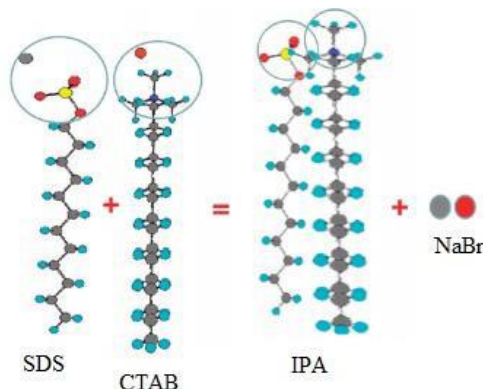
V praxi se katanionické vezikuly mohou využívat u interakcí se záporně nabitými molekulami DNA, vznikne komplex, který je schopen dostat se do buňky endocytózou. Problémem je to, že vezikuly tvoří agregáty a z toho důvodu se sníží účinnost transfekce vzniklých komplexů [23].

### 2.3.2 Amfifilní páry a možnosti stabilizace

Amfifilní páry jsou nejčastěji známy pod původním anglickým názvem ion pair amphiphiles (IPAs). IPA na rozdíl od katanionických systémů neobsahuje protiionty, které jsou odstraňovány například filtrací. Ukázka amfifilního páru je zobrazena na obr. 9. IPA obecně vzniká spárováním dvou jednořetězových opačně nabitých povrchově aktivních látek ve stejném molárním poměru [21].



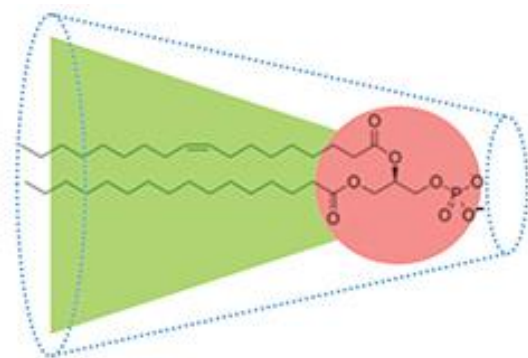
Katanionické vezikuly připravené z IPA ve vodné fázi obvykle vykazují špatnou fyzikální stabilitu. To znamená, že katanionické vezikuly snadno agregují a nemohou si dlouhodobě udržet svou velikost. Bylo zjištěno, že stabilitu ovlivňuje přidavek alkoholu nebo změna koncentrace rozpouštědla [6]. Zvýšení fyzikální stability vezikul může být dosaženo úpravou vnějších vezikulárních nebo vnitřních vezikulárních interakcí [21].



Obr. 9: Tvorba IPA z SDS a CTAB [25]

Inter-vezikulární odpuzování lze dosáhnout zavedením dalšího nabitého dvouřetězcového amfifilu například kyseliny fosfatidové, čímž se navýší elektrostatické odpuzování a zlepší se celková koloidní stabilita [26].

Kyselina fosfatidová (PA) je nejjednodušší fosfolipid, který představuje původní stavební jednotku, ze které je syntetizována většina glycerofosfolipidů. Kyselina fosfatidová má glycerovou páteř, dva acylové řetězce a malou fosfátovou hlavu, tvoří tak tvar kužele. Struktura je zobrazena na obr. 10. Ukázalo se, že má vliv na intracelulární signální dráhy a buněčné funkce [27].



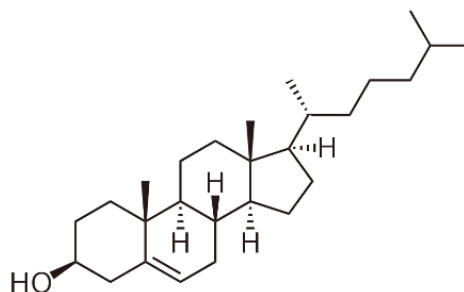
Obr. 10: Struktura kyseliny fosfatidové [28]

Přidáním kyseliny fosfatidové do dvojvrstvy katanionických vezikulárních systémů se zvyšuje celkový záporný náboj a svým tvarem podporuje negativní (konkávní) zakřivení membrány [29].

Intra-vezikulární modifikace lze dosáhnout zavedením stabilizačních látek jako například cholesterol, který se tak stává důležitou složkou při zvyšování stability, protože dokáže regulovat tuhost a tekutost membrány [26].

Cholesterol je látka řadící se ke steroidům a má lipidovou povahu, jeho struktura je zobrazena na obr. 11. Běžně se vyskytuje v těle, tělo ho může dokonce samo vyrobit, ale také

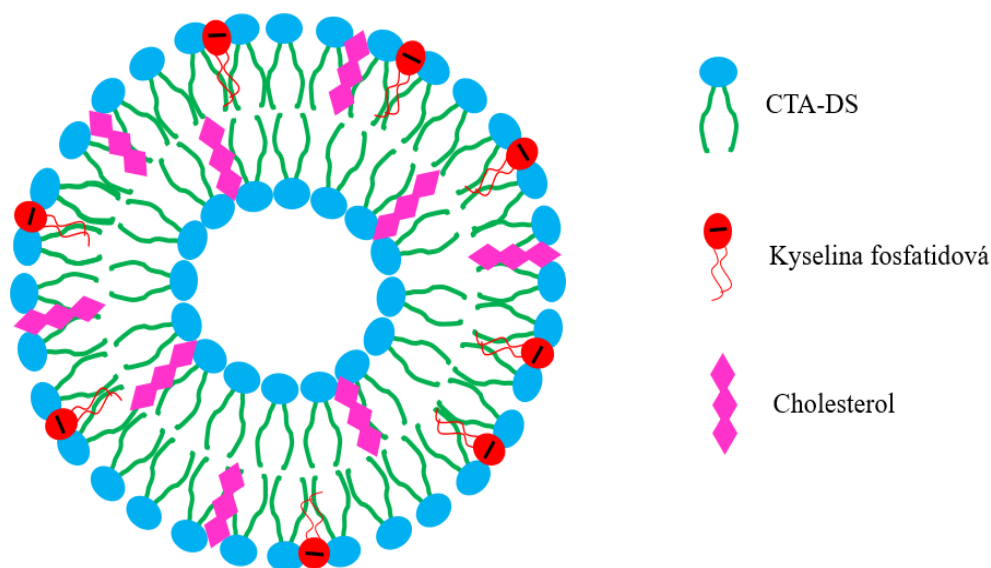
je přijímán v potravě (maso, mléčné výrobky). V potravě rostlinného původu se cholesterol nevyskytuje. Nejčastější výskyt je ve všech živočišných tkáních, v krvi, ve žluči a má emulgační vlastnosti. Z cholesterolu vznikají v těle steroidní hormony a žlučové kyseliny, jedná se také o důležitou součást buněčných membrán [30].



Obr. 11: Struktura cholesterolu [31]

Přidání cholesterolu do katanionických vezikulárních systémů se zvyšuje vzdálenost mezi nabitými hlavními skupinami a tím se snižuje schopnost přitahování protiiontů [32]. Vezikula stabilizovaná cholesterolem a kyselinou fosfatidovou je zobrazena na obr. 12.

Pokud jde o interakci mezi vezikuly, přidáním další iontové povrchové aktivní látky se zvýší elektrostatické odpuzování mezi vezikuly, nedojde tedy k agregaci a vezikuly jsou stabilní delší dobu [21].



Obr. 12: Vezikula s cholesterolem a kyselinou fosfatidovou

## 2.4 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou nabitě polymery, které obsahují ionizovatelné skupiny. Jinými slovy se dá říct, že polyelektrolyty jsou vysokomolekulární elektrolyty [11]. Jejich chování je částečně jako polymer a částečně jako elektrolyt, díky tomu mají mnoho užitečných vlastností. Mezi tyto vlastnosti patří schopnost změny tekutosti vodných roztoků či suspenzí (často využívané v potravinářství – alginát) a interakce s neutrálními i malými nabitými částicemi (využívané u změkčování vody). Polyelektrolyty dále mohou interagovat s opačně nabitými makromolekulami, čehož se využívá například u selektivně propustných membrán [33].



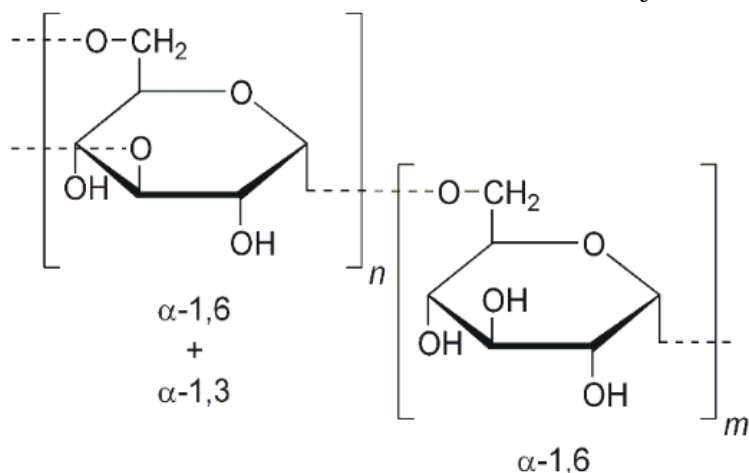
Polyelektrolyty mohou mít biologický i syntetický původ a rozdělují se podle nesoucího náboje na kationtové, aniontové a amfolytické (amfoterní, proteiny). Kationtové polyelektrolyty se jinak nazývají polykationty (například chitosan, hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran) a obsahují kovalentně vázané kationtové skupiny, stejně tak se nazývají aniontové polyelektrolyty neboli polyanionty (například hyaluronan sodný, chondroitin sulfát) [11, 34].

V polárních rozpouštědlech mají kationtové a aniontové polyelektrolyty schopnost disociace a vzniká makroiont (makrokationt, makroaniont), současně vzniká protiiont, který představuje disociovaný iont. Protiionty jsou většinou nízkomolekulární látky, které udržují elektroneutralitu systému. Mezi makroionty a protiionty působí elektrostatické síly a díky nim jsou protiionty v blízkosti polymerního řetězce. Celkové vlastnosti polyelektrolytů závisí na více faktorech, například na koncentraci polyelektrolytu, uspořádání ionizovaných skupin podél řetězce, náboji na řetězci, na přítomnosti jiné látky, nebo záleží na tom, jak moc je kvalitní rozpouštědlo pro polymerní kostru. Vliv na vlastnosti polyelektrolytu mají i protiionty, ty rozhodují o tom, jestli je makromolekula rozpustná nebo není [35, 36].

Amfolytické polyelektrolyty obsahují kationtové i aniontové skupiny a nazývají se polyamfolyty. V polyamfolytech jsou silné elektrostatické interakce, a proto jsou roztoky hodně citlivé na pH, disociují na makroionty a ty se nazývají makroamfionty [11]. Při vysokém pH disociují pouze kyselé skupiny, disociaci nepodléhají zásadité skupiny a celkový náboj je záporný. Při nízké hodnotě pH disociují zásadité skupiny a celkový náboj je tedy kladný. Pokud je pH na střední hodnotě disociují částečně kladně i záporně nabitě skupiny a tím jsou kladné i záporné náboje vyrovnány, makromolekula nevykazuje žádný náboj a tato hodnota pH se nazývá izoelektrický bod. Přírodní polyamfolyty jsou například proteiny [37].

#### 2.4.1 Dextran a hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran

Dextran je přírodní, biokompatibilní obnovitelný polysacharid, který se získává především z mikroorganismů nebo kondenzací glukózy [38, 39]. Hlavní řetězec se skládá z glukózových monomerů, které jsou spojené převážně  $\alpha$ -(1→6) glykosidickou vazbou. Kromě glykosidické vazby  $\alpha$ -(1→6) se vyskytuje v důsledku větvení i  $\alpha$ -(1→2),  $\alpha$ -(1→3) a  $\alpha$ -(1→4) [40]. Postranní dextranové řetězce mohou mít různou délku [38]. Struktura dextranu je zobrazena na *obr. 13*.



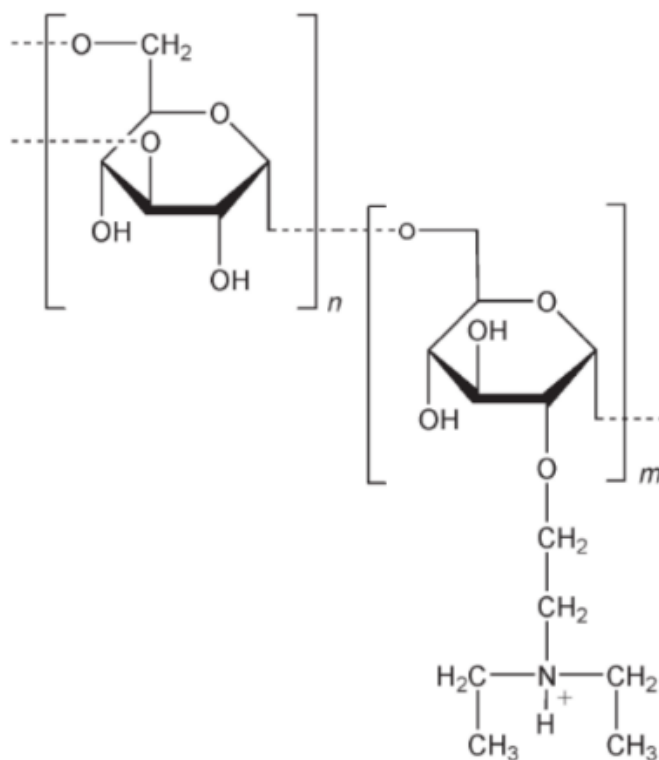
Obr. 13: Struktura dextranu [38]

Využití dextranu je možné v řadě průmyslových a lékařských aplikací. Časté využití je jako náhražka krevní plazmy, antitrombotikum ke snížení viskozity krve nebo jako lubrikant

v některých očních kapkách [38, 40]. V budoucnu by mohl být dextran široce využíván v podobě nanonosičů, hydrogelů a micel pro cílené dodávání léčiv [39].

Dextran byl objeven už dávno v minulosti, kdy způsoboval komplikace při výrobě sladkostí, konkrétně při rafinaci cukru, protože zvyšuje viskozitu roztoků sacharózy a tím zanášel různá potrubí a filtry. V dnešní době se dextran vyrábí ze sacharózy kvašením bakterií z čeledi *Lactobacillus*, výsledná struktura produkovaného dextranu závisí na určitém druhu bakterie. Po vytvoření se osamostatňuje vysrážením pomocí přídatku ethanolu. Vysrážený dextran lze dále čistit rozpuštěním ve vodě a opakovaným srážením ethanolem [38, 40].

Hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dx·HCl) se připravuje reakcí 2-chlor-N,N-diethylaminoethanem s dextranem. Jedná se o polykationt, má tedy kladný náboj a velké lékařské i farmaceutické využití [41]. Využívá se v systémech s prodlouženým uvolňováním proteinů, ve vakcínách jako zesilovač imunitní reakce na podaný antigen, v systémech pro transfekci nukleových kyselin nebo jako stabilizátor proteinů [42]. Struktura hydrochloridu diethylaminoethyl-dextranu je zobrazena na obr. 14.



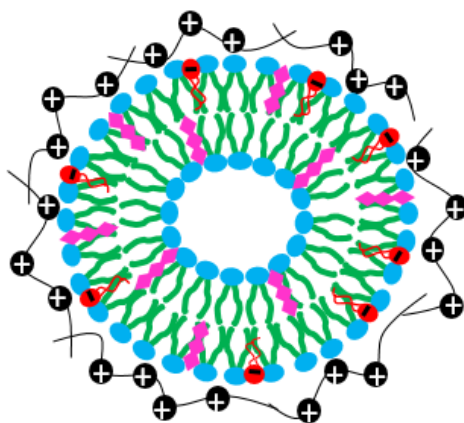
Obr. 14: Struktura hydrochloridu diethylaminoethyl-dextranu [43]

## 2.5 Polykationty a záporné vezikulárními systémy složené z IPA

Vezikuly se mohou silně asociovat s polymery v roztoku pomocí hydrofobních nebo elektrostatických interakcí. Systémy s polymery mohou mít různé tvary, což závisí na vlastnostech polymeru. Tvary mohou být například globulární vezikuly, fazetové vezikuly, může docházet i k otevření dvojvrstev, to vede k děrovitým vezikulám. Může vzniknout situace, kdy budou vezikuly narušeny natolik, až vzniknou rovinné dvojvrstvé agregáty podobné tvaru disku [44].

Pokud je vezikulární systém složený z iontových amfifilních párů (IPA) a celkový náboj systému je záporný, to se dá ovlivnit přidáním například kyseliny fosfatidové, snadno může

docházet k interakci s polykationty, protože zde působí elektrostatické a hydrofobní interakce, což závisí na velikosti náboje. Výsledný systém, který vznikne spojením záporně nabitého vezikulárního systému s polykationty, je zobrazen na *obr. 15* a závisí na několika faktorech: velikosti a koncentraci vezikul, flexibilitě polyelektrolytu, jeho hustotě náboje a iontové síle. Takovéto vzniklé systémy jsou stabilní, vhodné pro modely biomembrán a jako systémy dodávání léků [45].



*Obr. 15: Systém složený z IPA s navázaným polykationtem*

## 2.6 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), známý také jako fotonová korelační spektroskopie (PCS), se používá k určení velikosti a distribuce částic (koloidní částice, makromolekuly) na základě jejich pohybu v roztoku. Zeta potenciál (vysvětlen v kapitole 2.7) souvisí s povrchovým nábojem částice. Obě zmíněné metody mají široké spektrum využití [46].

Rozptyl světla částicemi nastává ve chvíli, kdy na roztok, který obsahuje částice, dopadá paprsek laseru a světlo se rozptýlí do všech směrů. Částice se v roztoku neustále pohybují kvůli Brownovu pohybu. Brownův pohyb závisí na velikosti částic, teplotě a viskozitě rozpouštědla. Důležitým rysem Brownova pohybu je to, že malé částice se pohybují rychleji než částice velké. V důsledku Brownova pohybu intenzita rozptýleného světla fluktuuje, analýzou fluktuace rozptýleného světla se získá difuzní koeficient, který souvisí s hydrodynamickou velikostí makromolekuly.

Velikost částic ve vzorku se zjišťuje pomocí korelátoru, který porovnává intenzitu rozptýleného světla v krátkých časových intervalech, sleduje rozklad korelace. Korelace se časem snižuje. Velké částice se pohybují pomalu, to vede k podobným pozicím v různých časových bodech, a rozklad korelace je tedy pomalejší než u malých částic, které se pohybují rychle a jejich rozklad je tak rychlejší.

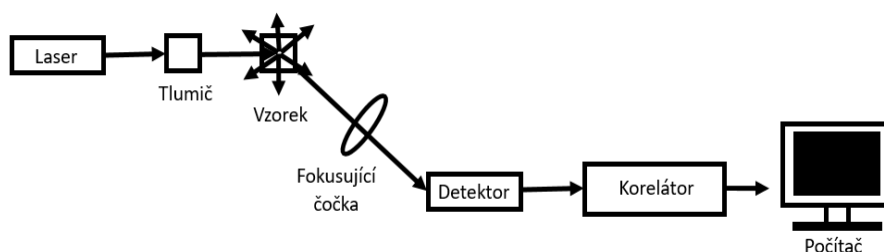
Souvislost mezi velikostí částic a difuzním koeficientem udává Stokes-Einsteinova rovnice. Rovnice se používá ke stanovení hydrodynamického poloměru, který lze definovat jako poloměr hypotetické koule, která difunduje stejnou rychlostí jako zkoumaná částice.

Stokes-Einsteinova rovnice:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h}, \quad (2.2)$$

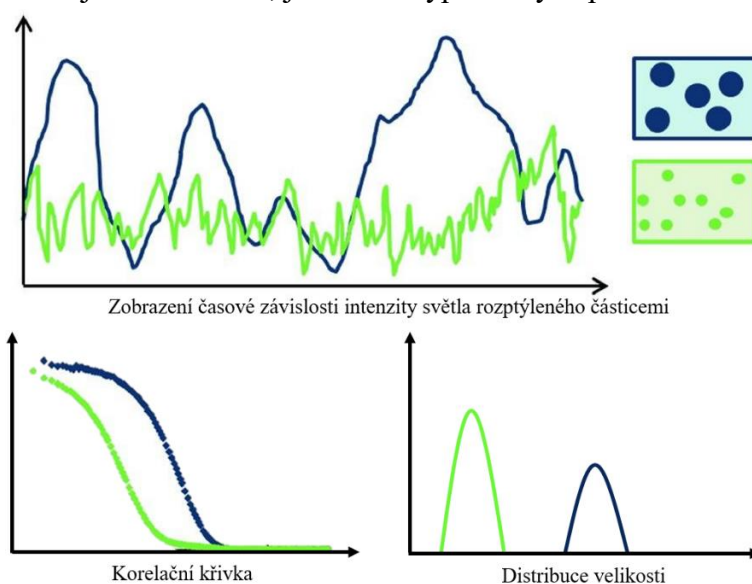
kde  $D$  je translační difuzní konstanta,  $k_B$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je teplota,  $\eta$  je viskozita rozpouštědla a  $r_h$  značí hydrodynamický poloměr [47, 48].

Dynamický rozptyl světla se měří na přístroji, který má tři hlavní části, a to laser, vzorek v kyvetě a detektor světla. Laser používaný při měření může mít různou vlnovou délku, zaleží na výrobci přístroje, nejčastěji to bývá 532 nm, 633 nm, 638 nm, nebo 830 nm. Při měření je vzorek umístěn v kyvetě, pro správné měření by měl být vzorek co nejčistější a homogenní. Detektor je nejčastěji umístěn pod úhlem  $173^\circ$ , a to z toho důvodu, aby byl schopen detekovat i zpětný rozptyl a zachytil i nižší signály z menších částic. Umístěním pod úhlem  $173^\circ$  se zvyšuje plocha osvětleného vzorku, což je výhodné pro přesnější měření. Občas se může detektor vyskytovat i pod úhlem  $90^\circ$ , což bývá většinou u starších zařízení. Na obr. 16 je znázorněna instrumentace pro měření DLS, kde kromě tří hlavních částí je tlumič, který tlumí podle potřeby sílu laseru, před detektorem se nachází zaostřovací čočka pro lepší detekci záření, za detektorem je korelátor, který porovnává intenzitu rozptýleného světla v časových intervalech, informace jsou následně zpracovány a vyhodnoceny systémem Zetasizer v počítači.



Obr. 16: Instrumentace dynamického rozptylu světla

Výstupem z měření dynamického rozptylu světla jsou grafy, které charakterizují částice obsažené v roztoku vzorku. Měření dynamického rozptylu světla a následným vyhodnocením v systému Zetasizer v počítači jsou poskytnuty informace o velikostech jednotlivých částic, o distribuci velikosti částic ve vzorku. Je možné získat i informace o objemu částic nebo jejich počtu. Pomocí dalších softwarů je možné zjištěná data exportovat do jiných programů pro další zpracování. Na obr. 17 je ukázka toho, jak může vypadat výstup z měření DLS [46].



Obr. 17: Výstup z měření DLS [48]

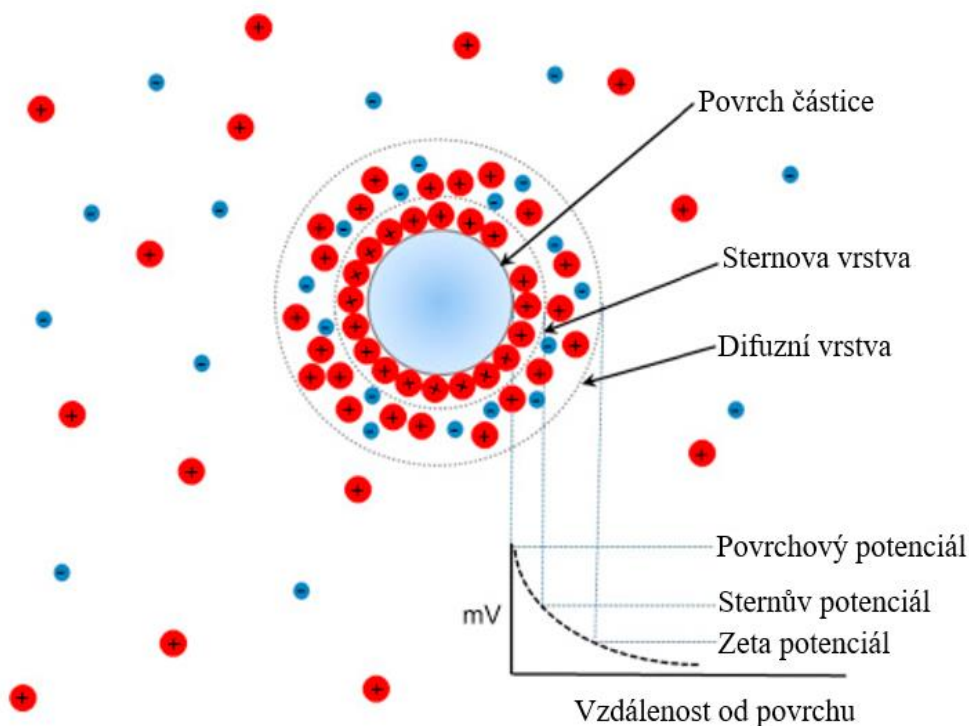
## 2.7 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ZP) neboli elektrokinetický potenciál je potenciál na skluzové rovině koloidní částice, která je nabitá a pohybuje se v elektrickém poli. Nabitě částice jsou obklopeny elektrickou dvojrůstkou (viz obr. 18). Vnitřní vrstva se nazývá Sternova vrstva a skládá se z iontů nabitých opačným nábojem než je samotná částice, takové ionty jsou vlivem nábojů k částici silně přitahovány. Druhá vrstva se nazývá difuzní a ta obsahuje ionty nabitě stejně jako částice, ale nejsou už přitahovány tak silně. V této vrstvě se nachází i ionty se stejným nábojem, jako je náboj částice. Uvnitř difuzní vrstvy je hypotetická rovina, nazývána rovina skluzu, která funguje jako rozhraní, které určuje oblast iontů pohybujících se s částicí, zbývající ionty se pohybují s rozpouštědlem. Potenciál, který vzniká na rovině skluzu, se nazývá již zmíněný zeta potenciál.

Zeta potenciál se měří na stejném přístroji jako DLS a taktéž je vyhodnocován programem Zetasizer v počítači.

Jedním z nejdůležitějších parametrů v měření zeta potenciálu je pH. S kyselým pH je hodnota ZP kladnější a naopak se zásaditým pH je ZP více záporný. Na základě vlivu pH se zeta potenciál může využívat při hledání izoelektrického bodu, kdy má ZP nulovou hodnotu. Další ovlivňující faktor je iontová síla. S vyšší iontovou silou hodnota zeta potenciálu klesá a naopak. Taktéž je nutno zmínit koncentraci částic, vztah mezi koncentrací a ZP je složitý, ale vyplývá z něj, že zeta potenciál se se zvyšující koncentrací zvyšuje.

Na základě zeta potenciálu se zjišťuje stabilita částic. Mezi částicemi působí podle náboje přitažlivé a odpuzivé síly, pokud mají částice náboj dostatečně velký, tak se navzájem odpuzují, naopak pokud je náboj slabý, částice jsou nestabilní a mohou agregovat. Obecně pokud mají částice zeta potenciál v rozmezí od -30 mV do 30 mV, považují se za nestabilní, zatímco pokud je hodnota pod -30 mV nebo nad 30 mV, nedochází k agregaci a částice jsou stabilní [46].



Obr. 18: Schéma elektrické dvojrůstvy [49]

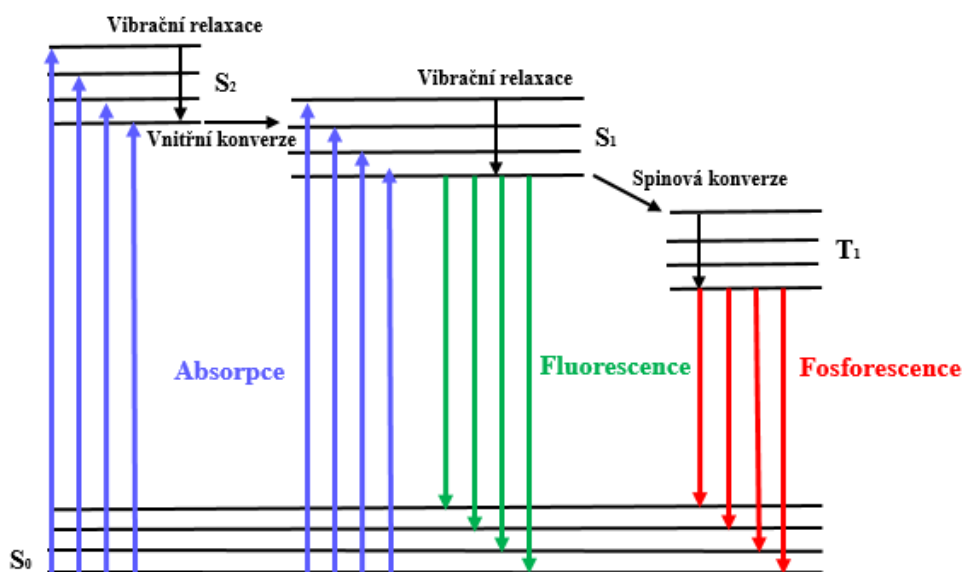
## 2.8 Fluorescenční spektroskopie

Pomocí fluorescenční spektroskopie se analyzují molekuly na základě jejich fluorescenčních vlastností. Základem je fluorescence, fyzikálně chemický děj, který je typem fotoluminiscence.

Obecně je luminiscence emise světla z molekuly a existuje několik typů, například chemiluminiscence, elektroluminiscence a již zmiňovaná fotoluminiscence, pod kterou se řadí fluorescence a fosforescence.

Při fluorescenci dochází k emisi absorbovaného záření z elektronově excitovaného stavu zpět do základního stavu za současného uvolnění elektromagnetického záření. Fluorescenční spektroskopie využívá paprsek světla, který excituje elektrony v molekulách ze stavu  $S_0$  do stavu  $S_1$  nebo vyššího (například u pyrenu). Před následnou emisí dochází k nezářivým přechodům (vnitřní konverze a vibrační relaxace) na nejnižší vibrační hladiny  $S_1$ . Emise tak probíhá vždy ze stavu  $S_1$  do stavu  $S_0$ . Světlo je směřováno na monochromátor, pak na detektor pro měření a identifikaci molekul nebo změny v molekule [50].

Perrin-Jabloňského diagram znázorňuje procesy, které se vyskytují mezi absorpcí a emisí. Na obr. 19 je typický Perrin-Jabloňského diagram, kde je znázorněn základní singletový stav ( $S_0$ ), dva excitované singletové stavy ( $S_1$  a  $S_2$ ) a tripletový excitovaný stav ( $T_1$ ). Na každém z těchto stavů je několik vibračních hladin.



Obr. 19: Perrin-Jabloňského diagram

Přechody mezi jednotlivými stavy trvají  $10^{-15}$  s, což je velmi krátký čas na to, aby došlo i k posunutí jader, elektrony se excitují a tomu se říká Franck-Condonův princip. Absorpce a emise nastává nejčastěji u molekul s nejnižší vibrační energií. Energetický rozdíl mezi základním a excitovaným stavem je velký, z toho důvodu se pro excitaci používá světelné záření a ne teplo. Jak už bylo řečeno, před následnou emisí dochází k nezářivým přechodům (vibrační relaxace a vnitřní konverze) z vyšších excitovaných stavů na nejnižší vibrační hladinu stavu  $S_1$ . Zářivý přechod ze stavu  $S_1$  zpět na základní stav  $S_0$  (emise) se nazývá fluorescence. Doba života fluorescence je velmi krátká ( $10^{-8}$  s). Ze stavu  $S_1$  může dojít ke spinové konverzi do prvního tripletového excitovaného stavu  $T_1$ . Emise z tohoto stavu se nazývá fosforescence.



Tripletový stav má nižší energii než singletový stav, takže emisní maximum fosforescence se nacházejí při delších vlnových délkách než fluorescence. Fosforescence se řadí mezi zakázané přechody, má tak delší životnost než fluorescence [51, 52].

Fluorescenční spektroskopie se běžně používá ke studiu strukturálních změn v konjugovaných systémech, aromatických molekulách a jiných sloučenin v důsledku změny teploty, pH prostředí, iontové síly nebo rozpouštědla. Jedná se o vysoce citlivou techniku [51].

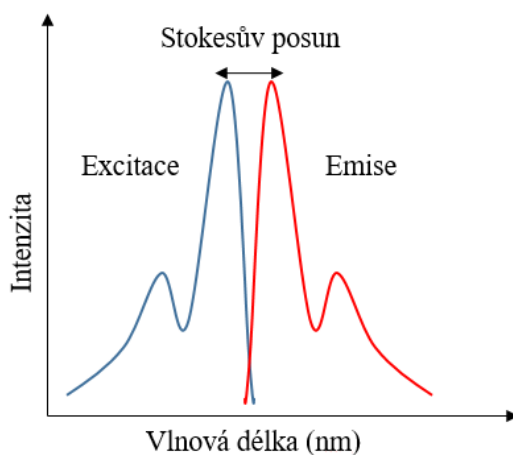
### 2.8.1 Fluorescenční spektrum

Fluorescenční spektrum v ustáleném stavu je takové, kdy je molekula excitována stálým zdrojem světla, zároveň dochází k emisi a emitované fotony nebo intenzita jsou detekovány jako funkce vlnové délky.

Fluorescenční spektrum je emisní nebo excitační. Excitační spektra vykreslují intenzitu při pevné emisní vlnové délce a mění se excitační vlnové délky. Excitační spektrum může mít podobný tvar jako absorpční spektrum, pokud absorbuje jen taková část molekuly, která je schopna fluorescence. Excitační spektrum tak poskytuje informace o vlnových délkách, při kterých bude vzorek absorbovat tak, aby vlnová délka emise byla stále stejná. Naopak emisní spektrum vykresluje intenzitu při stále stejné excitační vlnové délce a různé emisní vlnové délce, poskytuje informace o molekulární struktuře fluoroforu a o prostředí, ve kterém se nachází [50, 51].

Emisní spektrum není závislé na vlnové délce excitace, což říká Kashovo pravidlo, a to z toho důvodu, že před emisí dochází k relaxaci. Fluorescenční přechod tak nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$ , protože přebytečná energie byla rozptýlena (nezářivé přechody). Relaxace trvá méně než  $10^{-12}$  s. Existují výjimky, jako jsou fluorofory, které existují ve dvou ionizačních stavech, z nichž každý vykazuje odlišná absorpční a emisní spektra.

Emisní spektrum se obvykle vyskytuje při vyšších vlnových délkách a nižší energii než excitační spektrum, protože k excitaci je potřeba velké množství energie. Energie uvolněná při emisi je nižší než excitační energie, protože došlo ke ztrátě části energie při již zmíněné vibrační relaxaci a vnitřní konverzi. Tento rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou se nazývá Stokesův posun, který je vidět na *obr. 20*, jde tedy o rozdíl mezi emisním a excitačním maximem. Emisní a excitační spektra jsou často zrcadlovým obrazem, a to kvůli stejnému poměru mezi excitovaným a základním stavem [52].



Obr. 20: Fluorescenční spektrum

## 2.8.2 Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie fluorescence se běžně využívá v biologických aplikacích pro zjištění informací o velikosti a tvaru molekul, rigiditě molekulárního prostředí nebo tekutosti membrán.

Měření anizotropie je založeno na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem. Světlo je elektromagnetické vlnění, polarizované světlo má všechny elektrické vektory orientovány stejným směrem.

Přednostně jsou excitovány fluorofory, jejichž přechodový moment je orientován rovnoběžně s elektrickým vektorem excitujícího záření. Přechodový moment má definovanou orientaci vzhledem k molekulární ose. V roztoku vzorku jsou fluorofory orientovány různě, což znamená, že dochází k selektivní excitaci těch, které jsou orientovány v rovině elektrického vektoru excitujícího záření. Výsledkem selektivní excitace je částečně orientovaná populace fluoroforů, tzv. fotoselekce a polarizovaná fluorescenční emise. Fluorescence anizotropie ( $r$ ) a polarizace ( $P$ ) jsou výrazy pro stejný jev, vypočítat je lze podle těchto vzorců:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}, \quad (2.3)$$

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}, \quad (2.4)$$

kde  $I_{VV}$  a  $I_{VH}$  jsou vertikální (VV) a horizontální (VH) intenzity fluorescence.

Fluorescenční anizotropie je citlivá na některé faktory, které ovlivňují rychlost rotační difuze fluoroforu, a proto závisí na teplotě, viskozitě roztoku a vlastnostech fluoroforu. K rotační difuzi dochází během excitovaného stavu a z toho důvodu emitované záření neodpovídá záření absorbovanému. Excitovaný stav trvá zhruba  $1^{-10}$  ns. Fluorofory v neviskózním prostředí rotují rychleji a anizotropie se blíží k nule, zatímco opačně, pokud je prostředí viskózní, tak fluorofory rotují pomaleji, tudíž se anizotropie zvyšuje [52, 53].

## 2.8.3 Fluorofory

Fluorofory jsou látky schopné fluorescence, obecně se mohou dělit na dvě skupiny – vnější a vnitřní.

Vnitřní fluorofory se vyskytují přirozeně, řadí se mezi ně aromatické aminokyseliny, NADH, flaviny, deriváty pyridoxylu, chlorofyl a další. Vnější fluorofory jsou takové, které se přidávají do vzorků, které nevykazují schopnost fluorescence (DNA, lipidy,...) nebo ke změně spektrálních vlastností vzorku. Mohou se vázat kovalentně nebo nekovalentně, záleží na jejich povaze.

Jedním z nejčastěji používaným vnějším fluoroforem vázajícím se kovalentně je dansyl chlorid, používá se zejména k označení proteinů. Další významné fluorofory patřící do této skupiny jsou rhodamin a fluorescein. Jinak se takovým vnějším fluoroforům vázajícím se kovalentně říká fluorescenční značky.

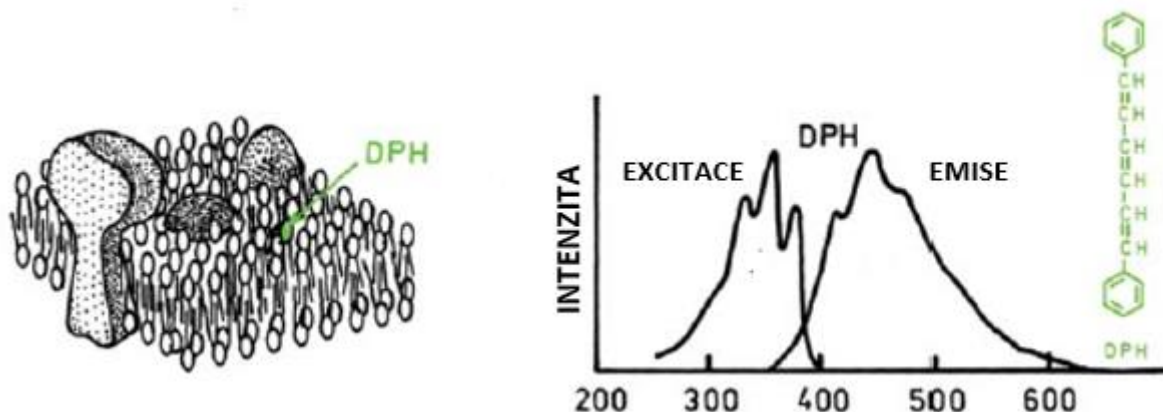
Vnější fluorofory, které se vážou nekovalentně, se nazývají fluorescenční sondy. Fluorescenční sondy se často využívají například jako sondy pro nukleové kyseliny nebo membránové sondy, protože membrány obvykle nejsou schopny fluorescence. Jako membránové sondy se nejčastěji používají DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen) nebo laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen) [52].



### 2.8.3.1 DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien)

DPH je jednou z nejčastěji používaných fluorescenčních membránových sond. Tvar této molekuly je tyčinkovitý [54]. 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien, který je zobrazen na obr. 21, je hydrofobní látka. Běžně se využívá jako sonda membránové tekutosti při měření fluorescenční anizotropie, která byla popsána v kapitole 2.8.2. DPH neposkytuje téměř žádnou emisi ve vodné fázi, tudíž všechna emise je pak z DPH vázaného v membráně [52].

Hloubka umístění sondy ve dvojvrstvé membráně lze ovlivnit délkou řetězce a tendencí orientovat se převážně paralelně s mastnými acylovými řetězci dvojvrstvy [55].



Obr. 21: DPH – struktura, fluorescenční spektrum a začlenění v membráně [52]

### 2.8.3.2 Laurdan

Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen) je amfifilní molekula na bázi naftalenu, struktura je zobrazena na obr. 22, a využívá se jako sonda při měření fluorescenční spektroskopie.

Kvantový výtěžek laurdanu je mnohem vyšší v membránách než ve vodném prostředí, tam je jeho rozpustnost malá. Fluorescenční excitace a emise laurdanova spektra jsou extrémně citlivá na polaritu a dipolární dynamiku prostředí.

Generalizovaná polarizace (GP) je způsob vyhodnocování spekter, využívá se ke studiu membránových struktur a dynamiky, říká, kolik molekul rozpouštědla se pohybuje v blízkosti fluorescenční sondy, konkrétně laurdanu. Generalizovaná polarizace tak tedy udává informace o membránách (tekutost a polarita).

Na základě různé polarizace vykazuje laurdan relativně velké posuny v emisním spektru. Jev je označován jako relaxace rozpouštědla, která je zapříčiněna přeorientováním dipólů rozpouštědla vzhledem k excitovaným molekulám fluorescenční sondy. Změna orientace dipólů spotřebuje energii excitovaného laurdanu a nastane relativně velký posun v emisním spektru směrem k červené oblasti (vyšší vlnová délka), s tím souvisí zmíněná generalizovaná polarizace, která se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$GP = \frac{I_b - I_r}{I_b + I_r} \quad (2.5)$$

kde  $I_b$  je intenzita v modré oblasti a  $I_r$  je intenzita v červené oblasti.

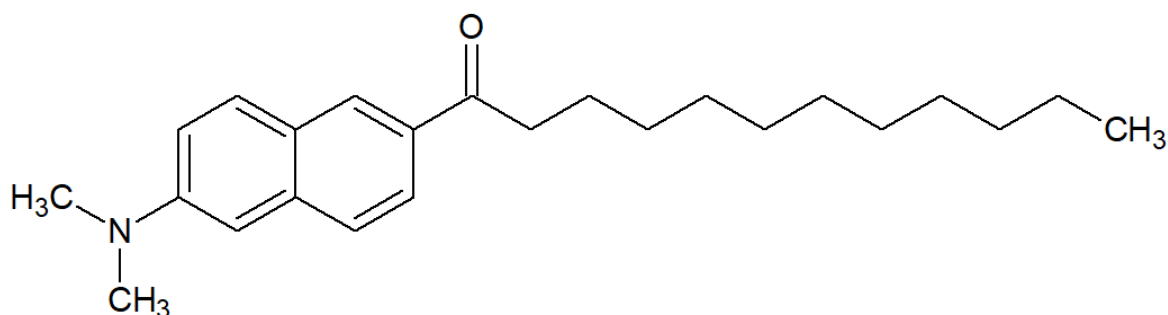
Při menším uspořádání membrány se v oblasti laurdanu vyskytuje více rozpouštědla, které interaguje s fluoroforem, spotřebovává se energie, emise je posunuta k vyšším vlnovým délkám

a fluidita membrány je vyšší. Naopak při menším uspořádání membrány je množství rozpouštědla menší, není potřeba energie na organizaci a vlnová délka je kratší.

Vysoká hodnota generalizované polarizace je obvykle spojena s nízkou tuhostí, nízkou polaritou nebo vysokým obsahem cholesterolu v membránách, nízká polarizace znamená opak.

Výhodou metody generalizované polarizace je možnost získání ustáleného stavu a dynamické informace bez polarizátorů. Poskytuje kvantifikace fázových stavů lipidové membrány včetně počtů frakcí různých fázových stavů v membránách s neznámým lipidovým složením.

Pomocí laurdanu lze rozlišovat, jestli je membrána v uspořádané nebo neuspořádané fázi. V uspořádané se maximum emise pohybuje kolem 440 nm a při neuspořádané fázi se emise pohybuje kolem 490 nm. Nevýhodou laurdanu je citlivost na fotovybělování [56, 57].



Obr. 22: Struktura laurdanu

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Záporně nabitě vezikuly

**Villasmil-Sánchez Sheila a spol.** studovali vliv složení liposomů, lamelarity, metody přípravy, velikost, polydisperzitu a povrchový náboj liposomů na účinnost zapouzdření léčiva sumatriptan. Zaměřili se především na multilamelární, unilamelární a opakovaně zamrazované a rozmrazované liposomy. Pro svůj výzkum využívali pozitivně i záporně nabitě liposomy. Liposomy s nábojem byly připraveny za použití fosfatidylcholinu a cholesterolu v kombinaci se stearylaminem (kladný náboj) nebo dicetylfosfátem (záporný náboj). Vlastnosti liposomů byly zjišťovány konfokální laserovou skenovací mikroskopií, optickou mikroskopií, dynamickým rozptylem světla a elektroforetickým rozptylem světla. Pro získání více informací o zapouzdření se využila dynamická dialýza. Statistická analýza prokázala, že způsob přípravy nemá výrazný vliv na zmíněné vlastnosti liposomů. Největší vliv na charakteristické vlastnosti liposomů měl náboj. Povrchový náboj liposomů se měnil v závislosti na použitém nabitěm činidle. Nejvyšší účinnost liposomů obsahujících sumatriptan byla prokázána u pozitivně nabitých liposomů obsahujících 6,58: 10,34: 3,73 molárního poměru pro fosfatidylcholin:cholesterol:stearylamin. Také průměrná velikost liposomů byla ovlivněna nábojem, u pozitivně nabitých liposomů byla menší. Konečný výsledek tedy ukázal, že vezikuly obsahující sumatriptan se chovají jinak, pokud nesou záporný náboj a jinak s kladným nábojem [58].

**Bana Laura a spol.** se ve studii zaměřovali na léčbu Alzheimerovy choroby cílením na amyloid- $\beta$  peptid (Ap) v mozku. Zaměřili se na schopnost liposomů, které byly bifunkcionalizované kyselinou fosfatidovou a modifikovaným peptidem odvozeným od ApoE (mApoE-PA-LIP), ovlivňovat agregační a disagregační vlastnosti Ap. Zároveň se zajímali o schopnost liposomů překračovat hematoencefalickou bariéru. Závěr studie byl takový, že zmíněné bifunkční liposomy ovlivňují agregaci a disagregaci Ap, zároveň jsou schopny procházet přes hematoencefalickou bariéru (*in vitro* a *in vivo*). Podobné liposomy se tak mohou stát potenciální možností pro léčbu Alzheimerovy choroby [59].

**Duan Yin a spol.** pracovali na studii, jejíž cílem bylo vytvořit liposomové systémy pro dodávání cytoplazmatických léčiv s prodlouženou životností v živém organismu a citlivostí na pH. Liposomy byly vytvořeny za použití hydrogenovaného sójového fosfatidylcholinu (HS), cholesteryl hemisukcinátu (CHEM), polyethylenglykolu (PEG) a diethylentriaminpentaové kyseliny modifikované fosfatidylethanolaminem. Jako metody přípravy využili hydrataci lipidového filmu a extruzi. Ve studii byly charakterizovány fyzikálně-chemické vlastnosti různých systémů. Citlivost na pH byla hodnocena monitorováním uvolňování zapouzdřeného kalceinu. Stabilita radioaktivně značených liposomů byla hodnocena v laboratorních podmínkách inkubací s lidským sérem. Nejlepší systém byl vybrán a injekčně podán zdravým potkanům pro hodnocení absorpce tkáně a farmakokinetiky. Vytvořené liposomy měly průměr mezi 88 a 102 nm a byly negativně nabity na povrchu. 1 % PEG-HS-CHEM reagoval velmi rychle na okyselení a také ukázal silnou degradaci v séru. 4 % PEG-HS-CHEM, který vykazoval jak relativně dobrou citlivost na pH (uvolňování až do 20 %), tak i dobrou stabilitu (stabilita > 70 % po 24 hodinách). Tkáňová distribuce 4 % PEG-HS-CHEM byla srovnatelná s distribucí 4 % PEG-HS-Chol, který dlouho cirkuloval, ale nebyl příliš citlivý na pH, hlavní akumulaci vykazoval v játrech, slezině, střevech a ledvinách. Analýza krevní clearance v rychlé

a pomalé fázi ukázala příznivé hodnoty poločasu: 0,6 a 14 hodin. Závěr studie byl takový, že 4 % PEG-HS-CHEM vykázal slibné výsledky v citlivosti na pH, stabilitě séra, absorpci tkání a kinetice, z toho důvodu je považován za liposomální systém pro multifunkční terapeutické aplikace [60].

*Yotsumoto Satoshi a spol.* se ve své studii zaměřili na záporně nabitě liposomy enkapsulující antigen. Liposomy byly připraveny ze dvou fosfolipidů, a to z kyseliny fosfatidové (PA) a fosfatidylserinu (PS). Tyto dva fosfolipidy jsou hlavním negativním nábojem v plazmatické membráně. Buňky absorbují přednostně právě ty liposomy, které obsahují kyselinu fosfatidovou nebo fosfatidylserin. Výsledky studie naznačují, že antigen dodávaný pomocí negativně nabitých liposomů obsahujících PS vykazuje větší specifitu než antigen dodávaný liposomem obsahujícím PA. Záporně nabitě PS-liposomy by mohly být užitečné při buněčné terapii. Lepší výsledek u liposomů, které obsahují PS, byl jednak kvůli zápornému náboji, ale také měla vliv serinová hlavní část PS, která hrála důležitou roli při rozpoznávání liposomů buňkami. Současně bylo zjištěno, že PS-liposomy s enkapsulovaným antigenem částečně napodobují aktivitu apoptotických buněk, které jsou důležité především pro imunitní systém [61].

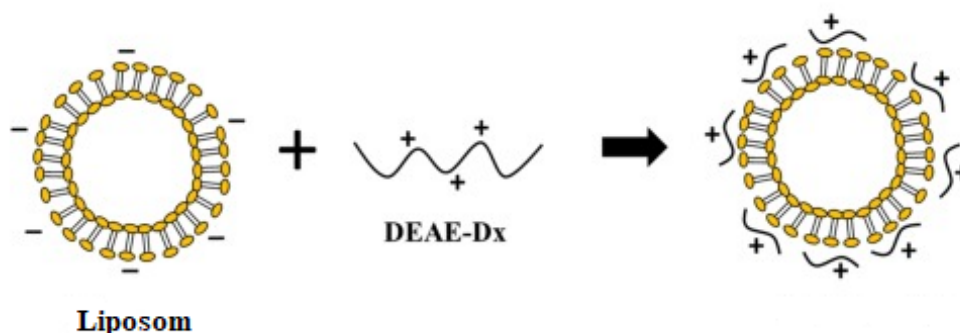
### 3.2 Interakce polykationtů s vezikulárními systémy

*Ivashkov Oleg V. a spol.* se zabývali studií, ve které jsou syntetizovány polykationty polymerací 2-vinylpyridinu a následnou kvarternizací výsledného polymeru. Polykationty na bázi kvaternizovaného 2-vinylpyridinu (PVPQ) se stupněm polymerizace od 20 do 440 se hromadí na povrchu malých aniontových liposomů. Liposomy byly připraveny z kardiolipinu ( $CL^{2-}$ ) a vaječného lecitinu (EL) nebo dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC). Všechny PVPQ jsou zcela adsorbovány na liposomový povrch až do určité koncentrace, při které je dosaženo nasycení (což je specifické pro každý PVPQ). Krátké PVPQ interagují s aniontovými lipidy lokalizovanými na vnější straně lipidové membrány, zatímco dlouhé PVPQ přitahují aniontové lipidy z vnitřní strany lipidové membrány na povrch. Komplexy mají tendenci agregovat, největší agregáty se tvoří, když je počáteční náboj liposomů plně neutralizován nábojem PVPQ. Tyto výsledky jsou důležité pro interpretaci biologických účinků kationtových polymerů a pro výběr kationtových polymerů pro biomedicínské aplikace [62].

*Ji-Yeon Chun a spol.* se zabývali tvorbou stabilních vícevrstevných liposomů elektrostatickým vázáním biopolymerů po vrstvách. Byly použity dvojvrstvé lamelární vezikuly připravené z lecitinu a na něj se vrstvily pozitivně (chitosan) a negativně (vysoce methoxylovaný pektin a  $\lambda$ -karagenan) nabitě biopolymery. Výsledky ukazují omezení při nanášení vrstvy po vrstvě, což je důležité pro výrobce potravin, kteří chtějí vytvářet velmi silné polymerní vrstvy pro stabilizaci disperzí, jako jsou emulze nebo liposomy [63].

*Premanarayani Menon a spol.* studovali stabilizaci liposomů elektrostatickým vázáním polykationtového derivátu dextranu, kterým je diethylaminoethyl dextran (DEAE-Dx), na liposomu sójového lecitinu. Liposomy byly připraveny metodou hydratace tenkého filmu. Probíhalo měření zeta potenciálu a diferenciální skenovací kalorimetrie. Zeta potenciál liposomů se po přidání DEAE-Dx změnil z negativního na pozitivnější, tím bylo potvrzeno potažení liposomů zmíněným polykationtem. Stabilita vytvořených systémů byla zkoumána měřením velikosti částic a zeta potenciálu po dobu 35 dnů. Sledováním bylo potvrzeno, že suspenze liposomů s DEAE-Dx je stabilnější než suspenze nepotažených liposomů.

Ve srovnání s jinými zkoumanými koncentracemi DEAE-Dx byla optimální koncentrace DEAE-Dx zabudovaného do liposomu pozorována při 0,02% (hmotn./obj.). Účinnost zapouzdření liposomu potaženého DEAE-Dx vykazuje taktéž mírně vyšší hodnotu ve srovnání s nepotaženými liposomy [64].



Obr. 23: Liposom se záporným nábojem obalený polykationtem DEAE-Dx [64]

**Mengdan Qiang a spol.** studovali vliv chitosanem hydrochloridem (CH) a laktoferinem (LF) modifikované povrchové membrány na vlastnosti liposomů obsahujících astaxantin. Liposomy byly připraveny pomocí tenkovrstvé ultrazvukové metody. Na základě elektrostatistických sil mezi záporným nábojem lecitinu z vaječného žloutku (LF) a kladným nábojem CH byl upraven povrch liposomů. Vhodné koncentrace modifikátorů byly stanoveny na základě velikosti částic, zeta potenciálu a účinnosti zapouzdření. Výsledky výzkumu ukázaly, že popsaná modifikace membrány dokáže účinně chránit astaxantin před oxidací nebo degradací teplem a zvýší se antioxidační účinky liposomu. Z toho plyne, že modifikace povrchu membrány hraje důležitou roli při stabilizaci liposomů s lipidovou dvojvrstvou [65].

**Zheng-Lin Huang a spol.** se zabývali různě nabitými katanionickými vezikuly s hodnotami potenciálu od +59 mV do -96 mV, které byly připraveny polospontánním procesem z iontového amfifilního páru dodecyltrimethylamonium-dodecylsulfátu (DTMA-DS) a dvou povrchově aktivních látek, kationtu dodecyltrimethylamonium bromid (DTMAB) a aniontu dodecylsulfát sodný (SDS) přidavkem rozpouštědla 1-propanolu ve vodě. Vznikly tak kladné i záporné systémy. Po přípravě vezikul byla pozorována jejich interakce s různými polymery (hydroxyetylcelulóza a hydrofobně modifikovaná hydroxyetylcelulóza). Při interakci nabitých katanionických systémů s polymery rozpustnými ve vodě, které nemají náboj ani hydrofobní interakce, došlo k fázové separaci při nízkých koncentracích polymeru a gelová struktura byla vytvořena při vysokých koncentracích polymeru. Když se jednalo o nenabité polymer, kde vznikaly hydrofobní interakce mezi katanionickými vezikuly a polymery, tak nedošlo k fázové separaci, protože dominoval hydrofobní účinek nad elektrostatickým. Při interakci nabitého katanionického systému s kladným polyelektrolytem byla fázová separace silně závislá na náboji vezikul. Záporně nabitě vezikuly v roztoku způsobily, že roztok byl více viskózní a fázová separace nastávala, pokud byly vezikuly nabitě kladně. V přítomnosti kationtových polyelektrolytů s hydrofobními interakcemi a záporně nabitými vezikuly nastala fázová separace při nižších hodnotách koncentrace polymeru, působily tak tedy hydrofobní i elektrostatické účinky. U směsí kladně nabitých vezikul s hydrofobní modifikací neproběhla fázová separace, vzniklý roztok byl opět viskózní a hydrofobní účinky byly v dominanci nad elektrostatickými účinky [66].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato část bakalářské práce obsahuje veškeré využití chemikálie pro přípravu vzorků, jsou zde popsány všechny postupy a metody, kterými byly připravené vzorky zkoumány a následně vyhodnoceny.

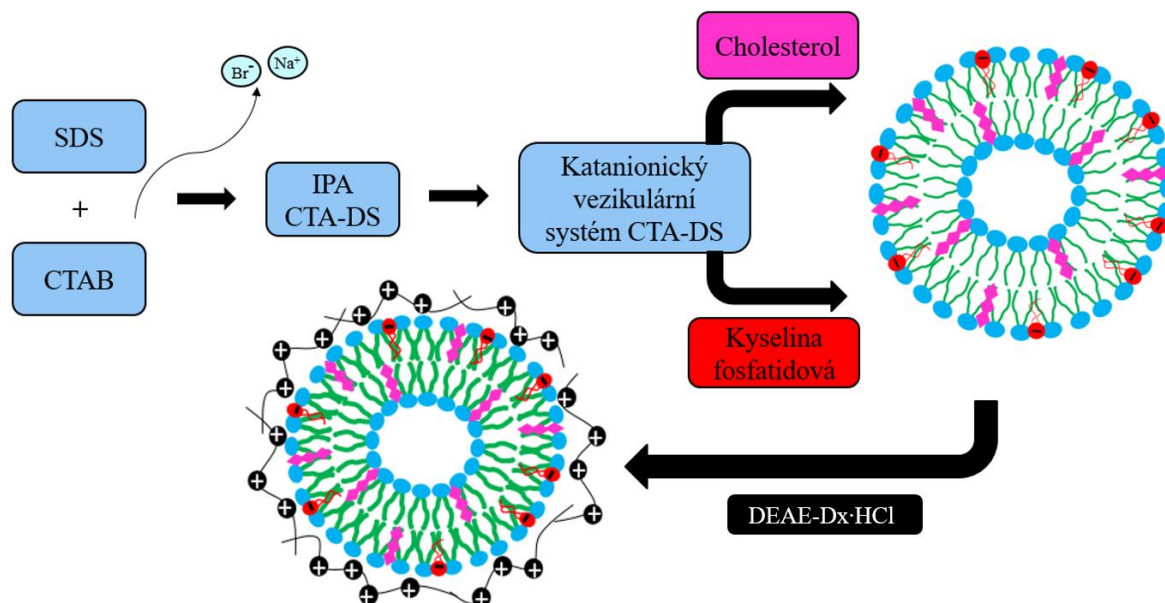
### 4.1 Chemikálie

Tenzidy	<b>Dodecylsulfát sodný (SDS)</b> Vzorec: $C_{12}H_{25}NaO_4S$ Mr: $288,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Sigma Aldrich CAS: 151-21-3 Číslo šarže: L3771-100G Čistota: $\geq 98,5\%$
	<b>Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB)</b> Vzorec: $C_{19}H_{42}BrN$ Mr: $364,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Sigma Aldrich CAS: 57-09-0 Číslo šarže: H5882-500G Čistota: $\geq 98\%$
Lipidy	<b>1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfát (sodná sůl – PA 12:0)</b> Mr: $558,661 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Avanti Polar Lipids, Inc. CAS: 108321-06-8 Číslo šarže: 840635P-200mg
	<b>Cholesterol</b> Vzorec: $C_{27}H_{46}O$ Mr: $386,65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Sigma Aldrich CAS: 57-88-5 Číslo šarže: 26732-25G-F Čistota: $\geq 99\%$
Polyelektrolyt	<b>Hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dx-HCl)</b> Sigma Aldrich CAS: 9064-91-9 Číslo šarže: D9885-100G
Sondy	<b>6-dodekanoyl-N,N-dimethyl-2-naftylamine (Laurdan)</b> Vzorec: $C_{24}H_{35}NO$ Mr: $353,54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Sigma Aldrich CAS: 74515-25-6 Číslo šarže: 40227-100MG Čistota: $\geq 97\%$
	<b>1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)</b> Vzorec: $C_{18}H_{16}$

	Mr: 232,33 g·mol <sup>-1</sup> Sigma Aldrich (Fluka) CAS: 1720-32-7 Číslo šarže: 43050-1g Čistota: ≥ 98%
Rozpouštědla	<b>Chloroform</b> Vzorec: CHCl <sub>3</sub> Mr: 119,38 g·mol <sup>-1</sup> Penta s.r.o. CAS: 67-66-3 Číslo šarže: 2107210716
	<b>Aceton</b> Vzorec: C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O Mr: 58,08 g·mol <sup>-1</sup> Lach-Ner, s. r. o. CAS: 67-64-1 Čistota: ≥ 99,98%
	<b>Methanol</b> Vzorec: CH <sub>4</sub> O Mr: 32,04 g·mol <sup>-1</sup> Sigma Aldrich (Fluka) CAS: 67-56-1 Číslo šarže: 34966-2.5L Čistota: ≥ 99,9%
	<b>Deionizovaná voda</b> Vzorec: H <sub>2</sub> O Systém: ELGA

## 4.2 Příprava vzorků

Další kapitoly budou věnovány postupu přípravy vzorků (viz obr. 24), které byly následně různými metodami měřeny. Připravené systémy vznikly z dvou povrchově aktivních látek. Pozitivní povrchově aktivní látka byla CTAB a negativní SDS, z nich byly vytvořeny vezikuly s přídavkem cholesterolu, který zajistil intra-vezikulární stabilizaci, a s přídavkem kyseliny fosfatidové (PA) pro lepší inter-vezikulární stabilizaci. Přídavek záporně nabitě kyseliny fosfatidové umožnil interakci s polykationtem, konkrétně s DEAE-Dx·HCl.



Obr. 24: Schéma přípravy systémů

#### 4.2.1 Amfifilní páry

Amfifilní páry (IPA) byly připraveny ze dvou roztoků. První roztok obsahoval rozpuštěnou potřebnou navážku PAL CTAB v deionizované vodě. Stejně tak byl připraven i roztok s PAL SDS. Navážky povrchově aktivních látek byly voleny tak, aby koncentrace roztoku činila  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Oba dva připravené roztoky byly ponechány 24h na magnetické míchačce, aby došlo k rozpuštění veškerého množství povrchově aktivních látek.

Dalším krokem v přípravě IPA bylo smíchání již připravených roztoků v poměru 1:1. Vzniklý roztok byl opět míchán na míchačce po dobu 24h, kde byla udržována teplota  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vyšší teplota je potřebná zejména kvůli vzniku nekovalentních vazeb mezi tenzidy a vysrážení precipitátu CTA-DS. Následovala desetiminutová centrifugace při 3500 otáčkách za minutu pro oddělení precipitátu CTA-DS od supernatantu. Získaný precipitát byl přefiltrován na Büchnerově nálevce za sníženého tlaku, zároveň proběhlo promývání deionizovanou vodou, aby byly odstraněny protiionty. Posledním krokem bylo sušení při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , které trvalo 3 až 5 dní. Konečným produktem byl bílý prášek CTA-DS.

#### 4.2.2 Katanionické vezikulární systémy

Katanionické vezikulární systémy byly připravovány jak bez stabilizace, tak zároveň i stabilizované pomocí cholesterolu nebo i kyseliny fosfatidové. Postup přípravy byl vždy stejný, lišil se jen přidavkem případných dalších složek.

Navážka připraveného CTA-DS byla zvolena tak, aby měl roztok po zalití chloroformem koncentraci  $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Do takto vzniklého roztoku byly přidány skleněné kuličky (tyto kuličky jsou přidány, aby zvětšily povrch, ze kterého vznikají po rehydrataci vezikuly) a celý obsah vialky byl promíchán pomocí vortexu, aby se povrch skleněných kuliček pokryl roztokem. Po zvortexování se vialka otevřela a nechal se v digestoři volně odpařit veškerý chloroform. Po úplném odpaření se na kuličkách vytvořil film, který byl rehydratován takovým množstvím deionizované vody, aby měl roztok koncentraci stále  $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Na závěr proběhla sonifikace tyčovým dispergátorem. Vždy bylo sonifikováno 6 ml roztoku vzorku,



pro takové množství byla vyhovující amplituda 30% a energie 5 kJ. U takto připravených vzorků byla následně měřena velikost částic a zeta potenciál, což bude podrobněji popsáno v kapitole 4.3.1.

Příprava systémů s 43 mol. % cholesterolu probíhala s tím rozdílem, že při vážení CTA-DS bylo naváženo i potřebné množství cholesterolu, výše uvedený postup byl zcela totožný.

Další připravené systémy nebyly stabilizované pouze cholesterolem, ale i přidavkem záporně nabitě amfifilní látky, kterou byla kyselina fosfatidová (PA). Jejím přidavkem se zlepšuje celková stabilita a zvyšuje se celkový záporný náboj, což bude důležité pro interakci s polykationtem.

Postup přípravy systémů CTA-DS s cholesterolem a kyselinou fosfatidovou byl opět téměř stejný. Při vážení CTA-DS a cholesterolu bylo naváženo i potřebné množství kyseliny fosfatidové. Vzorky byly připraveny se čtyřmi různými koncentracemi PA (5, 10, 20 a 30 mol. %). Po navážení všech potřebných látek byl přidán chloroform s methanolem v poměru 4:1. Methanol se přidává v systémech s kyselinou fosfatidovou pro zabezpečení jejího úplného rozpuštění. Další kroky přípravy systému CTA-DS s cholesterolem a PA byly stejné, jak je uvedeno výše.

#### **4.2.3 Interakce záporně nabitého katanionického vezikulárního systému s polykationtem**

Pro přípravu vzorků s DEAE-Dx·HCl bylo nejprve potřebné připravit roztok DEAE-Dx·HCl v deionizované vodě. Koncentrace DEAE-Dx·HCl v připravených systémech byla 0,1 hm. % nebo 1 hm. %. Do vialky bylo naváženo potřebné množství DEAE-Dx·HCl a zalito deionizovanou vodou, roztok byl ponechán na magnetické míchačce po dobu 24h, aby došlo k úplnému rozpuštění. Po uplynulé době došlo ke smíchání systému CTA-DS s cholesterolem a PA v poměru 1:1 s roztokem DEAE-Dx·HCl. Vzniklý roztok byl opět 24h míchán na magnetické míchačce, aby došlo k co nejlepšímu obalení vezikul hydrochloridem diethylaminoethyl-dextranem.

#### **4.2.4 Sondy**

Možnost měřit generalizovanou polarizaci a anizotropii vzorků zajistily sondy. Pro měření anizotropie byl využit DPH a pro generalizovanou polarizaci laurdan.

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky laurdanu a DPH. Potřebná navážka byla zalita takovým množstvím acetonu, aby koncentrace byla  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , takto připravený roztok byl homogenizován než se celá navážka rozpustila.

Do vialky byl napipetován 1 ml nachystaného systému CTA-DS s cholesterolem popř. s PA nebo i DEAE-Dx·HCl, 4 ml deionizované vody a roztok potřebné sondy v takovém množství, aby koncentrace sondy ve vzorku byla  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Vialky s připravenými roztoky se nechaly 24h homogenizovat a následně byla měřena generalizovaná polarizace s anizotropií.

### **4.3 Měření a zpracování výsledků**

#### **4.3.1 Velikost částic a zeta potenciál**

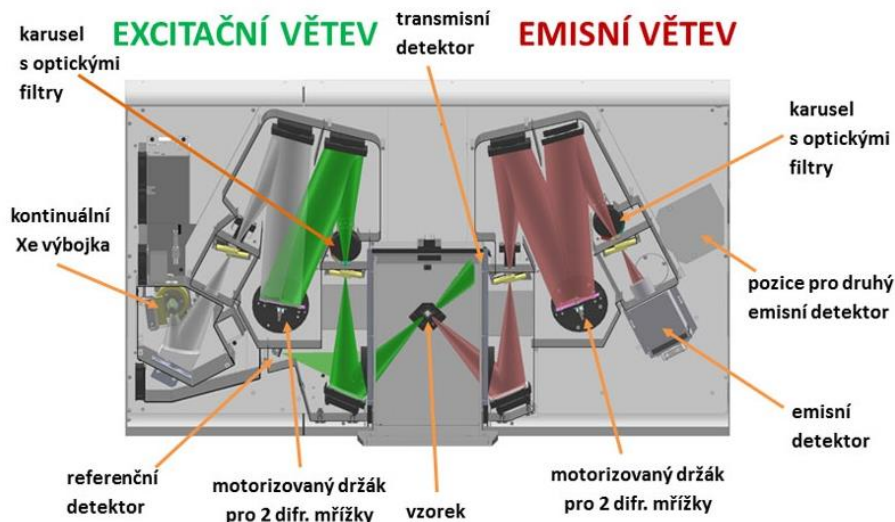
Měření na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument) bylo provedeno především z důvodu potvrzení vzniku částic, zjištění distribuce velikosti částic ve vzorcích a velikosti zeta potenciálu.

Při měření distribuce velikosti částic se používaly skleněné kyvety, po umístění vzorku do přístroje bylo spuštěno samotné měření. Měření probíhalo při 25 °C s kalibrací na 30s. Vzorkem procházel laser a systém vyhodnotil distribuci velikosti částic na základě dynamického rozptylu světla. Každý vzorek byl proměřen třikrát, výsledné hodnoty byly zprůměrovány a byl vytvořen graf závislosti intenzity rozptýleného světla na velikosti částic. Z měření distribuce velikosti částic byla využita i hodnota PDI (polydisperzní index) a také Z-average, což je střední hodnota velikosti částic. Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti intenzity na velikosti částic.

Po měření distribuce velikosti částic ve vzorku následovalo měření zeta potenciálu. Do skleněné kyvety se vzorkem byla přidána DIP cell elektroda, měření proběhlo opět při 25 °C. Měření v tomto případě proběhlo pětikrát a výsledná hodnota představovala průměr pěti měření. Naměřená data byla opět zpracována do formy grafu závislosti zeta potenciálu na koncentraci DEAE-Dx·HCl nebo PA ve vzorku.

### 4.3.2 Generalizovaná polarizace

Generalizovaná polarizace byla měřena u vzorků obsahujících laurdan. Měření probíhalo na spektrofotometru (Edinburgh Instruments FS5), jehož konstrukce je zobrazena na *obr. 25*.



*Obr. 25: Vnitřní uspořádání spektrofotometru FS5 [67]*

Před samotným měřením se vzorek nalil do křemenné kyvety a vložil do přístroje. Teplota měření začínala na 65°C a klesala po 5°C až na teplotu 15°C s tím, že po každém klesnutí o 5°C byl stabilizační čas 2 minuty než začalo měření. Excitační monochromátor byl nastaven na 350 nm a emisní spektrum bylo měřeno v rozmezí 450 nm až 550 nm s krokem 2 nm. Rozmezí spektra bylo zvoleno s ohledem na to, že u generalizované polarizace jsou podstatné dvě emisní maxima, při 440 nm v uspořádané fázi (modrá oblast) a při 490 nm ve fázi neuspořádané (červená oblast). Z naměřených intenzit byla vypočítána hodnota generalizované polarizace, což bylo popsáno v kapitole 2.8.3.2. Z vypočítaných hodnot generalizované polarizace byly sestaveny grafy závislosti generalizované polarizace na teplotě.

### 4.3.3 Anizotropie

Anizotropie byla měřena u vzorků obsahujících sondu DPH, opět se využívala křemenná kyveta a spektrofotometr (Edinburgh Instruments FS5). Měření probíhalo velmi podobně,

rozdíl byl pouze v nastavení přístroje. Teplota měření zůstala stejná, začínalo se na 65°C s klesáním až po 15°C a krokem 5°C. Stabilizační čas byl nastaven na 2 minuty a následně probíhalo samotné měření. Při měření anizotropie bylo potřeba zapnout polarizátory, protože, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.8.2, k měření anizotropie je potřeba polarizované světlo. Vlnová délka excitačního monochromátoru zůstala na hodnotě 350 nm. Emise anizotropie byla měřena v rozmezí 395 nm až 495 nm s krokem 4 nm. Naměřená data byla zpracována a výsledkem byl graf závislosti anizotropie na teplotě.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Katanionický vezikulární systém CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu

Nejprve byly připraveny systémy CTA-DS bez jakéhokoliv typu stabilizace. Systémy vykazovaly vysokou míru nestability – okem pozorovatelné velké agregáty. Z toho důvodu nebylo možné tyto roztoky nijak nadále charakterizovat. Důvodem nestability roztoků byla nedostatečná elektrostatická stabilita částic či ztužení membrány, což mělo za následek vznik agregátů.

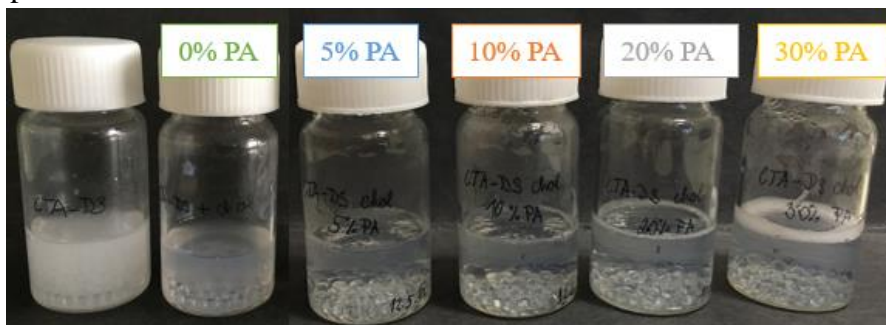
Další systémy CTA-DS byly stabilizovány cholesterolem (popsáno v kapitole 2.3.2), po sonifikaci byl roztok opalescentní a bez viditelných částic. Koncentrace cholesterolu byla zvolena 43 mol. % dle článku [68], kde tato koncentrace v systémech způsobila jednu z nejlepších stabilizací spolu s 53 mol. %. Vyšší koncentrace cholesterolu nebyla volena především z možného důvodu snížení enkapsulační účinnosti pro hydrofobní léčiva [69]. Vizuální rozdíl mezi stabilizovaným a nestabilizovaným systémem je zobrazen na *obr. 26*. Stabilizované roztoky cholesterolem byly po sonifikaci 5x zředěny a bez dalších problémů podrobeny měření velikosti částic a zeta potenciálu. Střední velikost částic byla stanovena na  $(176 \pm 21)$  nm a zeta potenciál byl  $(10,3 \pm 2,3)$  mV. Později proběhlo měření anizotropie a generalizované polarizace, čemuž jsou věnovány kapitoly 5.3 a 5.4.



*Obr. 26: Nestabilizovaný a stabilizovaný systém pomocí 43 mol. % cholesterolu*

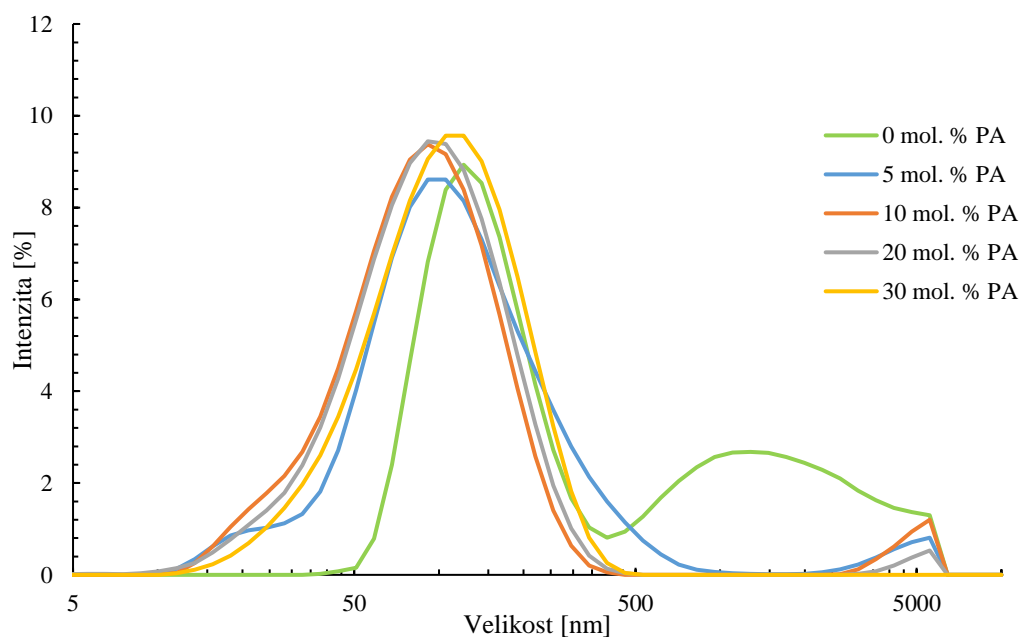
#### 5.1.1 Katanionické vezikulární systémy CTA-DS s přidavkem cholesterolu a kyseliny fosfatidové

Po přípravě systémů CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu byla do dalších vzorků přidána kyselina fosfatidová v koncentracích 5, 10, 20 a 30 mol. %. Přidavkem kyseliny fosfatidové došlo k dalšímu zlepšení stability systémů (popsáno v kapitole 2.3.2) oproti systémům bez PA a to je možno pozorovat na *obr. 27*.



*Obr. 27: Vzorky systémů CTA-DS bez cholesterolu, s cholesterolem a přidavkem PA (5, 10, 20, 30 mol. %)*

Na obr. 28 je zobrazena distribuce velikosti částic podle přidavku PA. Křivka zobrazující systém bez stabilizace přidavkem PA ukazuje výskyt vezikul s větší velikostí (0,5 – 5 µm). V důsledku přidavku 5 mol. % záporné kyseliny fosfatidové došlo ke zvýšení elektrostatických odpudivých sil, docházelo méně k agregaci částic, celková stabilita vezikul byla větší a tím došlo k zúžení píku distribuční křivky. Velikost vezikul byla menší ( $106 \pm 6$ ) nm oproti velikosti bez PA ( $176 \pm 26$ ) nm. U dalších systému s větším přidavkem kyseliny fosfatidové (10, 20, 30 mol. %) se velikost vezikul ještě snížila a píky distribučních křivek se více zúžily (viz obr. 28).



Obr. 28: Distribuce velikosti vezikulárních systémů CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu a různou molární koncentrací PA

Hodnota zeta potenciálu se s přidáváním kyseliny fosfatidové také měnila. Bez přidavku PA se vezikuly pohybovaly v nestabilní oblasti ( $10,3 \pm 2,3$ ) mV, ovšem po přidavku PA se hodnota výrazně snížila. Kyselina fosfatidová má záporný náboj, hodnoty zeta potenciálu se tak přesunuly do zápornějších hodnot a tím bylo potvrzeno začlenění PA do membrány připravených vezikul. I při nižších koncentracích PA (5, 10 mol. %) se hodnota zeta potenciálu pohybovala ve stabilní oblasti. Nejnižší hodnoty ZP bylo dosaženo u přidavku 30 mol. % PA, a to ( $-52,2 \pm 3,2$ ) mV. V tab. 1 je přehled změny hodnot velikostí, polydisperzního indexu a zeta potenciálu podle přidavku kyseliny fosfatidové.

Tab. 1: Přehled hodnot velikostí, PDI a ZP, při různém přidavku PA

PA [mol. %]	Velikost [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
0	$176 \pm 21$	$0,387 \pm 0,079$	$10,3 \pm 2,3$
5	$106 \pm 6$	$0,335 \pm 0,053$	$-42,0 \pm 1,6$
10	$74 \pm 3$	$0,337 \pm 0,060$	$-38,5 \pm 4,6$
20	$77 \pm 7$	$0,285 \pm 0,022$	$-50,1 \pm 2,8$
30	$86 \pm 6$	$0,260 \pm 0,012$	$-52,2 \pm 3,2$

## 5.2 Interakce záporně nabitého katanionického vezikulárního systému s DEAE-Dx·HCl

Připravené systémy s cholesterolem a kyselinou fosfatidovou (5, 10, 20, 30 mol. %) mají záporný náboj, může tak docházet k interakci s polykationty, konkrétně s hydrochloridem diethylaminoethyl-dextranem. Pro potvrzení navázání DEAE-Dx·HCl na vezikuly byla měřena změna velikosti vzniklých systémů a také změna hodnoty zeta potenciálu do kladných hodnot.

Hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran byl přidáván ve dvou koncentracích 0,1 hm. % a 1 hm. %. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě diplomové práce Ing. Romany Repové, kdy při nich nedocházelo k vysrážení částic, které by nám mohly ovlivňovat následující měření [70].

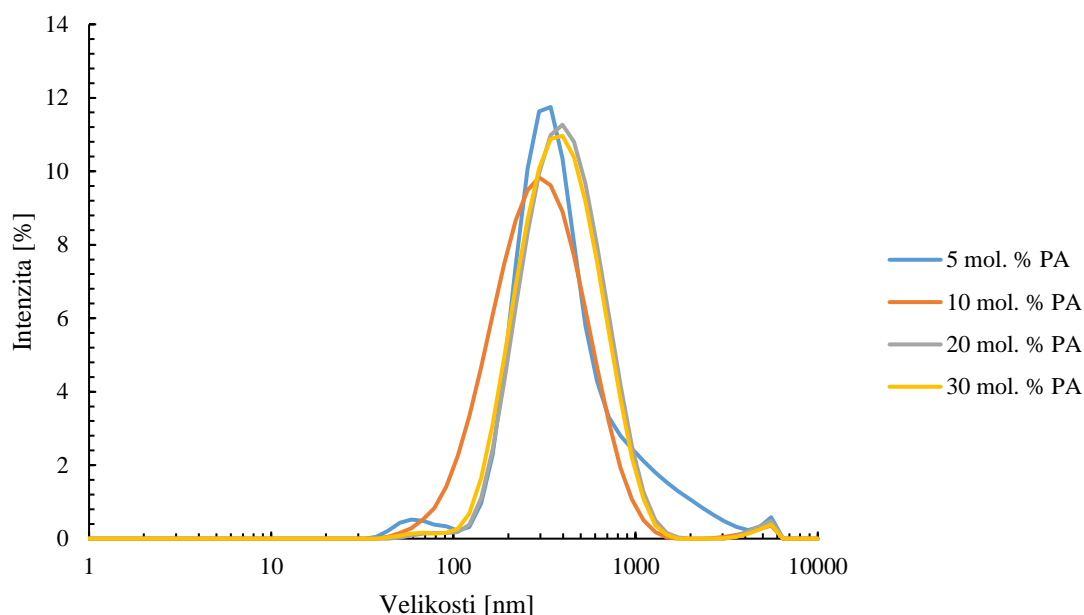
### 5.2.1 Záporně nabitý katanionický systém s přidavkem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl

K systémům obsahujícím cholesterol a kyselinu fosfatidovou v různých koncentracích bylo přidáváno 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl. Vzniklé roztoky neobsahovaly žádné sraženiny viditelné okem, ale byly zakalené, jak je možno vidět na *obr. 29*.



*Obr. 29: Systémy s cholesterolem, různou molární koncentrací PA a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl*

Při měření distribuce velikosti částic, bylo potvrzeno navázání DEAE-Dx·HCl na záporné vezikuly, protože došlo ke zvýšení velikosti, posunu distribuce velikosti a zvýšení zeta potenciálu (viz *obr. 33*). Distribuce velikosti částic po přidavku DEAE-Dx·HCl se s různou koncentrací PA výrazně nelišila, to je možno vidět na *obr. 30*. Střední velikost částic u 5 mol. % PA byla větší, což mohlo být způsobeno vyrovnáním kladného a záporného po přidání DEAE-Dx·HCl, čímž mohly vzniknout větší částice v oblasti 1-5  $\mu\text{m}$  a to vysvětluje nárůst střední velikosti i v rámci distribuce částic. U vezikul s 10 mol. % PA byla velikost částic ( $236 \pm 6$ ) nm, u systémů s 20 a 30 mol. % PA se zvýšila (viz *obr. 30* a *tab. 2*), protože řetězce DEAE-Dx·HCl byly přitahovány k vezikule, která obsahovala více záporné látky, tudíž se mohlo navázat větší množství polykationtu. Rozdíl velikostí mezi vezikulami s 20 a 30 mol. % PA byl zanedbatelný.



Obr. 30: Distribuce velikosti vezikulárních systémů CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu, různou molární koncentrací PA a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl

Současně došlo k posunutí hodnot zeta potenciálu ze záporných hodnot do stabilní oblasti hodnot kladných (viz tab. 2), takový průběh byl očekáván a bylo tak znova potvrzeno navázání DEAE-Dx·HCl na vezikuly. Tím, že se hodnoty pohybují ve stabilní oblasti, bylo zároveň potvrzeno, že došlo k úplnému obalení vezikul polykationtem DEAE-Dx·HCl. Nejvyšší hodnota zeta potenciálu ze všech měřených vzorků byla zjištěna u systému CTA-DS s 30 mol. % PA a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl, jehož hodnota byla  $(45,8 \pm 1,9)$  mV. Důvodem může být hustý záporný náboj kyseliny fosfatidové a v důsledku toho vznik silné vrstvy DEAE-Dx·HCl.

Tab. 2: Přehled hodnot velikostí, PDI a ZP, při různém přidavku PA a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl

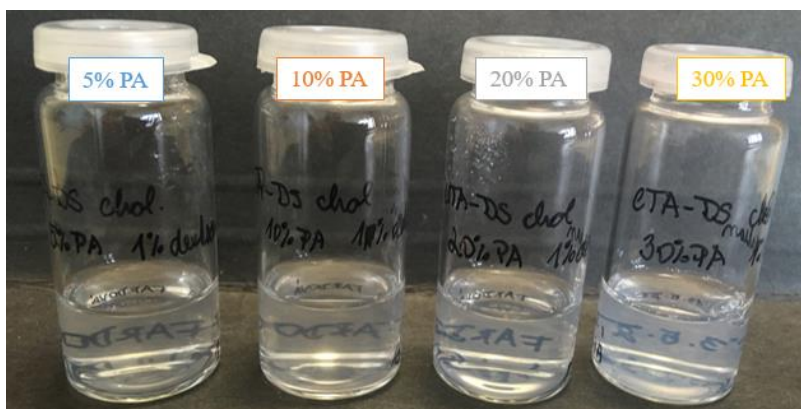
PA [mol. %]	Velikost [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
5	$324 \pm 46$	$0,428 \pm 0,032$	$41,6 \pm 7,0$
10	$236 \pm 6$	$0,329 \pm 0,038$	$45,0 \pm 9,6$
20	$331 \pm 4$	$0,279 \pm 0,015$	$43,9 \pm 2,6$
30	$323 \pm 5$	$0,282 \pm 0,014$	$45,8 \pm 1,9$

### 5.2.2 Záporně nabitě katanionické systémy s přidavkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl

Další koncentrací DEAE-Dx·HCl, která byla přidávána k připraveným systémům CTA-DS s cholesterolem a kyselinou fosfatidovou, byla 1 hm. %. Interakcí 1 hm. % DEAE-Dx·HCl s vezikuly vznikly roztoky, které byly méně zakalené než vzorky předešlé s přidavkem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl.

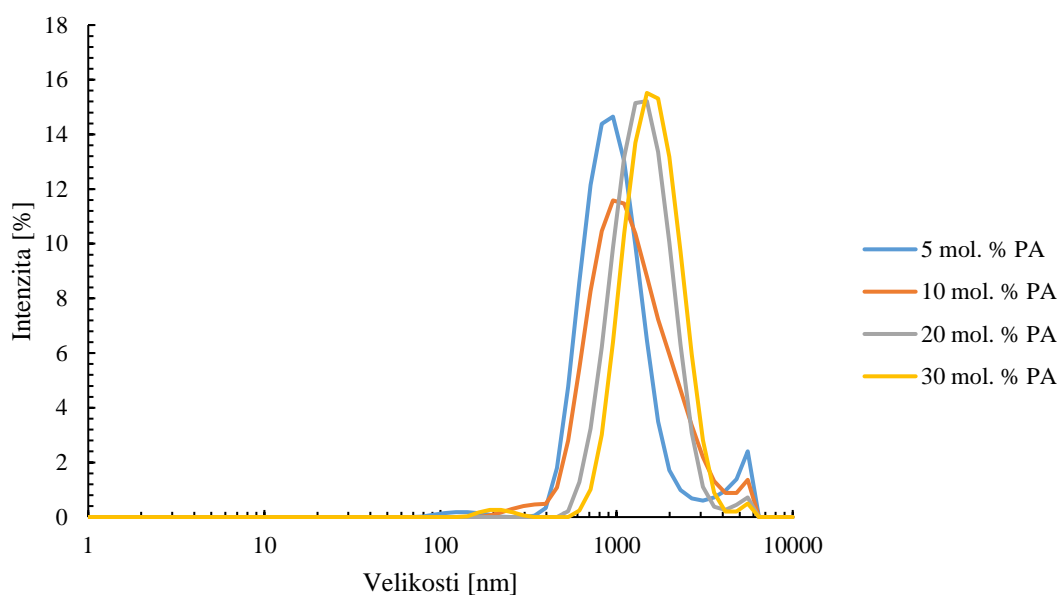
Roztoky obsahující 5, 10 a 20 mol. % PA byly opalescentní a neobsahovaly žádné částice viditelné okem, jen vzorek s obsahem 30 mol. % kyseliny fosfatidové byl jemně zakalený, jak je vidět na obr. 31.





Obr. 31: Systémy s cholesterolem, různou molární koncentrací PA a 1 hm. % DEAE-Dx·HCl

Pro potvrzení obalení vezikul polykationtem byla opět měřena velikost částic a zeta potenciál. V tomto případě bylo ověřeno, že DEAE-Dx·HCl byl navázán na záporně nabitě vezikuly, protože došlo k výraznému zvětšení velikosti systémů oproti vezikulám bez DEAE-Dx·HCl. Se zvyšující se koncentrací PA se zvyšovala i velikost částic (viz obr. 32 a tab. 3). Například u vezikul s obsahem 20 mol. % PA došlo ke zvětšení z původních ( $77 \pm 67$ ) nm na ( $1\ 204 \pm 128$ ) nm, zatímco ve vzorku s 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl se velikost částic pohybovala kolem ( $331 \pm 4$ ) nm.



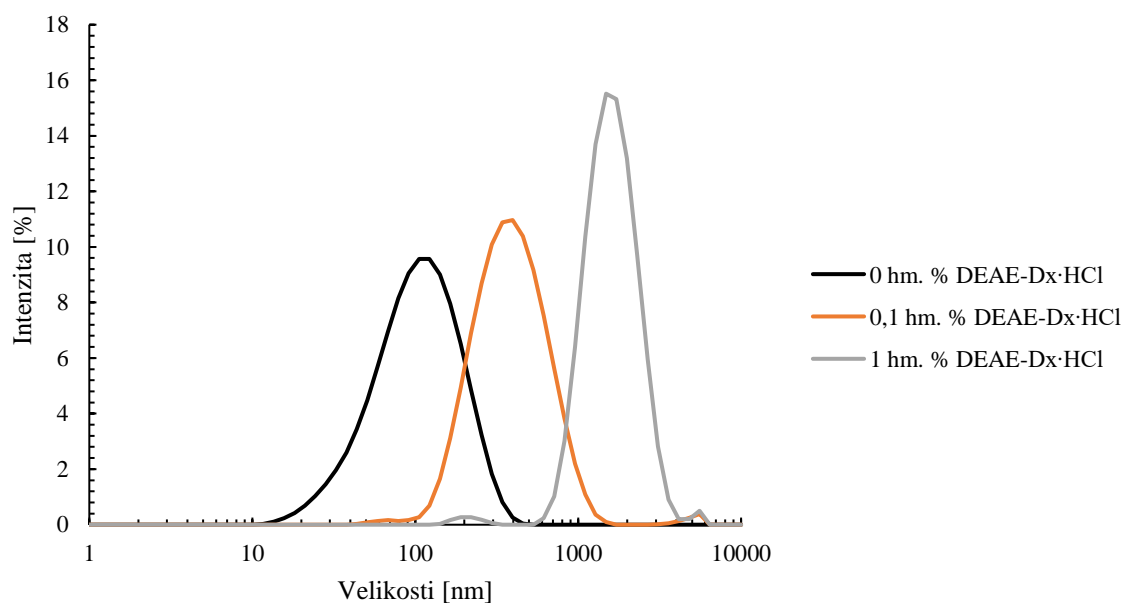
Obr. 32: Distribuce velikosti vezikulárních systémů CTA-DS s 43 mol. % cholesterolu, různou molární koncentrací PA a 1 hm. % DEAE-Dx·HCl

Největší hodnota velikosti částic ze všech vzorků byla ( $1\ 325 \pm 67$ ) nm u systému CTA-DS s 30 mol. % PA a přídatkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl. Částice mohou být takto velké díky většímu množství záporné látky a DEAE-Dx·HCl ve vzorku, takže se mohla vytvořit velká vrstva DEAE-Dx·HCl na vezikule. Druhou možností důvodu vzniku velkých vezikul mohla být situace, kdy se kvůli velkému obsahu řetězců DEAE-Dx·HCl nenavázaly všechny na vezikulu



a zůstaly v roztoku vzorku volně, působily mezi nimi odpudivé síly, což by odpovídalo i poklesu zeta potenciálu na rozdíl od vzorků s přidavkem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl.

Jak je vidět na *obr. 33*, velikost částic se s přidáváním hydrochloridu diethylaminoethyl-dextranu zvětšovala. Zároveň s posunutím distribuce velikosti částic k vyšším hodnotám lze pozorovat zúžení píku oproti nižším velikostem částic. Stejný nárůst velikosti částic byl pozorován i u ostatních připravených systémů s jiným přidavkem kyseliny fosfatidové (5, 10, 20 mol. %), což je vidět na obrázcích v *přílohyách*. Průměrně se velikost s přidavkem DEAE-Dx·HCl zvětšovala třikrát až čtyřikrát oproti původní velikosti. Částice ve vzorku s 30 mol. % PA bez DEAE-Dx·HCl měly velikost ( $86 \pm 6$ ) nm, s přidavkem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl ( $324 \pm 67$ ) nm a s přidavkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl ( $1\ 325 \pm 67$ ) nm.



*Obr. 33: Distribuce velikosti částic u vzorku s 30 mol. % PA a různým přidavkem DEAE-Dx·HCl*

Úspěšné obalení vezikul hydrochloridem diethylaminoethyl-dextranem bylo dokázáno i měřením zeta potenciálu, kdy se hodnoty ze záporných přesunuly do kladných a stabilních, jak je vidět v *tab. 3*. Velikost zeta potenciálu u systémů s přidavkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl byla menší než u vzorků s obsahem 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl, z toho plyne, že částice jsou méně stabilní, ale hodnoty se stále drží v hodnotách stabilních částic.

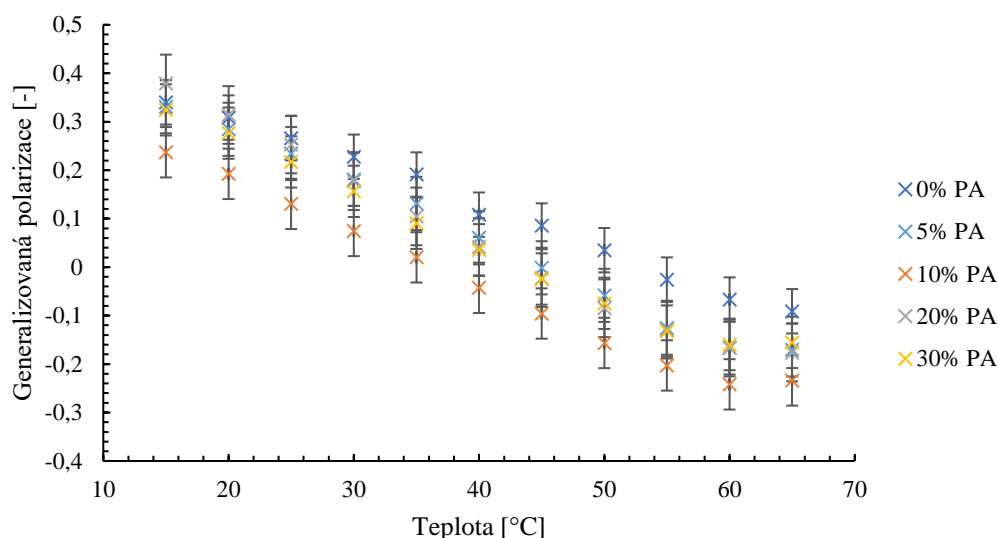
*Tab. 3: Přehled hodnot velikostí, PDI a ZP, při různém přidavku PA a 1 hm. % DEAE-Dx·HCl*

PA [mol. %]	Velikost [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
5	$948 \pm 156$	$0,383 \pm 0,033$	$31,5 \pm 7,0$
10	$1116 \pm 162$	$0,353 \pm 0,075$	$34,2 \pm 9,6$
20	$1204 \pm 128$	$0,282 \pm 0,067$	$34,3 \pm 2,6$
30	$1325 \pm 67$	$0,278 \pm 0,026$	$31,2 \pm 1,9$

### 5.3 Měření generalizované polarizace

Pro měření generalizované polarizace byla do systémů přidána sonda laurdan, která umožňuje zkoumání vnější části vezikulární dvojvrstvy. Naměřená data byla zpracována podle toho, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.2. Tvar závislosti generalizované polarizace na teplotě (viz *obr. 34*) představuje přechod membrány z uspořádané do neuspořádané fáze. Závislost

odpovídá postupně klesajícímu charakteru, kdy vysoké hodnoty GP znamenají, že je systém uspořádaný (voda je uspořádaná a méně mobilní), kdežto nízké hodnoty GP znamenají neuspořádanost membrány (mobilní molekuly vody).



Obr. 34: Závislost generalizované polarizace na teplotě pro vzorky bez DEAE-Dx·HCl

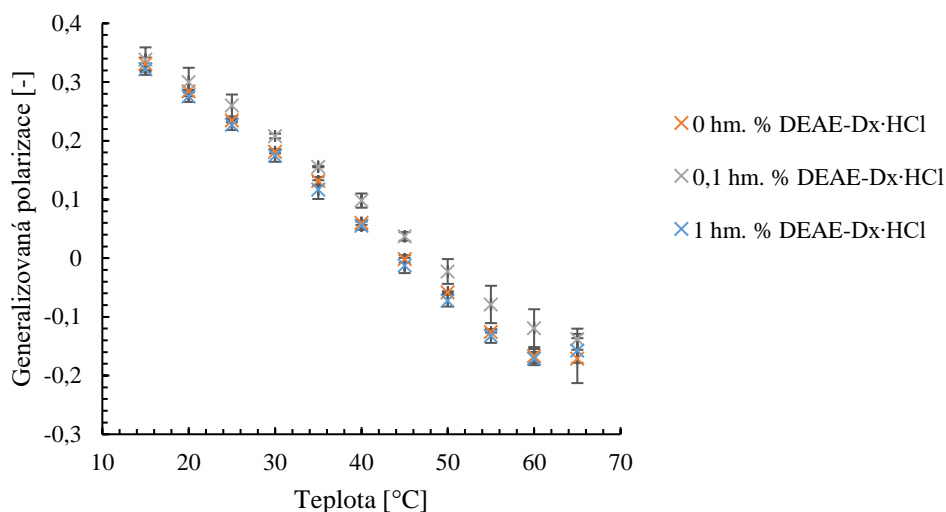
Teoretická křivka pro 0 mol. % PA je nejméně zakřivená oproti křivkám s přidavkem PA. Takový tvar je způsobený tím, že přidavek x mol. % PA vedl ke snížení molárních procent cholesterolu. S přidáváním cholesterolu se její tvar vyrovnává a roztok s 0 mol. % PA obsahuje největší množství cholesterolu [71]. V tab. 4 jsou uvedeny přepočítané hodnoty mol. % cholesterolu po přidavku kyseliny fosfatidové. Kromě výše popsaného vlivu mohly být hodnoty generalizované polarizace ovlivněny samotnou přítomností PA. Kyselina fosfatidová má poměrně malou hydrofilní hlavu (vůči hydrofobní části) a není schopna těsné vazby v povrchové vrstvě vezikul. Molekuly vody se v tomto případě chovají jako „spacery“, které zajišťují těsnou vazbu mezi fosfolipidy [72]. Díky tomuto efektu mohla být GP, která reaguje na mobilitu molekul vody, ovlivněna i přidavkem PA [73].

Tab. 4: Snížení obsahu cholesterolu (mol. %) po přidavku PA

Přídavek PA [mol. %]	Obsah cholesterolu po přidavku PA [mol. %]
0	43
5	42
10	41
20	38
30	34

Měřením bylo zjištěno, že na výslednou hodnotu generalizované polarizace má vliv jak obsah cholesterolu v systémech, tak kyselina fosfatidová a DEAE-Dx·HCl. Inkorporace cholesterolu do vezikul má vliv na pevnost systémů. Na uvedeném obrázku (obr. 35) s výsledkem měření vzorku s 5 mol. % PA je vidět, že hodnoty GP u různých přidavků DEAE-Dx·HCl splývají dohromady a není zde tedy možno říct, že by GP reagovala na přidavek

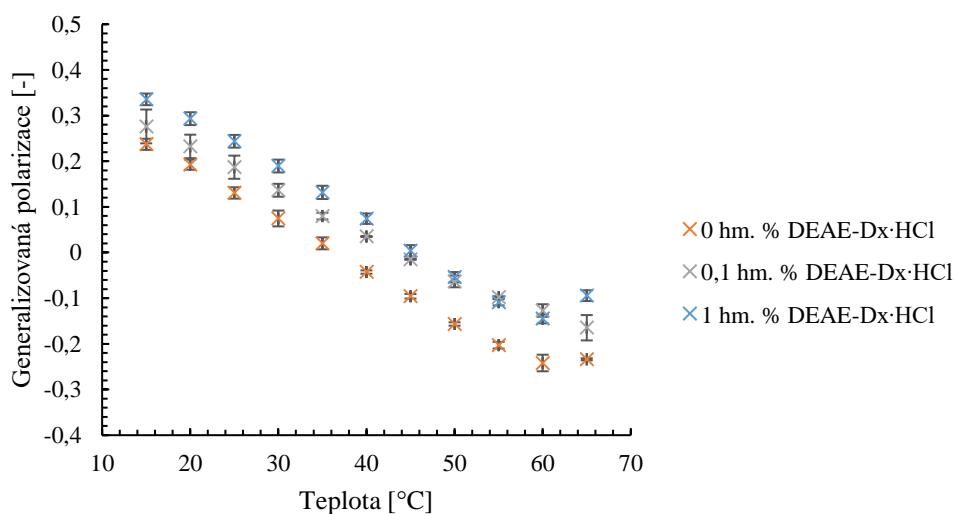
DEAE-Dx·HCl. Důvodem může být menší hustota záporného náboje a tím menší interakce s polykationtem.



Obr. 35: Závislost generalizované polarizace na teplotě u vzorku s cholesterolem, 5 mol. % PA a DEAE-Dx·HCl

Generalizovaná polarizace se s uspořádáním systému zvyšuje [70]. Bylo ověřeno, že u vzorků obsahujících vyšší koncentraci PA než je 5 mol. % přídavek DEAE-Dx·HCl ovlivňuje hodnotu GP a tedy uspořádanost membrány.

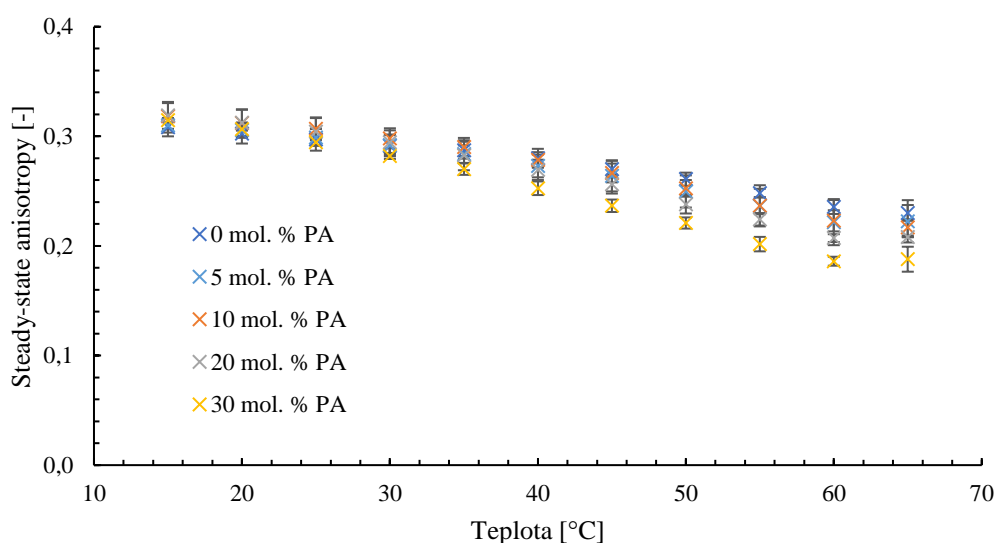
U systémů, které obsahovaly 10, 20 a 30 mol. % PA byl vliv DEAE-Dx·HCl podobný. Přídavkem DEAE-Dx·HCl se zvyšovala hodnota GP (viz obr. 36), takže vzniklé částice byly více uspořádané a pevnější. DEAE-Dx·HCl mohlo mít vliv na uspořádání částic z toho důvodu, že je to hydrofilní polymer, který je schopen uspořádat vodu na svém povrchu a snížit tak její mobilitu. Pokud došlo k ovlivnění mobility vody v blízkosti membrán, může to znamenat i částečné vmezení polymeru do fosfolipidové dvojvrstvy.



Obr. 36: Závislost generalizované polarizace na teplotě u vzorku s cholesterolem, 10 mol. % PA a DEAE-Dx·HCl

## 5.4 Měření anizotropie

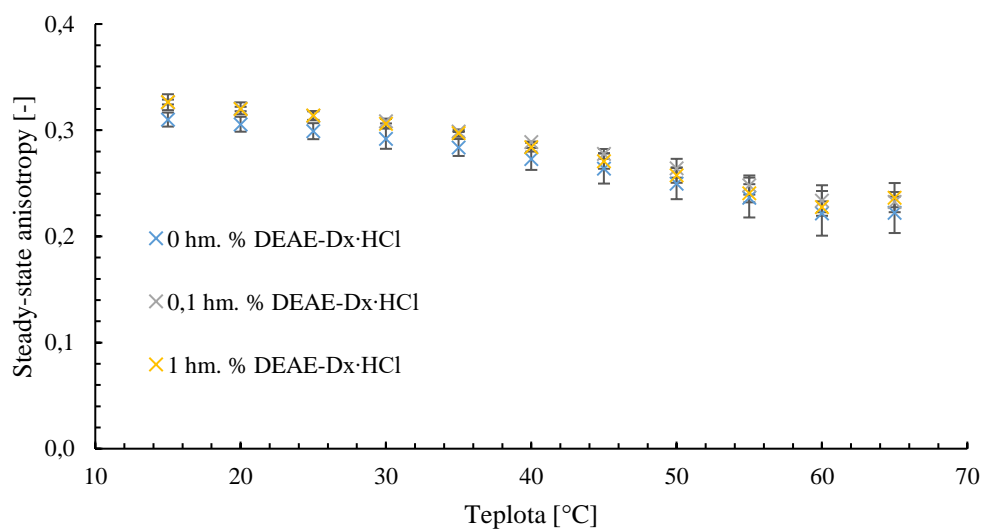
K měření anizotropie byla do roztoků vzorků přidána sonda DPH. Oproti laurdanu nezůstává DPH jen na povrchu membrán, ale začleňuje se dovnitř. Po zpracování naměřených dat byly vytvořeny závislosti anizotropie na teplotě. Obecně se hodnota anizotropie s vyšší teplotou snižuje a zároveň klesá tuhost membrány. Vyšší teplota způsobuje větší pohyblivost i flexibilitu hydrofobních ocasů [73]. U nižších teplot je vidět malý nebo téměř žádný rozdíl hodnot anizotropie, s rostoucí teplotou se rozdíly zvětšují. Na *obr. 37* je získaná závislost pro vzorky, které neobsahovaly DEAE-Dx·HCl. Začlenění kyseliny fosfatidové vede ke změně tuhosti membrány, čím více je PA, tím klesá tuhost i anizotropie. U křivky odpovídající vzorku s 0 mol. % kyseliny fosfatidové je viditelný mírně rovnější tvar, především v oblasti vyšších teplot, a to z toho důvodu, že vzorek obsahuje největší množství cholesterolu oproti vzorkům s PA, kde je menší molární koncentrace cholesterolu (viz *tab. 4*).



*Obr. 37: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky bez DEAE-Dx·HCl*

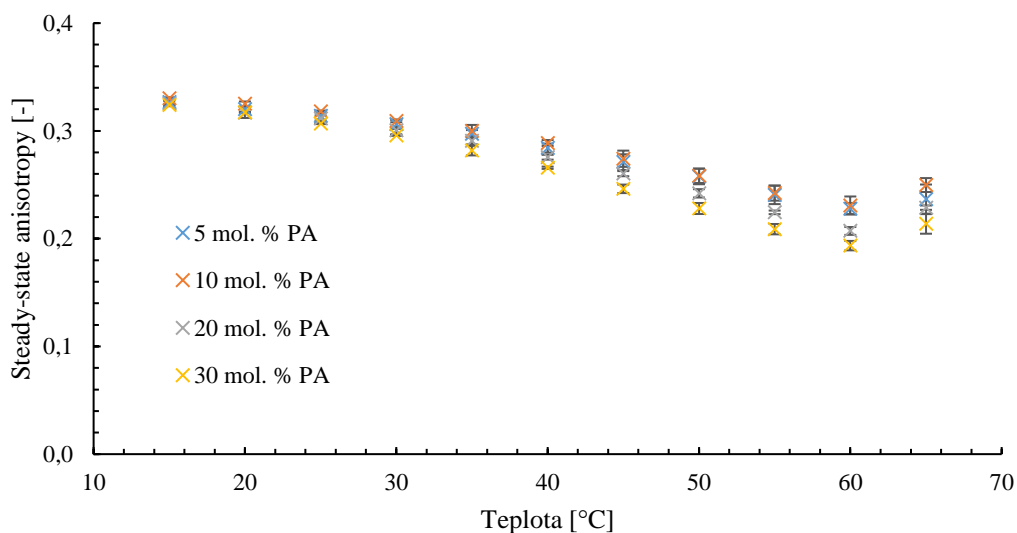
Dalším možným vysvětlením změny mikroviskozity membrány, která je zkoumána sondou DPH [71] je fakt, že kyselina fosfatidová obsahuje hydrofobní konce kratší než CTAB (12 uhlíků) a právě tyto hydrofobní konce mohou ovlivnit tuhost membrány [73].

Na *obr. 38* je závislost pro roztoky s přidavkem 5 mol. % PA. Křivky vypadají velmi podobně jak pro vzorky bez DEAE-Dx·HCl, tak s DEAE-Dx·HCl, čímž se potvrzuje minimální nebo žádný vliv přidavku DEAE-Dx·HCl na vnitřní vlastnosti membrán. Zároveň nebyla pozorována žádná odchylka hodnot anizotropie při nižších teplotách. Hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran je přitahován pouze na povrch vezikuly, neměl by mít tak vliv na fluiditu vnitřní části membrány, ovšem může nastat situace, že by se DEAE-Dx·HCl vnořil lehce i do membrány, což ale nebylo při měření nijak ověřeno ani zjištěno.



Obr. 38: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 5 mol. % PA

U skupiny vzorků s přidavkem 1 hm. % DEAE-Dx·HCl byla závislost anizotropie na teplotě znova podobná jako u vzorků předešlých (0 a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl), až na to, že při tomto měření nebyly rozdíly v hodnotách anizotropie u nižších teplot vůbec žádné a u vyšších byly menší (viz obr. 39) než u předešlých vzorků.



Obr. 39: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 1 hm. % DEAE-Dx·HCl

## 6 ZÁVĚR

Jedním z cílů této bakalářské práce byla rešerše na přípravu komplexů obsahujících polykationt a záporně nabitý vezikulární systém s přihlédnutím na problematiku iontových amfifilních párů. Dalším cílem byla příprava záporně nabitého systému CTA-DS a jeho následná interakce s polykationtem hydrochloridem diethylaminoethyl-dextranem. Fyzikálně-chemická charakterizace připravených systémů byla provedena měřením velikosti částic, velikosti zeta potenciálu, generalizované polarizace a anizotropie. Všechny tyto vymezené cíle práce byly splněny.

Základem byla příprava katanionického vezikulárního systému CTA-DS z amfifilních párů. Amfifilní pár je složen z látky kladné a záporné, v případě této práce byla použita záporná látka dodecylsírán sodný a kladná látka byla cetyltrimethylamonium bromid. Systémy byly velmi nestabilní, takže před interakcí s polykationtem musely být stabilizovány.

Stabilizace byla provedena jak inter-vezikulární, tak intra-vezikulární. Začleněním cholesterolu do membrány byla zajištěna intra-vezikulární stabilizace. O inter-vezikulární stabilizaci se postarala kyselina fosfatidová, která má záporný náboj, a celý systém se díky ní stal tedy záporným. Záporný náboj připravených systémů CTA-DS byl důležitý, protože umožnil interakci s polykationtem, kterým byl hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran, ten má velké lékařské i farmaceutické využití.

K systémům CTA-DS se přidávalo různé množství kyseliny fosfatidové, konkrétně 5, 10, 20 a 30 mol. %. Koncentrace cholesterolu ve vzorcích bez PA byla zvolena na 43 mol. %, ale v roztocích s PA se snižovala, protože přidávkem kyseliny fosfatidové se molární koncentrace cholesterolu snižovala. Polykationt DEAE-Dx·HCl byl přidán v množství 0,1 a 1 hm. %.

Přidávkem kyseliny fosfatidové došlo ke zvýšení elektrostatických odpudivých sil, stabilizaci systémů a tím k jejich zmenšení oproti systémům bez PA. Při přidávku 5 mol. % PA se velikost částic zmenšila, ale ne o tolik jako při přidávku 10 mol. % PA. Přidávkem 10, 20, 30 mol. % PA se velikost částic výrazně snížila. Hodnota zeta potenciálu se pohybovala v záporné, stabilní oblasti a se zvětšujícím se obsahem PA klesal.

Po přidávku 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl byl potvrzen vznik částic zvětšením velikosti, změnou zeta potenciálu a posunem distribuce. Systémy s 5 mol. % PA byly větší než s přidávkem 10 mol. % PA, pak u vyšších koncentracích se částice opět oproti vzorku s 10 mol. % PA zvětšily. Mezi velikostmi systémů s přidávkem 20 a 30 mol. % PA nebyl významný rozdíl. Ve všech případech bylo ověřeno obalení vezikul polykationtem, protože zeta potenciál se přesunul z hodnot záporných do kladných a opět byly všechny velikosti ZP ve stabilní oblasti. Celkově nejvyšší hodnota zeta potenciálu byla naměřena u systému CTA-DS s 30 mol. % PA a 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl, jehož hodnota byla  $(45,8 \pm 1,9)$  mV, vezikuly měly hustší záporný náboj a mohla se navázat velká vrstva DEAE-Dx·HCl. Největší částice byly změřeny ve vzorku s přidávkem 30 mol. % PA a 1 hm. % DEAE-Dx·HCl, a to  $(1\,325 \pm 67)$  nm, kdy se buď vytvořila velká vrstva DEAE-Dx·HCl nebo se nenavázaly veškeré řetězce a zůstaly v roztoku, což by odpovídalo nižšímu, ale stále stabilnímu zeta potenciálu.

Generalizovaná polarizace a anizotropie byly měřeny především pro získání informací o tekutosti membrán. Před měřením GP a anizotropie byly do systémů přidány sondy, protože

vzorky samy o sobě nemají schopnost fluorescence. Sondou pro měření GP byl laurdan, ten se váže na povrch membrány a poskytuje tak o něm informace. Druhou sondou byl DPH, který se váže přímo do prostoru membrány, čímž může být zjištěna vnitřní fluidita membrány.

Z měření generalizované polarizace byly sestaveny závislosti GP na teplotě, které představovaly přechod z uspořádané do neuspořádané fáze, zakřivení této závislosti je ovlivněno množstvím cholesterolu, s cholesterolem se vyrovnává. Hodnota GP u vzorků s 5 mol. % PA a různém přídavku DEAE-Dx·HCl splývá dohromady a neroste. U vzorků s 0,1 nebo 1 hm. % DEAE-Dx·HCl se zvyšující koncentrace PA projevovala zvýšením GP. U takových vzorků se snižovala pohyblivost vody v okolí systémů a ty se staly uspořádanější, to bylo způsobeno vlivem hydrofilního polykationtu DEAE-Dx·HCl, který je schopen uspořádat vodu na svém povrchu.

Po měření anizotropie byly sestrojeny grafy závislosti anizotropie na teplotě, kde hodnoty anizotropie s rostoucí teplotou klesaly. Zakřivení křivky bylo ovlivněno množstvím cholesterolu stejně jako u GP. Hodnota anizotropie v oblasti nižších teplot hodně splývala dohromady, větší rozdíly byly viditelné až při posunu k vyšším teplotám. Při přídavku PA klesala tuhost i anizotropie, naopak přídavek DEAE-Dx·HCl nijak výrazně neovlivnil hodnotu anizotropie při různých koncentracích PA, protože DEAE-Dx·HCl se váže na povrch vezikul, takže neovlivnil fluiditu vnitřní části membrány.

Tato bakalářská práce byla jen malým krokem ve zkoumání záporných vezikulárních systémů z amfifilních párů a jejich interakce s polykationty. Jde o oblast stále málo prozkoumanou a systémy by se určitě mohly zkoušet připravit i z jiných amfifilních párů popř. interakce s jiným polykationtem. Dalším krokem by mohla být inkorporace látek do vezikul. Připravené systémy by mohly být vhodné jako nosiče léčiv a obecně mohou nahrazovat dražší liposomy.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy a detergenty dnes: Chem.Listy* 93. 1999, s. 421-427.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [3] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0436-X.
- [4] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [5] Slabé vazebné interakce. *Obecná chemie* [online]. Brno: Katedra fyziky, chemie a odborného vzdělávání, Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, 2018 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna\\_chemie/web/pages/16-slabe-vazebne-interakce.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna_chemie/web/pages/16-slabe-vazebne-interakce.html)
- [6] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. 2005, 21(14), 6179-6184 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la047207g>
- [7] Sodium dodecyl sulfate. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Bethesda, USA: National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine, 2005 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate>
- [8] Hansapon FAS 1214 G. *ENASPOL* [online]. Rtně nad Bílinou: Enaspol, - [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <https://www.enaspol.cz/eshop-hansapon-fas-1214-g.html>
- [9] Cetrimonium bromid. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. Bethesda, USA: National Library of Medicine, 2004 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cetrimonium-bromide>
- [10] Karta bezpečnostních údajů. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2020-05-012]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SK&language=s&k&productNumber=H9151&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fh9151%3Flang%3Den>
- [11] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [12] SOLARO, Roberto, Federica CHIELLINI a Antonella BATTISTI. Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. *Materials* [online]. 2010, 3(3), 1928-1980 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.3390/ma3031928. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1928>
- [13] Hydrofobní interakce (vazba). *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Praha: Integrovaný systém elektronických studijních opor VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/hesla/hydrofobni\\_interakce.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/hydrofobni_interakce.html)
- [14] DOKTOROVA, Milka, Frederick A. HEBERLE, Barbara EICHER, Robert F. STANDAERT, John KATSARAS, Erwin LONDON, Georg PABST a Drew MARQUARDT. Preparation of asymmetric phospholipid vesicles for use as cell membrane models. *Nature Protocols* [online]. 2018, 13(9), 2086-2101 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1038/s41596-018-0033-6. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41596-018-0033-6>
- [15] KRAFT, John C., Jennifer P. FREELING, Ziyao. WANG a Rodney J.Y. HO. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 103(1), 29-52 [cit. 2020-05-02].



- DOI: 10.1002/jps.23773. ISSN 00223549. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915307814>
- [16] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, 59 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1516-8913.
- [17] HADAŠOVÁ, Eva. Liposomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, 16(4), 433–437 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekoveformy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [18] WAGNER, Andreas a Karola VORAUER-UHL. Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, 2011, 1-9 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1155/2011/591325. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/591325/>
- [19] WALDE, Peter a Sosaku ICHIKAWA. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering* [online]. 2001, 18(4), 143-177 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00088-0. ISSN 13890344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034401000880>
- [20] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, 8(1) [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [21] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, 292(3), 589-597 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-013-3104-9>
- [22] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG. Recent Strategies in the Development of Catanionic Vesicles. *Journal of Oleo Science* [online]. 2016, 65(5), 377-384 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.5650/jos.ess15249. ISSN 1345-8957. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/65/5/65\\_ess15249/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/65/5/65_ess15249/_article)
- [23] LEE, Chen-Hsuan, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhancing physical stability of positively charged catanionic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, 292(10), 2519-2527 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1007/s00396-014-3285-x. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-014-3285-x>
- [24] Transfekce. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, 1998 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/adcc>
- [25] TAH, Bidisha, Prabir PAL, Mrityunjoy MAHATO a G. B. TALAPATRA. Aggregation Behavior of SDS/CTAB Catanionic Surfactant Mixture in Aqueous Solution and at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, 115(26), 8493-8499 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1021/jp202578s. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp202578s>
- [26] TIEN, Wu-jhao, Kun-you CHEN, Fong-yin HUANG a Chi-cheng CHIU. Effects of Cholesterol on Water Permittivity of Biomimetic Ion Pair Amphiphile Bilayers: Interplay between Membrane Bending and Molecular Packing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(13). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20133252
- [27] TANGUY, Emeline, Qili WANG, Hervé MOINE a Nicolas VITALE. Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2019, 13 [cit. 2020-11-19]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2019.00002

- [28] An ever-growing role for a tiny lipid. *ASBMB TODAY: The member magazine of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology* [online]. [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://www.asbmb.org/asbmb-today/science/060119/role-for-a-tiny-lipid>
- [29] KOOIJMAN, Edgar E., Vladimir CHUPIN, Ben DE KRUIJFF a Koert N. J. BURGER. Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. *Traffic* [online]. 2003, 4(3), 162-174 [cit. 2020-11-19]. ISSN 13989219. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x
- [30] Cholesterol. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, 1998 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/cholesterol>
- [31] Cholesterol. *WikiSkripta* [online]. Příspěvatelé WikiSkript [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Cholesterol>
- [32] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2018, 92, 29-35 [cit. 2020-11-19]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [33] BUDD, Peter M. Polyelectrolytes. *Comprehensive Polymer Science and Supplements* [online]. Elsevier, 1989, 1989, , 215-230 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/B978-0-08-096701-1.00011-2. ISBN 9780080967011. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080967011000112>
- [34] *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2000, 12(5) [cit. 2020-05-02]. ISSN 09550674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067400001356>
- [35] STUART, Martien Cohen, Renko DE VRIES a Hans LYKLEMA. Polyelectrolytes. *Soft Colloids* [online]. Elsevier, 2005, 2005, , 2.1-2.84 [cit. 2020-05-02]. Fundamentals of Interface and Colloid Science. DOI: 10.1016/S1874-5679(05)80006-6. ISBN 9780124605305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874567905800066>
- [36] DAUTZENBERG, Herbert, Werner JAEGER, Joachim KÖTZ, Burkart PHILIPP, Christian SEIDEL a Dorothea STSCHERBINA. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application* [online]. 1994 [cit. 2020-05-02]. DOI: 1569901279.
- [37] RIGHETTI, Pier. *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Application, Volume 11* [online]. 1. New York: Elsevier Science, 1983 [cit. 2020-05-02]. ISBN 9780080858807.
- [38] Dextran. *Wikipedie* [online]. Wikipedie: Otevřená encyklopedie [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: <https://cs.qaz.wiki/wiki/Dextran>
- [39] HUANG, Shiyu a Gangliang HUANG. Design and application of dextran carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, 55 [cit. 2020-11-19]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2019.101392
- [40] NEELY, W. Brock. *Dextran: Structure and Synthesis* [online]. Elsevier, 1961, 1961, , 341-369 [cit. 2020-11-19]. Advances in Carbohydrate Chemistry. ISBN 9780120072156. Dostupné z: doi:10.1016/S0096-5332(08)60191-5
- [41] KALINA, Michal, Andrea KARGEROVÁ a Miloslav PEKAŘ. DEAE-dextran hydrochloride behaviour in aqueous solution—The effect of ionic strength and concentration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, 220, 163-169 [cit. 2020-11-19]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.05.070
- [42] DEAE-DEXTRAN. *Chemical Book* [online]. 2017 [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_cb8115669.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb8115669.htm)
- [43] DEAE-dextran, chloride form. MP Biomedicals [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://eu.mpbio.com/0219513310-deae-dextran-chloride-form-cf?SID=47f2ng94theo33lera9igi00t3>

- [44] ANTUNES, Filipe E., Eduardo F. MARQUES, Ricardo GOMES, Krister THURESSON, Björn LINDMAN a Maria G. MIGUEL. Network Formation of Catanionic Vesicles and Oppositely Charged Polyelectrolytes. Effect of Polymer Charge Density and Hydrophobic Modification. *Langmuir* [online]. 2004, 20(11), 4647-4656 [cit. 2020-11-23]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la049783i
- [45] Filipe E. Antunes, Rodrigo O. Brito, Eduardo F. Marques, Bjo1rn Lindman, a Maria Miguel. Mechanisms behind the Faceting of Catanionic Vesicles by Polycations: Chain Crystallization and Segregation. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 116-123 [cit. 2020-11-23]. Dostupné z: doi:10.1021/jp063994+
- [46] *Journal of Controlled Release* [online]. 235. 2016 [cit. 2021-02-16]. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>
- [47] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, 8(4), 409-427 [cit. 2021-02-16]. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- [48] FALKE, Sven a Christian BETZEL. Dynamic Light Scattering (DLS). *Radiation in Bioanalysis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-09-22, , 173-193 [cit. 2021-02-16]. Bioanalysis. ISBN 978-3-030-28246-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-28247-9\_6
- [49] PATE, K. a P. SAFIER. Chemical metrology methods for CMP quality. *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)* [online]. Elsevier, 2016, 2016, , 299-325 [cit. 2021-02-16]. ISBN 9780081001653. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7
- [50] What is Fluorescence Spectroscopy? *HORIBA* [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: [https://www.horiba.com/en\\_en/technology/measurement-and-control-techniques/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy/](https://www.horiba.com/en_en/technology/measurement-and-control-techniques/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy/)
- [51] Fluorescence Spectroscopy. *Jasco* [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://jascoinc.com/learning-center/theory-of-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/>
- [52] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [53] GIJSBERS, Abril, Takuya NISHIGAKI a Nuria SÁNCHEZ-PUIG. Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Protein-protein Interactions. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2016, (116) [cit. 2021-02-16]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/54640
- [54] DO CANTO, António M.T.M., João R. ROBALO, Patrícia D. SANTOS, Alfredo J. Palace CARVALHO, J.P. Prates RAMALHO a Luís M.S. LOURA. Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2016, 1858(11), 2647-2661 [cit. 2021-02-16]. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2016.07.013
- [55] KAISER, Robert D. a Erwin LONDON. Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth †. *Biochemistry* [online]. 1998, 37(22), 8180-8190 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi980064a</div></div>
- [56] YU, W., P.T. SO, T. FRENCH a E. GRATTON. Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophysical Journal* [online]. 1996, 70(2), 626-636 [cit. 2021-02-16]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(96)79646-7
- [57] PARASASSI, Tiziana, Ewa K. KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. *Journal of Fluorescence* [online]. 8(4), 365-373 [cit. 2021-02-16]. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020528716621

- [58] VILLASMIL-SÁNCHEZ, Sheila, Wijdane DRHIMEUR, Sirce Cecilia Salas OSPINO, Antonio M. RABASCO ALVAREZ a M.L. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2009, 36(6), 666-675 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639040903419640
- [59] BANA, Laura, Stefania MINNITI, Elisa SALVATI, et al. Liposomes bi-functionalized with phosphatidic acid and an ApoE-derived peptide affect A $\beta$  aggregation features and cross the blood-brain-barrier: Implications for therapy of Alzheimer disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2014, 10(7), 1583-1590 [cit. 2021-02-23]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2013.12.001
- [60] DUAN, Yin, Lihui WEI, Julia PETRYK a Terrence RUDDY. Formulation, characterization and tissue distribution of a novel pH-sensitive long-circulating liposome-based theranostic suitable for molecular imaging and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016, 11, 5697-5708 [cit. 2021-02-16]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S111274
- [61] YOTSUMOTO, Satoshi, Terutaka KAKIUCHI a Yukihiko ARAMAKI. Enhancement of IFN- $\gamma$  production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. *Vaccine* [online]. 2007, 25(29), 5256-5262 [cit. 2021-02-23]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2007.05.037
- [62] IVASHKOV, Oleg V., Andrey V. SYBACHIN, Anna A. EFIMOVA, Dmitry V. PERGUSHOV, Viktor N. ORLOV, Holger SCHMALZ a Alexander A. YAROSLAVOV. The Influence of the Chain Length of Polycations on their Complexation with Anionic Liposomes. *ChemPhysChem* [online]. 2015, 16(13), 2849-2853 [cit. 2021-02-16]. ISSN 14394235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201500474
- [63] CHUN, Ji-Yeon, Mi-Jung CHOI, Sang-Gi MIN a Jochen WEISS. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids* [online]. 2013, 30(1), 249-257 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.05.024
- [64] MENON, Premanarayani, Teo YIN YIN a Misni MISRAN. Preparation and characterization of liposomes coated with DEAE-Dextran. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, 481, 345-350 [cit. 2021-02-16]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2015.05.036
- [65] QIANG, Mengdan, Xiao PANG, Dexue MA, Cuicui MA a Fuguo LIU. Effect of Membrane Surface Modification Using Chitosan Hydrochloride and Lactoferrin on the Properties of Astaxanthin-Loaded Liposomes. *Molecules* [online]. 2020, 25(3) [cit. 2021-02-16]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25030610
- [66] HUANG, Zheng-Lin, Jhen-Yi HONG, Chien-Hsiang CHANG a Yu-Min YANG. Gelation of Charged Catanionic Vesicles Prepared by a Semispontaneous Process. *Langmuir* [online]. 2010, 26(4), 2374-2382 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la902798n
- [67] OptiXs: Lasery a přístrojová technika. <https://www.optixs.cz/spektrometry-29k/fluorimetry-54k/fs5-spektrofluorimetr-48p> [online]. [cit. 2021-6-29]. Dostupné z: <https://www.optixs.cz/spektrometry-29k/fluorimetry-54k/fs5-spektrofluorimetr-48p>
- [68] 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 catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, 607 [cit. 2021-7-9]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526

- [69] ZARU, Marco, Spyridon MOURTAS, Pavlos KLEPETSANIS, Anna Maria FADDA a Sophia G. ANTIMISIARIS. Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2007, 67(3), 655-666 [cit. 2021-7-12]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2007.04.005
- [70] REPOVÁ, Romana. Studium interakce záporně nabitých vezikulárních systémů s polykationty [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/191049>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.
- [71] 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* [online]. 2021, 37(7), 2436-2444 [cit. 2021-7-11]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c03504
- [72] ZOLESE, Giovanna, Enrico GRATTON a Giovanna CURATOLA. Phosphatidic acid affects structural organization of phosphatidylcholine liposomes. A study of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenyl,1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) fluorescence decay using distributional analysis. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 1990, 55(1), 29-39 [cit. 2021-7-13]. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(90)90146-I
- [73] SZABOVÁ, Jana, Ondřej MIŠÍK, Martina HAVLÍKOVÁ, František LÍZAL a Filip MRAVEC. Influence of liposomes composition on their stability during the nebulization process by vibrating mesh nebulizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, 204 [cit. 2021-7-9]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111793

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SDS	dodecylsírán sodný
DEAE-Dx·HCl	hydrochlorid diethylaminoethyl-dextran
PA	kyselina fosfatidová
PAL	povrchově aktivní látka
CTA-DS	katanionický vezikulární systém z CTAB a SDS
GAČR	Grantová agentura České republiky
tzv.	tak zvaně
obr.	obrázek
popř.	popřípadě
CMC	kritická micelární koncentrace
SLS	larylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
HTMAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyseliny
SUV	malé unilamelární vezikuly
LUV	velké unilamelární vezikuly
OLV	velké oligolamelární vezikuly
MLV	velké multilamelární vezikuly
MVV	multivezikulární vezikuly
nm	nanometr
IPA	IPA ion pair amphiphiles
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku
DLS	dynamický rozptyl světla
PCS	fotonová korelační spektroskopie
ZP	zeta potenciál
mV	milivolt
S <sub>0</sub>	základní singletový stav
S <sub>1</sub>	excitovaný singletový stav
S <sub>2</sub>	excitovaný singletový stav
T <sub>1</sub>	tripletový excitovaný stav
s	sekunda
ns	nanosekunda
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
GP	generalizovaná polarizace
Ap	amyloid-β peptid
ApoE	apolipoprotein
HS	fosfatidylcholin

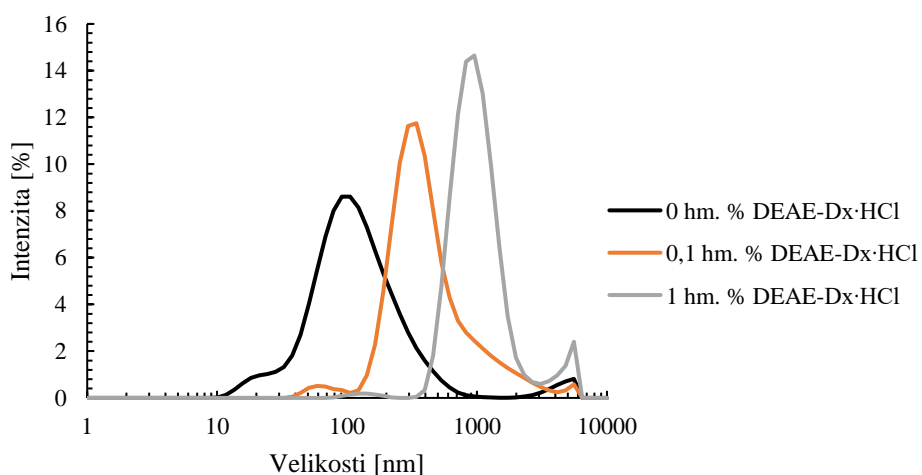
CHEM	cholesteryl hemisukcinát
PEG	polyethylenglykol
PS	fosfatidylserin
PVPQ	2-vinylpyridin
CL <sup>2-</sup>	kardiolipinu
EL	vaječný lecitin
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
DEAE-Dx	diethylaminoethyl dextran
CH	chitosan hydrochlorid
LF	laktoferin
DTMA-DS	dodecyltrimethylamonium-dodecylsulfát
DTMAB	dodecyltrimethylamonium bromid
mmol·dm <sup>-3</sup>	milimol na decimetr krychlový
mol·dm <sup>-3</sup>	mol na decimetr krychlový
h	hodina
ml	mililitr
mg/ml	miligram na mililitr
kJ	kilojoule
mol. %	molární procenta
hm. %	hmotnostní procenta
s	sekunda
tab.	tabulka
PDI	polydisperzní index

## 8.2 Seznam symbolů

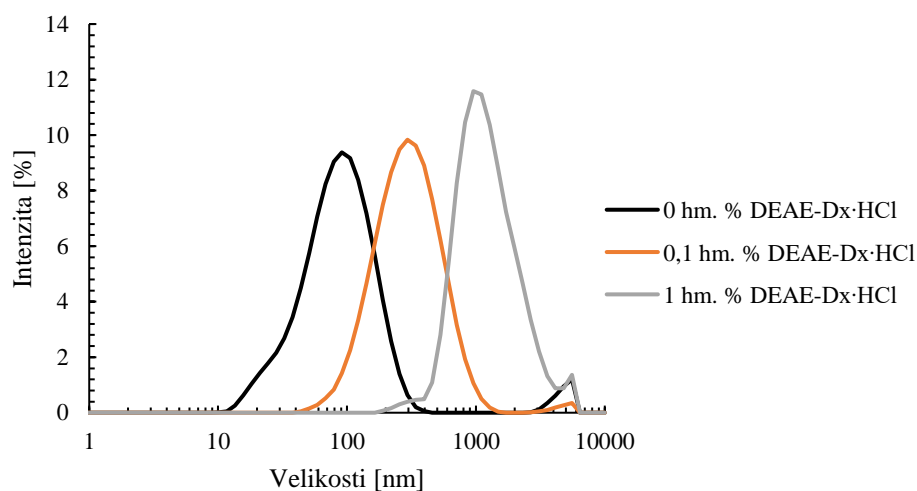
Symbol	Název veličiny
$P_c$	kritický sbalovací parametr
$v$	objem
$l_c'$	délka hydrofobního řetězce
$a_0$	plocha hydrofilní skupiny
$P$	polarizace
$r$	anizotropie
$I_{VV}$	vertikální intenzita fluorescence
$I_{VH}$	horizontální intenzita fluorescence
$I_b$	intenzita GP v modré oblasti
$I_r$	intenzita GP v modré oblasti
$\eta$	viskozita rozpouštědla
$r_h$	hydrodynamický poloměr
$T$	teplota
$D$	translační difuzní konstanta
$k_B$	Boltzmanova konstanta
$\pi$	matematická konstanta
°C	stupeň Celsia

## 9 PŘÍLOHY

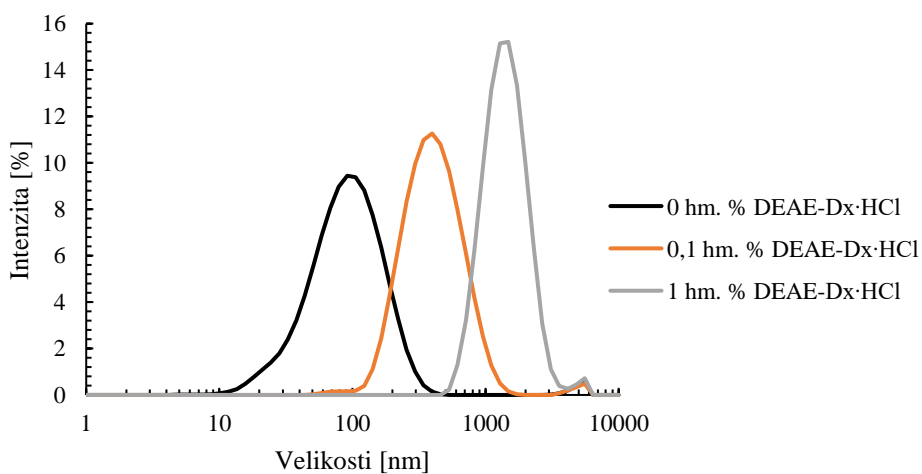
### 9.1 Distribuce velikosti částic



Obr. 40: Distribuce velikosti částic u vzorku s 5 mol. % PA a různým přidavkem DEAE-Dx·HCl



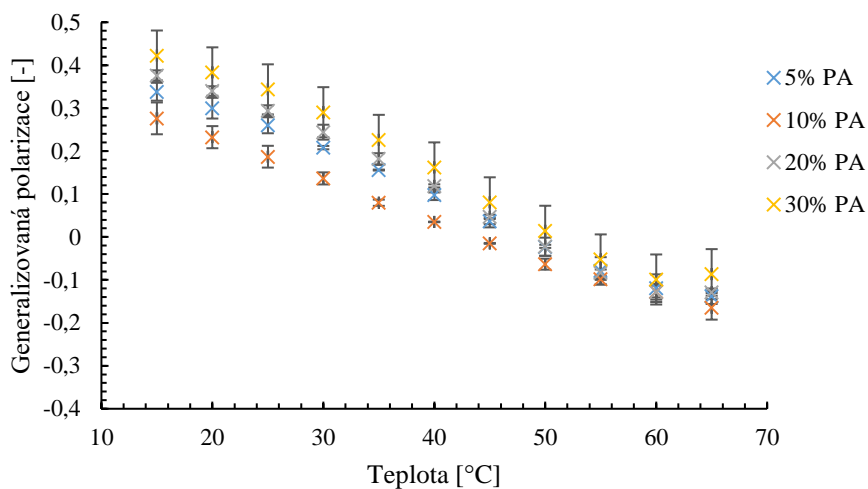
Obr. 41: Distribuce velikosti částic u vzorku s 10 mol. % PA a různým přidavkem DEAE-Dx·HCl



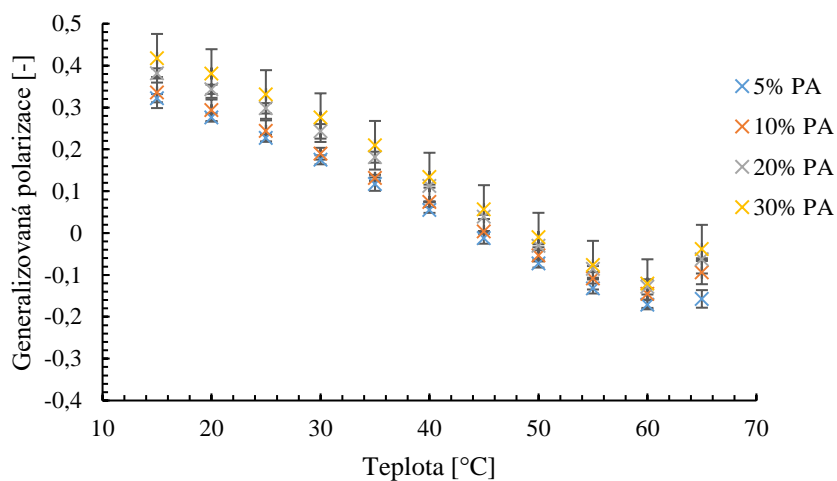
Obr. 42: Distribuce velikosti částic u vzorku s 20 mol. % PA a různým přidavkem DEAE-Dx·HCl



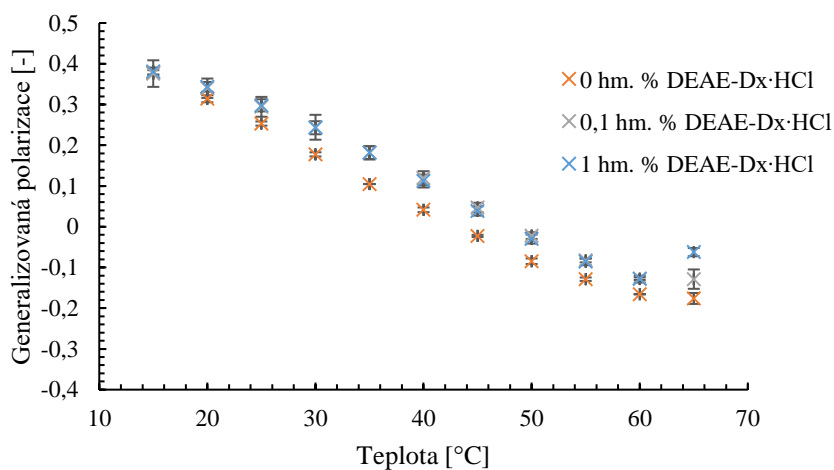
## 9.2 Závislosti generalizované polarizace na teplotě



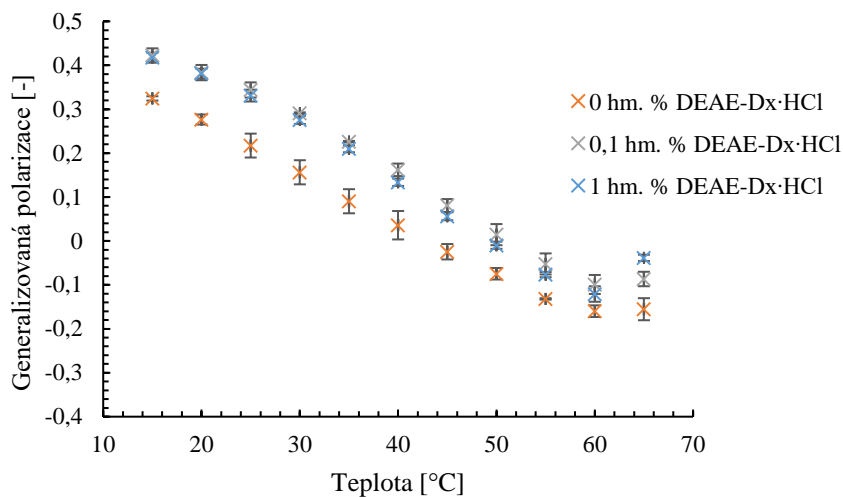
Obr. 43: Závislost generalizované polarizace na teplotě pro vzorky s 0,1 hm. % DEAE-Dx-HCl



Obr. 44: Závislost generalizované polarizace na teplotě pro vzorky s 1 hm. % DEAE-Dx-HCl

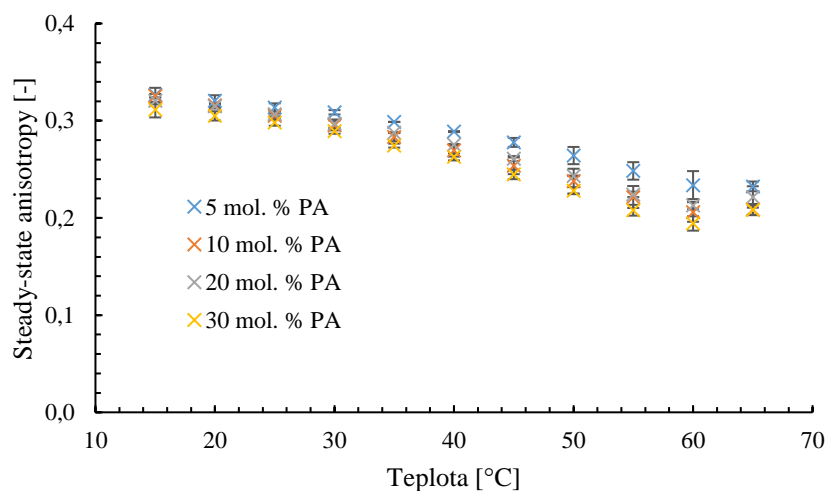


Obr. 45: Závislost generalizované polarizace na teplotě u vzorku s 20 mol. % PA a DEAE-Dx-HCl

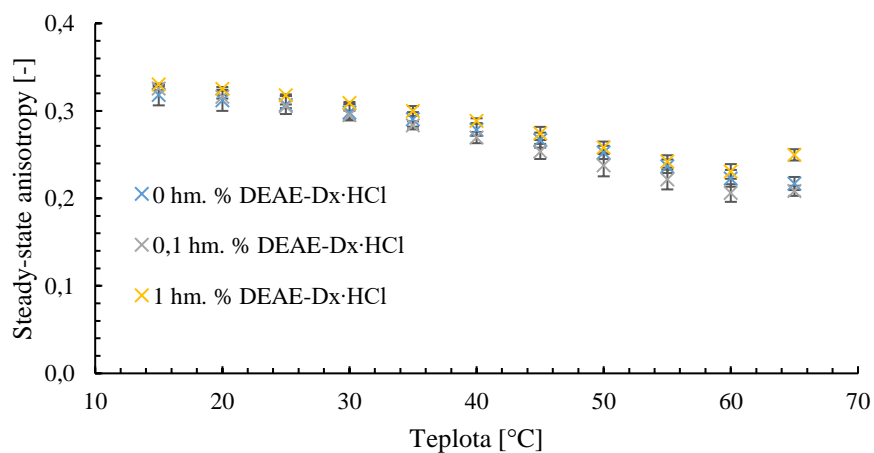


Obr. 46: Závislost generalizované polarizace na teplotě u vzorku s 30 mol. % PA a DEAE-Dx·HCl

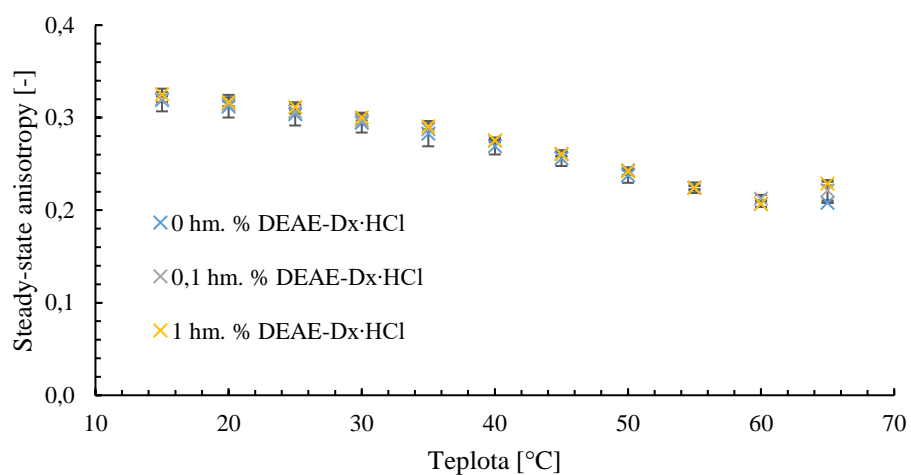
### 9.3 Závislost anizotropie na teplotě



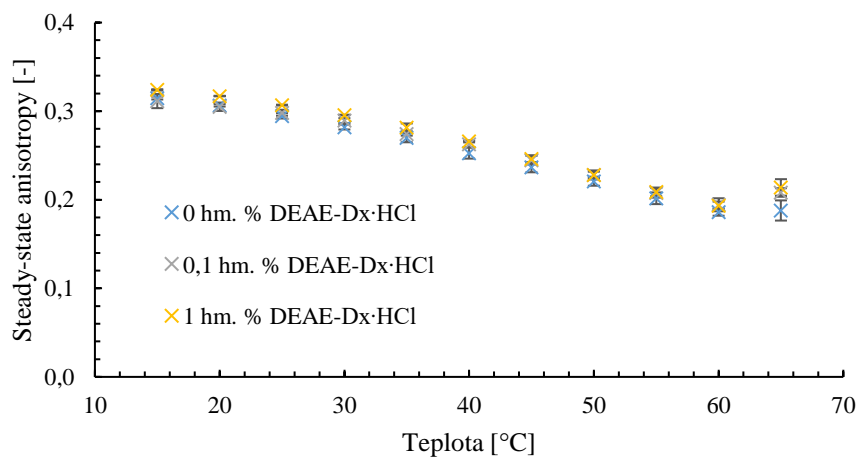
Obr. 47: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 0,1 hm. % DEAE-Dx·HCl



Obr. 48: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 10 mol. % PA



Obr. 49: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 20 mol. % PA



Obr. 50: Závislost anizotropie na teplotě pro vzorky s 30 mol. % PA