



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

FÁZOVĚ SEPAROVANÉ SYSTÉMY BIOPOLYMER-LIPID

PHASE-SEPARATED SYSTEMS BIOPOLYMER-LIPID

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Kubalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0992/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Barbora Kubalová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jana Burdíková	

Název diplomové práce:

Fázově separované systémy biopolymer-lipid

Zadání diplomové práce:

1. Provést literární rešerši na téma interakce mezi lipidy a polyanionty, které vedou k fázové separaci.
2. Na základě rešerše vybrat lipid nebo směs lipidů potenciálně vhodné pro interakci s biopolyelektrolyty, zejména hyaluronanem sodným a polystyrenulfonátem sodným.
3. Pomocí změny koncentrace složek, vlastnosti prostředí, např. pH a teplota, ověřit jestli dochází v těchto systémech k fázové separaci na základě interakce mezi lipidy a polymery.
4. Na základě pozorování a vhodně zvolené instrumentální techniky, dle rešerše, diskutovat, jestli ve zvolených systémech k fázové separaci dochází, co je pravděpodobným produktem a zhodnotit potenciální aplikaci ve farmacii a medicíně.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Barbora Kubalová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí v systémech polymer-lipid s hlavním zaměřením na interakce vedoucí k fázové separaci. Z polymerů byly v této práci použity aniontové polyelektrolyty poly(4-styrensulfonyl) sodný, chondroitin-6-sulfát sodný a zejména hyaluronan sodný. Lipidy, kationtový 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan (chloridová sůl) a zwitteriontový 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-fosfocholin, byly pomocí sonifikace zformulovány do lipozomů. Bylo zjištěno, že k fázové separaci dochází v systémech se specifickým hmotnostním poměrem DPTAP/polymer, přičemž tuto silnou elektrostatickou interakci vedoucí ke vzniku sraženin je možno oslabit především zvýšením iontové síly v roztoku. Rovněž bylo zjištěno, že systémy obsahují hydrofobní domény a jsou tedy schopny inkorporovat hydrofobní látky.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with experimental study of interaction based on polymer-lipid system. The main goal was to investigate interaction leading to phase separation. Three anionic polyelectrolytes were selected for this purpose: sodium hyaluronate, sodium chondroitin-6-sulfate and sodium poly(4-styrenesulfonate). The liposomes were formulated by sonication of lipid – cationic 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propane (chloride salt) and zwitterionic 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-phosphocholine. It was found that the phase separation occurred at specific ratio of DPTAP and selected polymer. It was also explored that the strong electrostatic interaction which leads to the phase separation can be weakened by increasing the ionic strength in the sample. As we expected the systems contain the hydrophobic domain and therefore these are able to incorporate hydrophobic substances in their structure.

KLÍČOVÁ SLOVA

polymery, hyaluronan, chondroitin sulfát, polystyrensulfonyl, lipidy, lipozomy

KEY WORDS

polymers, hyaluronan, chondroitin sulfate, polystyrenesulfonate, lipids, liposomes

KUBALOVÁ, B. *Fázově separované systémy biopolymer-lipid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 78 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému vedoucímu Ing. Filipu Mravci, Ph.D. za celkové vedení, cenné rady, připomínky a obrovskou trpělivost. Zároveň velkým dík patří všem, kteří mi pomáhali s rozličnými metodami použitými v experimentální části této diplomové práce a s následnou interpretací dat. Jmenovitě to jsou Ing. Michal Kalina, Ph.D., Ing. Jakub Tkacz, Ph.D., doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D., Ing. Pavel Šiler, Ph.D. a Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Polymery	8
2.1.1	Rozdělení polymerů podle výchozí suroviny	8
2.1.1.1	<i>Přírodní polymery</i>	8
2.1.1.2	<i>Syntetické polymery</i>	10
2.1.2	Chondroitin sulfát sodný	10
2.1.2.1	<i>Struktura</i>	11
2.1.2.2	<i>Biokompatibilní chondroitin</i>	12
2.1.2.3	<i>Biosyntéza a degradace</i>	13
2.1.2.4	<i>Využití v lékařství</i>	14
2.1.3	Kyselina hyaluronová.....	15
2.1.3.1	<i>Struktura</i>	16
2.1.3.2	<i>Biokompatibilní hyaluronan</i>	17
2.1.3.3	<i>Biosyntéza a degradace</i>	17
2.1.3.4	<i>Využití v lékařství</i>	18
2.1.4	Poly(4-styrensulfonyl) sodný	19
2.1.4.1	<i>Struktura</i>	20
2.1.4.2	<i>Využití v lékařství</i>	20
2.2	Lipidy	21
2.2.1	Rozdělení	21
2.2.2	Složené lipidy.....	21
2.2.2.1	<i>Fosfolipidy</i>	22
2.2.2.2	<i>Kationtové lipidy</i>	24
2.2.3	Lipozom – agregovaná forma lipidů	24
2.2.3.1	<i>Struktura</i>	24
2.2.3.2	<i>Druhy lipozomů</i>	25
2.2.3.3	<i>Aplikace</i>	26
2.3	Současný stav řešené problematiky.....	27
2.3.1	Agregované formy lipidů	27
2.3.2	Interakce biopolymer-lipid.....	28
2.3.3	Fázově separované systémy biopolymer-lipid	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Materiály	32
3.2	Metody	35
3.2.1	Příprava zásobních roztoků lipozomů	35
3.2.2	Příprava zásobních roztoků polymerů.....	36
3.2.3	Příprava rozpouštědel.....	36

3.2.4	Příprava vzorků	37
3.2.5	Měření rozptylu světla.....	38
3.2.6	Reologická měření	38
3.2.7	Skenovací elektronová mikroskopie	39
3.2.8	Rentgenová fluorimetrie.....	39
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	40
4.1	Vliv hmotnostního poměru DPTAP/polymer v systému polymer-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50	40
4.1.1	Systém hyaluronan-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50	41
4.1.2	Systém chondroitin sulfát-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50..	42
4.1.3	Systém polystyrensulfonyl-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50	44
4.2	Vliv molárního poměru lipidických složek DPPC, DPTAP v systému polymer-lipid.....	46
4.3	Měření rozptylů světla.....	50
4.3.1	Elektroforetický rozptyl světla	50
4.3.2	Dynamický rozptyl světla	51
4.4	Systém polymer-lipid se solubilizovaným hydrofobním barvivem	52
4.5	Ovlivňování interakcí vedoucích k fázové separaci.....	53
4.5.1	Iontová síla	53
4.5.1.1	<i>Jednomocné ionty – NaCl</i>	53
4.5.1.2	<i>Vícemocné ionty</i>	54
4.5.2	Ovlivnění chaotropy	55
4.5.3	Ovlivnění kosmotropy.....	56
4.5.4	Fázově separované systémy polymer-lipid s NaOH	57
4.6	Reologická měření.....	59
4.7	Elektronová mikroskopie	61
4.8	Rentgenová fluorimetrie.....	63
5	ZÁVĚR	65
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	67
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	73
7.1	Seznam zkratk	73
7.2	Seznam symbolů	73
8	SEZNAM PŘÍLOH	74
10	PŘÍLOHY	75

1 ÚVOD

Tato diplomová práce navazuje na dlouholetý výzkum na fakultě – interakce aniontových polyelektrolytů a kationtových tenzidů (v micelární formulaci), jež vede k tvorbě trojrozměrné polymerní sítě, tedy hydrogelu. Tyto hydrogely jsou fyzikálně síťované, kdy pevné uzly tvoří právě kladně nabitě micely s hydrofobními doménami. Nicméně kationtové tenzidy patří jako surfaktanty mezi látky cytotoxické. Jejich použití v medicíně či kosmetice je proto značně limitované. Nabízí se proto nahradit tyto cytotoxické tenzidy látkami, jež by byly biokompatibilní a biodegradabilní. Díky své strukturální podobnosti se pak jako vhodná „bio“ náhrada tenzidů jeví právě polární lipidy. Snahou a cílem této práce tedy bylo prostudovat interakce mezi polyelektrolyty a polárními lipidy s hlavním zaměřením na interakce vedoucí k fázové separaci. Z polyelektrolytů byly vybrány přírodní aniontové hyaluronan sodný a chondroitin-6-sulfát sodný, jež se nachází v lidském těle a splňují tedy podmínku biokompatibility a biodegradability. Dále byl vybrán syntetický poly(4-styren sulfonát) sodný, jež je často volen jako modelový polyelektrolyt, díky jasně definované struktuře a disociovatelným skupinám. Z lipidů byly zvoleny kationtový lipid DPTAP (1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan) a zwitteriontový fosfolipid DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-fosfocholin). Tato směs lipidů byla pomocí sonifikace zformulována do lipozomů, jež by měly být schopny inkorporovat jak hydrofilní, tak hydrofobní látky, což je velice důležité pro případnou praktickou aplikaci, neboť většina léčivých a prospěšných látek má právě hydrofobní povahu. Lipozomy by pak tedy měly být schopny, díky kladným kvartérním amoniovým dusíkům v polárních hlavách na povrchu lipozomu, interagovat s aniontovými polyelektrolyty, stejně jako kladně nabitě micely tvořené tenzidy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polymery

Polymery jsou přírodní nebo syntetické látky, v jejichž veliké molekule (makromolekule) se jako článek v řetězu mnohonásobně opakuje základní monomerní jednotka. Představují tedy chemickou stavebnici, která umožňuje neobyčejnou proměnlivost struktur i vlastností výsledných látek. Syntetické polymery vyvinuté v první polovině 20. století umožnily rozvoj plastikářského průmyslu, gumárenství, výroby syntetických vláken, průmyslu folií a obalů, průmyslu nátěrových hmot a kompozitních materiálů, které ovlivnily vývoj od letectví až po sportovní výzbroj. Druhou stranou mince však zůstává otázka polymerů, které již dosloužily a hromadí se na skládkách nebo dokonce ve volné přírodě. Výzkum spolu s příslušnou legislativou proto musí vyřešit problém odpadů tak, aby polymery lidem sloužily, ale přitom nezatěžovaly životní prostředí. Je ovšem důležité zmínit, že řada polymerních materiálů v podobě filtrů, membrán, izolací, geotextilií, tlumících prvků, sorbentů, analytických a lékařských pomůcek životní prostředí přímo ochraňuje [1]. I z tohoto důvodu je nyní velký význam přikládán k přírodním polymerům – biopolymerům, neboť tyto polymery jsou produkovány živými organismy a tudíž je příroda schopna je v krátkém čase sama zcela odbourat.

2.1.1 Rozdělení polymerů podle výchozí suroviny

Polymery podle výchozí suroviny klasifikujeme buď jako přírodní nebo syntetické. Syntetické polymery se v přírodě nevyskytují. Vznikají na základě lidského umu, a to chemickou cestou (syntézou). Odtud také pramení jejich název [2].

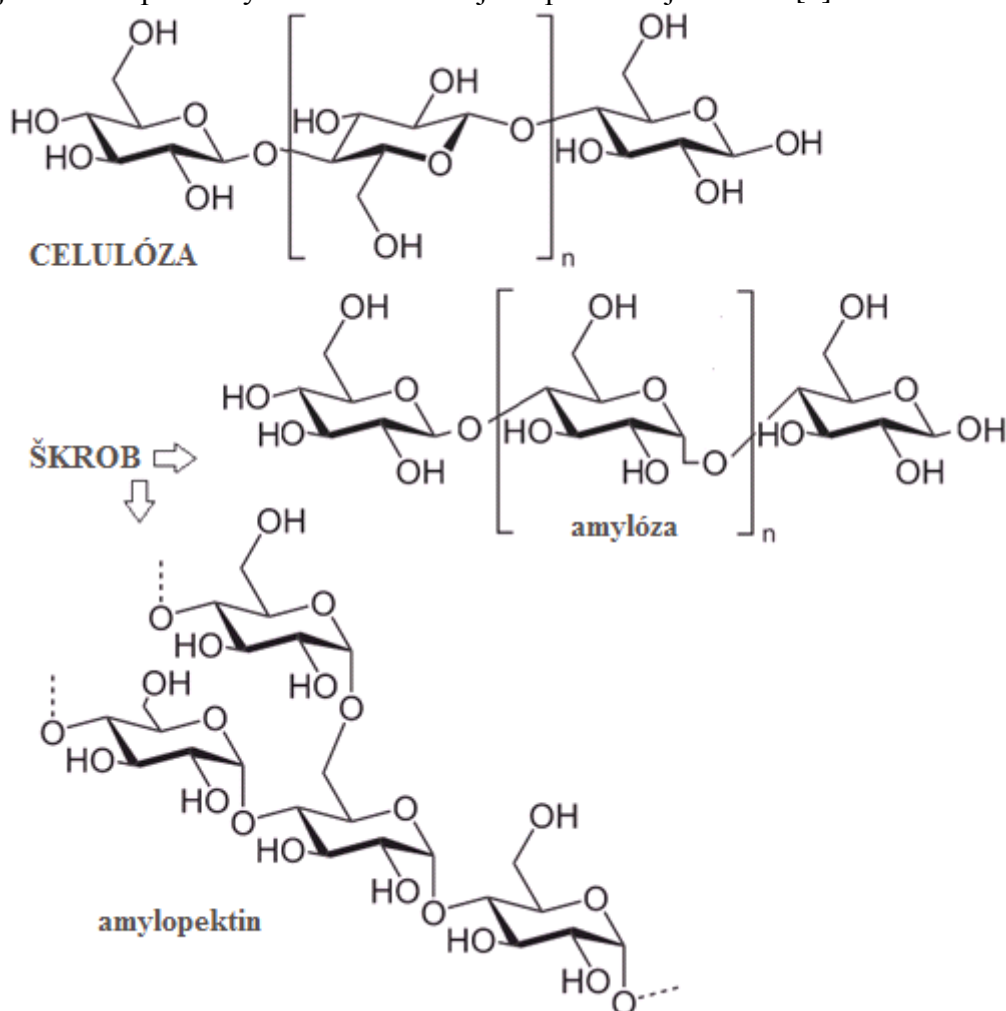
2.1.1.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery představují velice rozmanitou škálu struktur a funkcí. Skupina čtyř hlavních biopolymerů, tvořená DNA, RNA, proteiny a polysacharidy, představuje hlavní složené biomolekuly buněk a tkání vyšších živočichů (někdy se k nim řadí i lipidy, jelikož vytváří makromolekuly, které agregují a utváří větší struktury, nicméně nepředstavují biopolymery v pravém slova smyslu). Tyto komplexní molekuly jsou tvořeny jednoduchými biomolekulami, jež představují základní stavební opakující se jednotky. Pro DNA a RNA jsou to deoxyribonukleotidy a ribonukleotidy, proteiny jsou složeny z aminokyselin a polysacharidy tvoří jednoduché cukry [3].

Mnohé z výše uvedených i jiné byly prvními makromolekulárními látkami, které našly pro naši civilizaci technické využití. Mezi významné přírodní polymery patří [2]:

- *přírodní kaučuk* – je obsažen v některých rostlinách v podobě mlékovité šťávy zvané latex. Pro těžbu má však význam pouze strom Kaučukovník brazilský (*Hevea brasiliensis*) pěstovaný na plantážích. Složení přírodního latexu není zcela stálé. Záleží na mnoha parametrech jako druh a stáří stromu, počasí, roční období, ... Průměrný obsah kaučukového uhlovodíku je přibližně 35 %. Voda představuje 60 %, zbytek připadá na bílkoviny (více než 2 %), pryskyřice (1,5 % až 2 %), popel (okolo 0,7 %) a cukry (asi 0,3 %) [2].

- polysacharidy* – jsou přírodní polymery, jejichž makromolekuly se skládají z mnoha molekul monosacharidů, tj. jednoduchých cukrů, navzájem spojených O-glykosidovou vazbou. Snad nejdůležitějšími jsou polysacharidy odvozené od glukózy, neboli hroznového cukru, celulóza a škrob (struktura viz *Obrázek 1*) či v medicíně využívaný a v lidském těle obsažený hyaluronan nebo od galaktózy odvozený chondroitin sulfát, jenž bude spolu s hyaluronanem dále ještě podrobněji zmíněn [2].



Obrázek 1: Struktura přírodních polymerů – polysacharidů celulózy a škrobu. Celulóza, jež se sestává z jednotek D-glukózy spojených vazbou $\beta(1\rightarrow4)$, je umístěna nahoře. Škrob je tvořen amylosem, jež je tvořena dlouhými nerozvětvenými řetězci tvořenými D-glukózovými jednotkami, jež jsou navzájem propojeny $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami. Druhým polymerem, jenž se podílí na struktuře škrobu, je amylopektin (v obrázku zcela dole), který je rovněž složen z D-glukózových jednotek spojených vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$, přičemž obsahuje každých 20–30 glukózových jednotek větvení, tedy vazbu $\alpha(1\rightarrow6)$ [4], [5].

- bílkoviny* – mají mezi všemi přírodními látkami zcela zvláštní postavení, neboť bez nich není možná existence žádného živého organismu, jelikož jsou součástí všech živých buněk. Organizace bílkovinných struktur je rozdělena do 4 kategorií. Primární struktura představuje samotnou sekvenci aminokyselin, sekundární struktura je druh prostorové

orientace dvou následujících peptidových vazeb, terciární – 3D uspořádání celé makromolekuly a kvartérní – vzájemné uspořádání podjednotek [6], [7]. Bílkoviny zpravidla dělíme podle tvaru jejich molekul (typ terciární struktury) na vláknité a globulární. Vláknité bílkoviny jsou konstrukčním materiálem těl živočichů. Patří mezi ně keratin, fibroin, kolagen či myosin. Společným znakem těchto bílkovin je jejich nerozpustnost ve vodě. Naopak rozpustné ve vodě jsou globulární bílkoviny. Typické příklady globulárních bílkovin jsou například arachin (v arašídových ořešcích), albumin (ve vejcích), kasein (v mléku) či zein (v kukuřici) [2].

2.1.1.2 Syntetické polymery

Jak již bylo zmíněno, syntetické polymery se v přírodě nevyskytují, nýbrž se připravují chemickou syntézou z nízkomolekulárních sloučenin jako např. styren, butadien, propylen, ... Tyto nízkomolekulární sloučeniny získáváme základními petrochemickými procesy z ropy a zemního plynu. Podle typu jednotlivých reakcí polymery můžeme rozdělit na polymery vznikající [2]:

- *polymeraci* – řetězová chemická reakce velkého počtu molekul monomeru, při níž vznikají dlouhé makromolekuly polymeru. Při této reakci se nevytvářejí vedlejší produkty, chemické složení polymeru je stejné jako chemické složení monomeru.
- *polykondenzací* – sled stejných opakujících se reakcí funkčních skupin výchozích látek. Ke vzniku polymeru je třeba, aby sloučeniny měly potřebný počet funkčních skupin (nejméně dvě). Polykondenzace je tedy reakce, při níž vzniká ze dvou nízkomolekulárních látek polymer a nějaká jiná nízkomolekulární látka, většinou voda. Na rozdíl od polymerace produkt polykondenzace má jiné chemické složení než nízkomolekulární látky, ze kterých vznikl.
- *polyadicí* – adiční reakce sloučenin, jejichž molekuly obsahují násobné vazby, nebo jsou tvořeny kruhy s malým počtem členů, se sloučeninami, jejichž molekuly obsahují vhodné funkční skupiny.

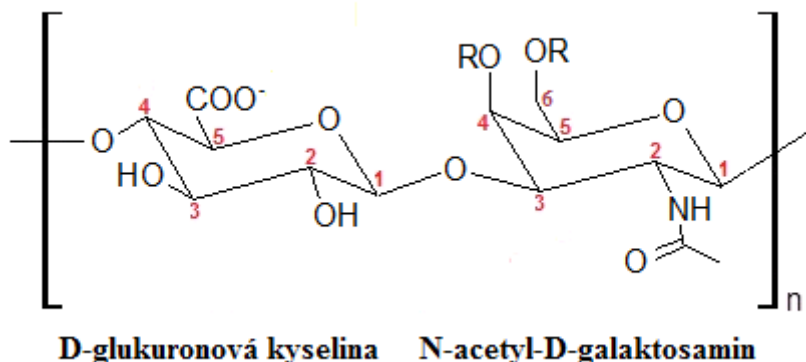
2.1.2 Chondroitin sulfát sodný

Chondroitin sulfát (CS) byl poprvé izolován z hyalinní chrupavky v roce 1884 Krukenbergem, který tímto zároveň popsal první přípravu glykosaminoglykanů – extrakce ve zředěném alkalickém roztoku při laboratorní teplotě. O pět let později byla zjištěna přítomnost esterově vázaného sulfátu, na základě čehož byla sloučenina v roce 1891 Schmiedebergem pojmenována jako chondroitin sulfátová kyselina. Tento název byl odvozen z řeckého termínu pro chrupavku „*chondros*“ a předpokládaného složení: acetát, sulfát, glukuronová kyselina a hexosamin. Za hexosamin byl v té době pokládán chitosamin (tehdejší termín pro glukosamin). Trvalo více než dvacet let, než Levene a La Forge roku 1914 správně určili strukturu hexosaminu, jímž je galaktosamin [8], [9].

V roce 1940 byl chondroitin poprvé stanoven jako důležitá komponenta chrupavky. Popularitu získal v roce 1998 díky knize „*The Arthritis Cure*“ (přeloženo jako „Lék na artritidu“). Od této doby byla intenzivně zkoumána jeho účinnost, zvláště v kombinaci s glukosaminy, v léčbě osteoartritidy či jako protizánětlivé činidlo [10].

2.1.2.1 Struktura

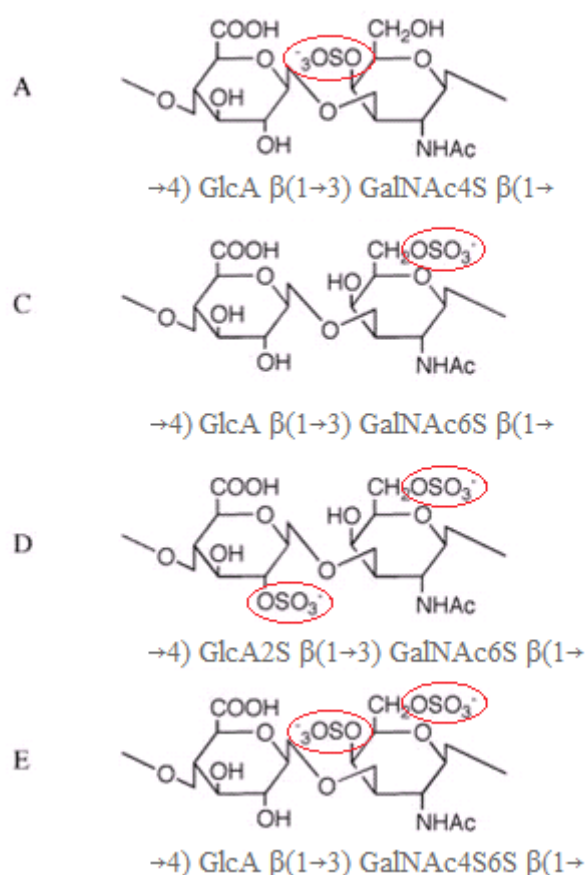
Chondroitin sulfát zařazujeme mezi galaktosaminoglykany ze skupiny glykosaminoglykanů, které byly dříve označovány jako mukopolysacharidy. Kyselina D-glukuronová (GlcA) a sulfatovaný N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc) střídavě vázané glykosidovou vazbou $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ pak tvoří základní disacharidovou jednotku makromolekuly, jež je znázorněna na *Obrázku 2* [11].



Obrázek 2: Základní opakující se disacharidová jednotka makromolekuly chondroitin sulfátu tvořená D-glukuronovou kyselinou a N-acetyl-D-galaktosaminem se střídajícími se glykosidovými vazbami $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$. Symbol R ve struktuře chondroitin sulfátu značí dvě nejčastější lokalizace sulfátové skupiny, tedy na čtvrtém či šestém uhlíku (druhé R pak ve struktuře značí vodík H). Červenými číslicemi je naznačeno číslování na jednotlivých sacharidech jednotky.

Sulfátovou skupinu nejčastěji nacházíme na čtvrtém či šestém uhlíku N-acetyl-D-galaktosaminu, sloučeniny tedy nazýváme chondroitin-4-sulfát (dříve označován jako chondroitin sulfát A) a chondroitin-6-sulfát (chondroitin sulfát C). Tyto dva typy jsou nejběžnější, neboť jsou nejvíce distribuovány ve tkáních, ze kterých je pak chondroitin sulfát izolován. V některých případech se však stává, že se v jediné makromolekule chondroitin sulfátu objeví obě isomerní disacharidové jednotky. Z dalších výzkumů pak vyplývá, že se chondroitin sulfát, s poměrem sulfát/disacharidová jednotka 1, vyskytuje s nerovnoměrnou distribucí sulfátové skupiny, tedy že se na řetězci chondroitin sulfátu nachází jednotky bez sulfátové skupiny, ale i jednotky disulfatované [11], [12].

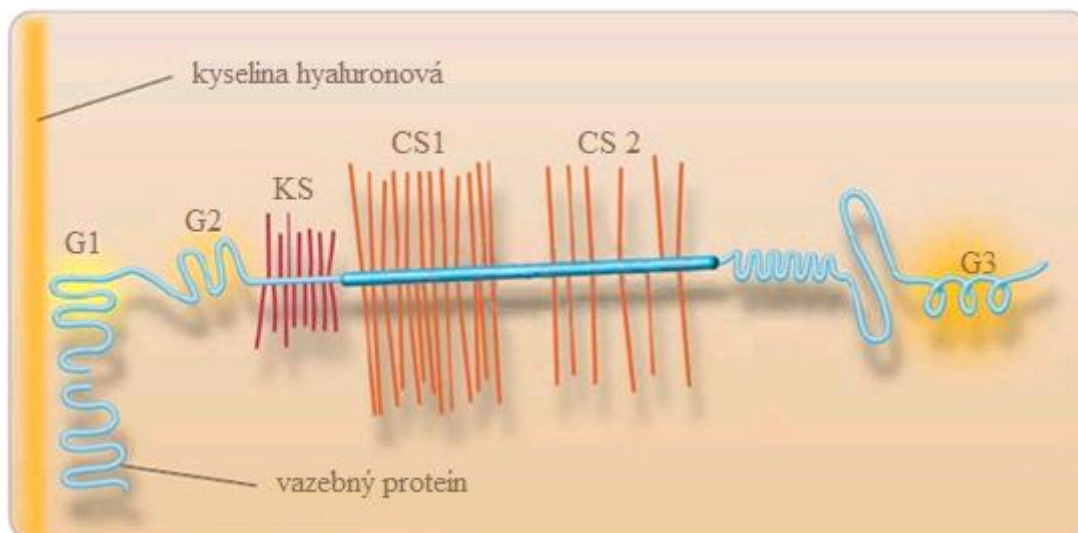
Kromě dvou nejčastějších typů chondroitin sulfátu, s jednou sulfátovou skupinou na disacharidovou jednotku, byly rovněž izolovány druhy s vyšším počtem sulfátových skupin. Ze žraločí a krabí chrupavky byl izolován chondroitin sulfát D, jenž kromě sulfátu na N-acetyl-D-galaktosaminu obsahuje i sulfát v pozici C2 či C3 na D-glukuronové kyselině. Na druhou stranu chondroitin sulfát E, jenž byl izolován z chrupavky medúzy, obsahuje převážně C4 a C6 disulfatovaný N-acetyl-D-galaktosamin. Existuje tedy celá řada typů chondroitin sulfátu, viz *Obrázek 3*, přičemž není prozatím známo mnoho informací o faktorech, jenž mají vliv na počet sulfátových skupin v disacharidové jednotce a jejich lokalizaci [11].



Obrázek 3: Schematické znázornění různých typů disacharidových jednotek chondroitin sulfátu, které se liší množstvím a lokalizací sulfátových skupin, jež jsou v obrázku zvýrazněny červeným boxem. Zkratka GlcA v obrázku značí kyselinu D-glukuronovou a GalNAc označuje N-acetyl-D-galaktosamin [13].

2.1.2.2 Biokompatibilní chondroitin

Chondroitin sulfát se vyskytuje v tkáních živých organismů, kde je kovalentně vázán k proteinům a vytváří tedy řadu proteoglykanů jako například agrekan, dekorin či biglykan. Jednou z tkání, kde je chondroitin hojně zastoupen, je pojivová tkáň, přičemž je jednou ze základních molekul mezibuněčné hmoty kloubní chrupavky. Mezibuněčná hmota chrupavky je složena z pevné kolagenní sítě, jež je převážně tvořena kolagenem typu II, jehož terciární struktura je stabilizována pyridinolinovými můstky, a v menší míře i dalšími kolageny, například typu VI, IX a XI. Tato síť představuje základní nosnou trojrozměrnou molekulární konstrukci, v níž jsou zanořeny obrovské molekuly proteoglykanu agrekanu [8], [14]. Agrekan je proteoglykan složený z centrálního proteinu, na který jsou navázány různé dlouhé řetězce glykosaminoglykanů, jak je znázorněno na Obrázku 4. Hlavním polysacharidem agrekanu, z hlediska objemu, je právě chondroitin sulfát, který vytváří dvě chondroitin sulfátové domény. Dále je v agrekanu obsažen keratan sulfát, v tzv. keratan sulfátové doméně, a oligosacharidy. Jednotlivé molekuly agrekanu jsou pak navázány na dlouhé vlákno kyseliny hyaluronové přes vazebný protein [15], [16].



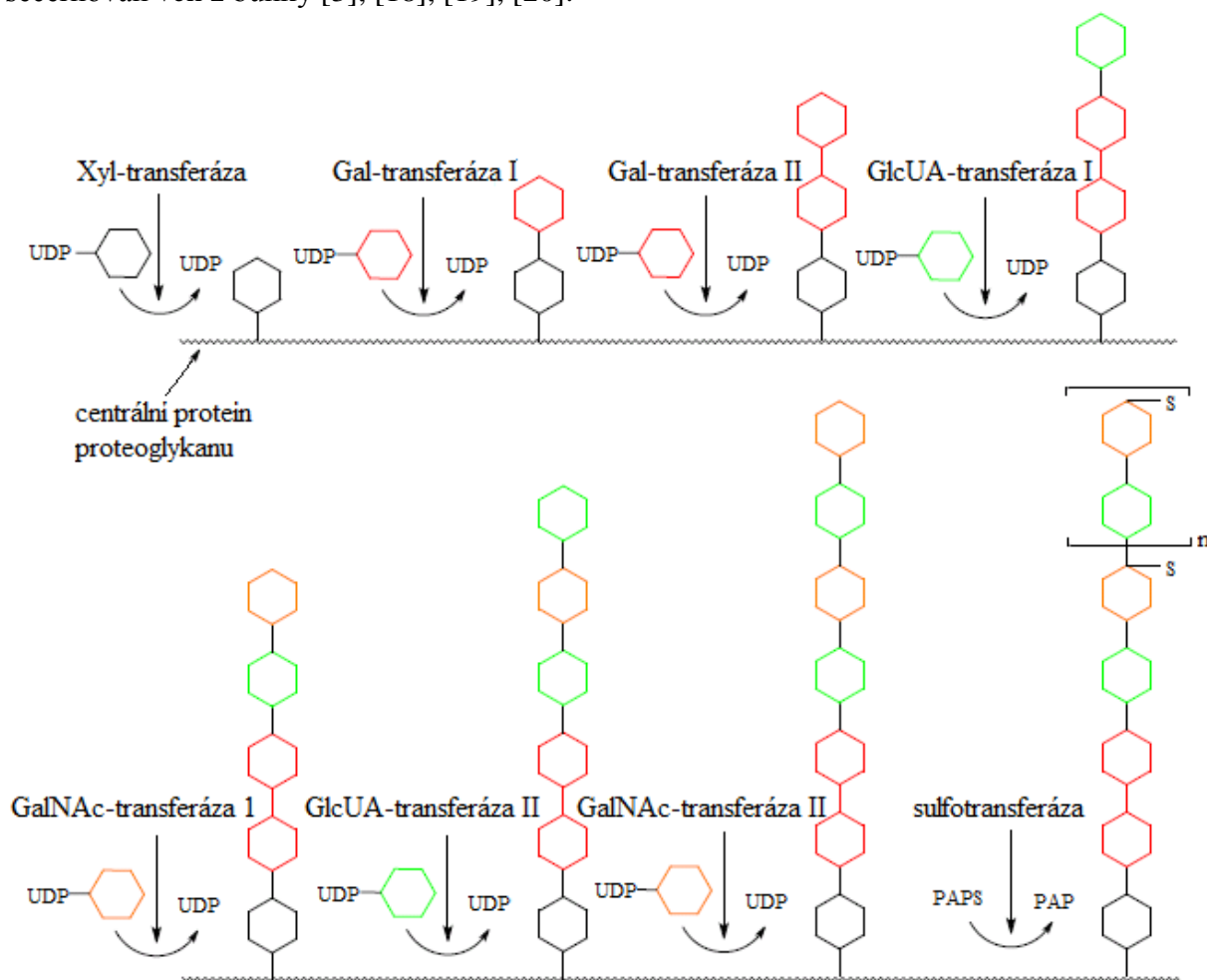
Obrázek 4: Schéma molekuly agrekanu. Centrální protein agrekanu je znázorněn modrým vláknem. G1, G2 a G3 představují tři globulární domény agrekanu. KS představuje doménu keratin sulfátu a CS1 s CS2 označují dvě domény chondroitin sulfátu ve struktuře agrekanu [15].

Chondroitin sulfát i další glykosaminoglykany agrekanu obsahují velké množství negativně nabitých skupin ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$), jež udělují glykosaminoglykanům vysoký záporný náboj. Záporné náboje pak váží kationty kovů, které jsou osmoticky aktivní. Glykosaminoglykany jsou proto silně hydratovány a jsou schopny vázat značné množství vody, díky čemuž zaujímají velký objem (10 000–100 000krát větší než vlastní objem molekul) [17]. Tato jejich vlastnost je podstatou funkce agrekanu, který se díky změně obsahu vody podílí na absorpci mechanické síly, která na chrupavku působí. Schopnost glykosaminoglykanů vázat velké množství vody tedy způsobuje elasticitu a odolnost chrupavky vůči tlaku. Spontánnímu zvětšování objemu glykosaminoglykanů absorpcí vody brání, za fyziologických okolností, právě pevná, neelastická kolagenní síť [15].

2.1.2.3 Biosyntéza a degradace

Syntéza chondroitin sulfátu je úzce spjata s dalšími biosyntetickými pochody, jež jsou součástí biosyntézy proteoglykanů v těle. Nejprve je z D-fruktózy-6-fosfát vytvořen UDP-N-acetyl-D-galaktosamin, jehož prekurzor UDP-N-acetyl-D-glukosamin je stavební složkou kyseliny hyaluronové. Následně je z UDP-D-glukózy syntetizována UDP-D-glukuronová kyselina. Bílkovinná část proteoglykanů je syntetizována na ribozomech, odkud přestupuje do lumen drsného endoplazmatického retikula, kde probíhá iniciační glykosylace, jež představuje připojení trisacharidové spojky přes O-glykosidovou vazbu k serinu centrálního proteinu proteoglykanu. Následuje připojení D-glukuronové kyseliny chondroitin sulfátu redukujícím koncem k trisacharidové spojce. Další kroky syntézy pak představují připojování jednotlivých aktivních UDP-cukrů k rostoucímu řetězci za účasti vysoce specifických glykosyltransferáz v Golgiho aparátu. Modifikace cukerného řetězce, tedy sulfatace N-acetyl-D-galaktózy, probíhá za účasti enzymu sulfotransferázy ještě

před tím, než je dokončeno prodloužení řetězce. Po ukončení syntézy je celý proteoglykan secernován ven z buňky [3], [18], [19], [20].



Obrázek 5: Schematické znázornění syntézy chondroitin sulfátu v proteoglykanu [18], [19].

Degradace chondroitin sulfátu (stejně jako ostatních glykosaminoglykanů) vázaných v proteoglykanech probíhá v buňkách, do kterých jsou z mezibuněčné hmoty transportovány endocytózou. Uvnitř pak splyne endozom s lysozomem, jenž obsahuje endoglykosidázy i exoglykosidázy. Endoglykosidáza štěpí dlouhý řetězec na kratší oligosacharidy. Následně specifická exoglykosidáza odštěpuje cukerné zbytky od neredukujícího konce [18].

2.1.2.4 Využití v lékařství

Chondroitin sulfát má díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě široké uplatnění na poli medicíny, farmacie, ale i potravinových doplňků, ...

V oční chirurgii se využívá osmotické aktivity roztoku chondroitin sulfátu pro uchování rohovky během transplantací či během operace šedého zákalu, kde slouží k zabránění hydratace a vzniku edému [10]. Rovněž se pak využívá v očních tkáňových bankách, kde v roztoku společně s antibiotiky, vitamíny, ATP prekurzory a hydroxyprolinem zvyšuje dobu, po kterou může být rohovka skladována, a to až na 14 dní při 4 °C [21].

Dále je možné využití koloidního roztoku komplexu chondroitin sulfátu s chelátovaným železem, neboť tento komplex vykazuje chování jako antianemikum. Zvyšuje tedy

biodostupnost železa v těle a může být potenciálně bezpečně využit při nahrazování deficitu železa u pacientů na hemodialýze s anémií rezistentní k i.v. terapii rekombinantním lidským erythropoetinem, což je standardní léčba anemie [10], [20].

Vůbec nejvýznamnější uplatnění pak nachází při léčbě osteoartrózy jako chondroprotektivum, vedle standardního používání analgetik a nesteroidních antirevmatik. U osteoartrózy dochází v chrupavce k řadě metabolických změn směřujících ke zhoršení její kvality. Degenerativní změny se týkají všech složek mezibuněčné hmoty chrupavky. Kolagenní síť se stává následkem patologické produkce jiných typů kolagenu (např. kolagenu typu I a III) méně pevnou a odolnou vůči působení proteolytických enzymů. Přestává stačit odolávat značnému osmotickému tlaku agrekanu, který absorbuje více vody a zvětšuje tak svůj objem (edém chrupavky ale snižuje její elasticitu). Z poškozené kolagenní sítě se též snáze extrahují fragmenty i celé molekuly agrekanu do synoviální tekutiny, což vede k jeho úbytku v chrupavce. Ke změnám však dochází i u samotné syntézy agrekanu a chondroitin sulfátu – mění se délka řetězců chondroitin sulfátu, poměr chondroitin-4-sulfátu a chondroitin-6-sulfátu a zvyšuje se antigenicita CS. Výsledkem všech výše uvedených změn je pak zhoršení kvality i snížení množství agrekanu, což vede ke ztrátě pružnosti a změně funkce kloubní chrupavky [12]. Chondroitin sulfát je pak doporučován Evropskou ligou proti revmatismu (*European League Against Rheumatism – EULAR*) jako jeden z „symptomaticky pomalu působících léků osteoartrózy“ (SYSADOA – zkratka anglického „*symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis*“), který má mírný až středně silný symptomatický (vliv na snížení kloubní bolesti, zlepšení rozsahu pohybu aj.) i strukturální (schopnost zpomalovat morfologickou progresi osteoartrózy, tedy zpomalovat zužování šterbiny kolenního kloubu) účinek u artrózy kolena, ale i v jiných lokalizacích – kyčle a ruce [22]. SYSADOA obecně jsou látky s dlouhodobým účinkem, které obsahují komponenty mezibuněčné hmoty chrupavky nebo synoviální tekutiny. Inhibují proteolytické enzymy, podporují syntézu mezibuněčné hmoty, působí protizánětlivě a analgeticky a zpomalují progresi onemocnění. Charakteristický je pro tyto látky pozvolný nástup účinku a přetrvávání účinku po 2–3 měsíce po ukončení jejich podávání. Vyznačují se minimálními nežádoucími účinky, navíc umožňují snížit spotřebu nesteroidních antirevmatik, a tak omezit i jejich nežádoucí účinky [23]. Kromě farmaceutických přípravků se chondroitin sulfát samotný, nebo v kombinaci s glukosaminem, používá jako potravinový doplněk. Ne každý výrobek však disponuje potřebnou čistotou, koncentrací, původem (většina studií, které prokázaly účinnost chondroitin sulfátu, používala CS farmaceutické kvality z hovězí chrupavky) či efektivním dávkovacím schématem, z čehož pak, možná nesprávně, pramení i jistá nedůvěra a četnost rozličných názorů ohledně jeho účinnosti [24].

2.1.3 Kyselina hyaluronová

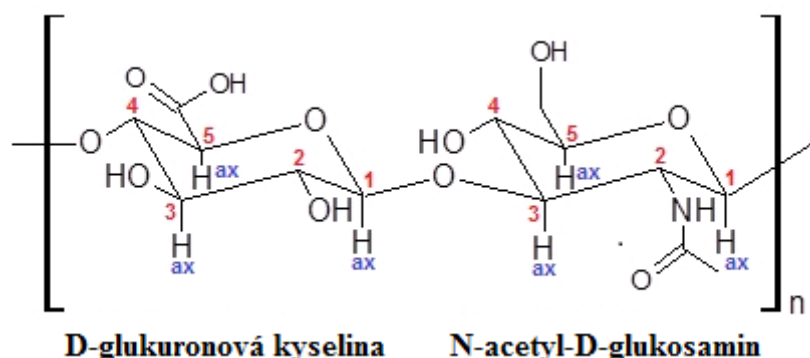
Objev kyseliny hyaluronové (HyA) se datuje k roku 1934, tedy padesát let po objevení chondroitin sulfátu. V tomto roce byla kyselina hyaluronová izolována z očního sklivce skotu Karlem Meyerem a Johnem Palmerem na Kolumbijské univerzitě v New Yorku, kteří rovněž stanovili, že struktura obsahuje hexuronovou kyselinu a hexosamin, přičemž neobsahuje žádný esterově vázaný sulfát [25]. Trvalo pak pouhých asi dvacet dalších let (u chondroitin

sulfátu to bylo let třicet), než byla disacharidová struktura určena, a to roku 1954 Weissmanem a Meyerem [8].

Svůj název kyselina hyaluronová získala spojením slov „*hyaloid (vitreous)*“ a „*uronic acid*“ [25]. Slovo „*hyaloid*“, které pochází ze dvou řeckých slov – transparentní a sklo, bylo použito proto, že vzhled vodného roztoku hyaluronanu právě tato dvě slova evokoval. Druhé slovo použité v názvu je odvozeno z „*uronic acid*“, neboli kyselina uronová, kterou vědci ve struktuře nově objevené látky predikovali [26]. Ačkoliv byla pojmenována jako kyselina hyaluronová, vzhledem k přítomnosti karboxylové skupiny, dochází ve vodném roztoku k její disociaci. Makromolekula se tedy převážně nachází jako draselná či sodná sůl kyseliny hyaluronové – hyaluronan (sodný, draselný, ...), což je i často používané označení.

2.1.3.1 Struktura

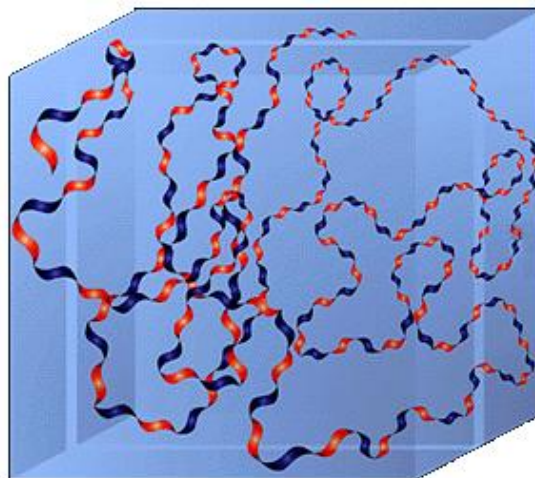
Hyaluronan rovněž patří do skupiny glykosaminoglykanů, ale na rozdíl od chondroitin sulfátu se řadí mezi glukosaminoglykany, přičemž jako jediný z této skupiny neobsahuje sulfátovou skupinu. Jedná se o makromolekulu, ve které se neustále opakují disacharidové jednotky – $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glukuronová kyselina a $\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetyl-D-glukosamin, jež jsou navzájem spojeny glykosidovou vazbou, kterou stabilizují intramolekulární vodíkové můstky, viz *Obrázek 6*. Tyto dvě podjednotky jsou tedy v makromolekule v poměru 1:1 [27].



Obrázek 6: Základní opakující se disacharidová jednotka makromolekuly hyaluronanu tvořená D-glukuronovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem se střídajícími se glykosidovými vazbami $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$. Modrá zkratka ax označuje vodíky na axiální pozici tvořící hydrofobní oblast hyaluronanu.

Jak je naznačeno na *Obrázku 6*, židličková konformace β -glukózy, jež je základem opakující se disacharidové jednotky a tedy i celé makromolekuly, umožňuje veškeré skupiny objemnější než vodík lokalizovat na stericky výhodnějších ekvatoriálních polohách, zatímco samotné vodíkové atomy zaujímají méně výhodné axiální pozice [28]. Díky tomuto rozmístění má primární struktura velmi nízkou energii a je tedy velice stabilní. Zároveň je i důvodem, proč je hyaluronan řazen mezi amfipatické látky, neboť axiální vodíky vytváří hydrofobní nepolární oblast, naopak skupiny umístěné na ekvatoriálních pozicích představují polární hydrofilní zónu [29]. V důsledku amfifility hyaluronanu pozorujeme i specifickou strukturu sekundární tzv. dvakrát stočenou šroubovici (*two-fold-helix*), která vzniká rotací každé disacharidové jednotky o 180° vůči předcházející a následující disacharidové jednotce.

V roztoku pak hyaluronan vytváří domény (viz *Obrázek 7*) za účelem minimalizace kontaktu hydrofobních oblastí s polárním rozpouštědlem, a tudíž zvýšením stability [30].



Obrázek 7: Model trojrozměrné doménové struktury molekuly hyaluronanu. Světle modrá krychle představuje vodné prostředí, modročervené vlákno reprezentuje dvakrát stočenou šroubovici se střídající se hydrofobní (červenou) a hydrofilní (modrou) zónou [30].

Makromolekula hyaluronanu může být složena z rozličného počtu disacharidových jednotek. Řetězec tedy může mít různou délku a tím tedy i různou molekulovou hmotnost (M_w). V praxi se tedy můžeme setkat s nízkomolekulárním až vysokomolekulárním hyaluronanem, kdy v jediné makromolekule bychom mohli napočítat až 10 000 disacharidových jednotek. Při přibližné hmotnosti jedné disacharidové jednotky asi 400 Da (přičemž $\text{Da} = \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) pak dostáváme potenciální hmotnost až 4 miliony Da [31].

2.1.3.2 Biokompatibilní hyaluronan

Hyaluronan patří mezi látky biokompatibilní a biodegradovatelné, neboť je tělu vlastní. V organismu zastává důležité biologické funkce, které se odvíjí od jeho molekulové hmotnosti. Nízkomolekulární hyaluronan (molekulová hmotnost cca 0,4–200 kDa) zabezpečuje biologickou aktivitu, a je tedy regulační molekulou. Naopak hyaluronan s molekulovou hmotností vyšší než 200 kDa se podílí na organizaci tkání a lubrikačních aktivitách. Je součástí pojivových, epitelových a nervových tkání, kde je ve většině případů jednou ze složek extracelulární matrix, v některých je pak prvkem hlavním. Hojně se vyskytuje v očním sklivci, z něhož byl poprvé získán. Díky své schopnosti dobře vázat vodu je nedílnou součástí kůže jako hydratační činidlo. Dále je také bohatě zastoupen v synoviální tekutině, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem zlepšuje pohyblivost kloubů, a je, stejně jako chondroitin sulfát, složkou extracelulární matrix chrupavek (viz *Obrázek 4*), kde díky schopnosti vysoké hydratace napomáhá elasticitě a odolnosti chrupavky vůči tlaku [15], [32].

2.1.3.3 Biosyntéza a degradace

Jelikož je hyaluronan pro fungování organismu nezbytný, je důležitá i regulace jeho aktuálně přítomného množství v těle, tedy řízení syntézy a odbourávání. Pro většinu buněk je charakteristický vyrovnaný poměr mezi syntézou a degradací, pro některé buňky však může

první či druhý děj převažovat – např. u buněk škáry převažuje syntéza nad odbouráváním.

Rovněž se u různých buněk může lišit doba, po kterou molekula hyaluronanu zůstává v organismu – např. chondrocyty syntetizují hyaluronan, jež se rozpadne za 2–3 týdny, hyaluronan syntetizovaný keratinocyty v těle setrvává méně než jeden den [30].

Syntéza makromolekuly s vysokou molekulovou hmotností je pro buňku energeticky velmi náročná, vyžaduje tedy přesnou regulaci, na niž se podílí transmembránové proteiny – hyaluronansyntázy. Degradaci makromolekul pak zabezpečují tři typy enzymů – hyaluronidáza, jež rozštěpuje hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností na oligosacharidy, a β -D-glukuronidáza s β -N-acetyl-hexosaminidázou, jež degradují vzniklé oligosacharidy odštěpením neredukujícího konce [31].

2.1.3.4 Využití v lékařství

Hyaluronan má díky svým unikátním vlastnostem – fyziologickým funkcím a především biokompatibilitě a biodegradabilitě, velice rozmanité využití.

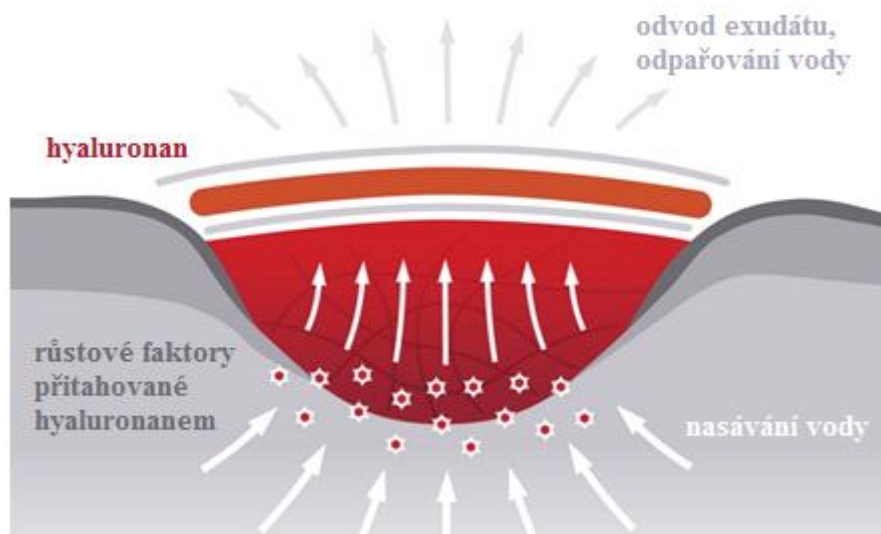
Své použití našel například v kontaktologii. V oblasti péče o kontaktní čočky je hyaluronan sodný využíván jako lubrikační látka očních kapek a roztoků. Díky svým vlastnostem je skvělým prostředkem dodávajícím kontaktním čočkám potřebné zvlhčení, aniž by jakkoliv dráždil nebo poškozoval oko. Používáním roztoku nebo očních kapek s obsahem této látky se čočky stávají hladšími a poddajnějšími, rovněž dodává očím potřebné zvlhčení, čímž eliminuje nepříjemné pocity suchosti a pálení, zároveň také zajišťuje podmínky potřebné k regeneraci očních buněk. Hyaluronan je rovněž využíván v oftalmologické chirurgii jako podpůrný prostředek při průběhu očních operací. Chrání citlivé oční tkáň, především endotel rohovky, před nechtěným poškozením během chirurgického výkonu. Využívá se i jako náhrada či doplnění tekutiny sklivce, která byla ztracena při operaci šedého zákalu nebo implantaci čočky [32], [33]. V neposlední řadě je využíván také lokálně k léčbě syndromu suchého oka, kdy je přidávána do umělých slz [34].

Hyaluronan se, stejně jako chondroitin sulfát, využívá při léčbě osteoartrózy, ale na rozdíl od chondroitin sulfátu se využívá jeho majoritního podílu v synoviální tekutině (při obsahu přibližně 2 ml synoviální tekutiny v kolením kloubu se koncentrace hyaluronanu pohybuje od 2,5 do 4 mg · dm⁻³), kde díky svým jedinečným viskoelastickým vlastnostem chrání kloubní struktury a zároveň zvyšuje stabilitu. Při osteoartróze pak klesá koncentrace hyaluronanu, v synoviální tekutině, na polovinu až třetinu, rovněž dochází k depolymeraci, čímž se snižuje jeho molekulová hmotnost, a tudíž se zhoršují i viskoelastické vlastnosti. Léčba pak spočívá v intraartikulární aplikaci kyseliny hyaluronové s cílem normalizovat a obnovit reologické vlastnosti synoviální tekutiny (tzv. viskosuplementace). Fyzikální účinek náhrady hyaluronanu v synoviální tekutině však není hlavní příčinou prospěšného efektu viskosuplementace. Ukázalo se, že exogenní hyaluronan má stimulační účinky na biosyntetické pochody v buňce, kdy může vyvolat syntézu endogenního hyaluronanu synoviálními buňkami, stimulovat proliferaci chondrocytů či zabraňovat degeneraci chrupavky. Rovněž se prokázalo protizánětlivé působení a analgetický účinek exogenního hyaluronanu při osteoartróze [22], [35], [36].

Intenzivně studovaným tématem posledních let je možnost využití hyaluronanu jako prostředku cílené distribuce léčiv, která se používá převážně u léků, které způsobují řadu

závažných vedlejších účinků. Jedním z takových přípravků jsou například chemoterapeutika, která jsou účinným nástrojem v boji s nádorovými onemocněními. Jejich účinkem je zastavení růstu proliferujících nádorových buněk, avšak tento efekt je nespecifický a působí i na rychle se množící buňky zdravé. Toxicita cytostatik tedy způsobuje řadu nežádoucích účinků a je tedy klíčovým problémem limitujícím plné využití jejich léčebného potenciálu. Z tohoto důvodu je současným trendem snaha o vytvoření nosičového systému, který by toxicitu daného léčiva významně snížil a umožnil cílenou biodistribuci aktivní látky ve vysoké koncentraci právě do nádorových buněk. Hyaluronan pro tyto účely jeví silný potenciál, neboť receptory hyaluronanu CD44 a RHAMM jsou exprimovány ve větším množství na povrchu některých nádorových buněk, čehož může být využito pro selektivní transport léčiva k nádorům [37].

Síťovaný hyaluronan rovněž nalézá uplatnění při hojení akutních ran a popálenin na kůži, ale i v léčbě syndromu diabetické nohy či jiných chronických, nehojících se ran. Po aplikaci krytu s hyaluronanem dojde, díky vysoké hydrofilitě hyaluronanu, k nasávání tekutiny z rány (tzv. exudát), ale i k přitahování vody z okolních tkání společně s růstovými a výživovými faktory (viz *Obrázek 8*). Tyto látky jsou pak v ráně neustále k dispozici ve vhodné koncentraci, což pozitivně působí na hojící proces. Vlhké prostředí udržované v ráně navíc podporuje obnovu a růst buněk. Výsledkem je tedy hojení poranění, které probíhá mnohem rychleji, efektivněji a případně bez jizev [38].



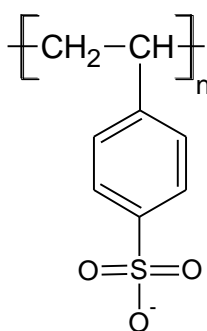
Obrázek 8: Princip hojení rány s aplikací kyseliny hyaluronové [38].

2.1.4 Poly(4-styrensulfonyl) sodný

Poly(4-styrensulfonyl) sodný (PSS) se řadí mezi syntetické hydrofilní iontové polymery, je tedy polyelektrolytem. Tento polyelektrolyt je velice dobře rozpustný ve vodě, naopak nerozpustný v nižších alkoholech. V pevném stavu jej nalezneme jako bílý prášek s bodem tání při 450 °C a hustotou 0,801 g · cm⁻³ (při 25 °C) [39].

2.1.4.1 Struktura

Jak je patrné z názvu i z *Obrázku 9*, struktura polystyrenulfonátu vychází z polystyrenu (základní opakující se jednotkou je 1-vinylbenzen), jenž je v *para* poloze na benzenovém kruhu sulfonován funkční skupinou $-\text{SO}_3^-$. Odtud pramení i jeden ze způsobů chemické přípravy – sulfonace polystyrenu, jež vede i k řadě dalších vedlejších produktů díky reakcím jako například vícenásobná substituce aromatického kruhu či síťová polymerace [40]. Další možností syntézy je pak polymerizace samotných styrenulfonátových jednotek [41].



Obrázek 9: Základní opakující se jednotka makromolekuly polystyrenulfonátu.

2.1.4.2 Využití v lékařství

Ačkoliv se PSS řadí mezi syntetické látky, hraje velice důležitou roli v lékařství, kde se využívá především jeho vlastnosti iontoměnič – slouží k léčbě hyperkalemie. Hyperkalemii se rozumí narušení homeostázy draslíku, tedy zvýšení sérové koncentrace K^+ nad $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při koncentraci K^+ $7,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a výš se jedná o stavy, které akutně ohrožují život, neboť při zvyšující se koncentraci draselných iontů v extracelulární matrix se zmenšuje akční potenciál dráždivých buněk. Vezmeme-li v úvahu, že nejvíce postižená je tedy svalovina příčně pruhovaná, hladká a srdeční, může dojít k závažným srdečním arytmiím až k celkové paralýze [42], [43]. Polystyrenulfonát pak zvyšuje vylučování draslíku střevem, neboť při průchodu zažívacím traktem zůstává nezměněn, pouze uvolňuje Na^+ či Ca^{2+} a absorbuje K^+ [44].

Polystyrenulfonát byl také zkoumán jako antikoncepční činidlo, neboť inhibuje hyaluronidázu spermií a akrosin – proteáza obsažená v akrozomu, což je „čepička“ na povrchu spermií, mezi jejíž vnitřní a vnější stěnou se nachází enzymy umožňující průnik spermie do vajíčka [45], [46]. PSS tedy způsobuje ztrátu akrozomu ze spermatu, díky čemuž nemůže dojít k vniknutí spermie do vajíčka, a tím tedy k procesu oplození, ačkoliv PSS není jako takový pro spermie cytotoxický, ani nepůsobí na pohyblivost spermií [47]. Dále byl polystyrenulfonát zkoumán jako efektivní vaginální přípravek s obsahem mikrobicidu. Mikrobicid je chemický prostředek používaný před pohlavním stykem, který zabíjí, neutralizuje nebo blokuje virus HIV a další sexuálně přenosné patogeny [48]. Bylo zjištěno, že PSS je vysoce účinný proti HIV a virům herpes simplex 1 a 2 (HSV-2 způsobuje genitální opary [49]), proti bakteriím *Neisseria gonorrhoeae*, jež je původcem kapavky [50], a *Chlamydia trachomatis*, což jsou bakterie parazitující na sliznicích způsobující chlamydiózu [51], [52]. Jeho nespornou výhodou pak je, že není cytotoxický, nezpůsobuje narušení vaginálního epitelu, tedy nepůsobí proti *Lactobacillus gasseri*, jež je přirozenou součástí

vaginální flory. Naopak působí proti *Gardnerella vaginalis*, jež způsobuje bakteriální vaginózu, což je syndrom, kdy dochází k přemnožení *G. vaginalis* a dalších mykoplazmat, jež ničí *L.gasseri* a narušují rovnováhu vnitřního prostředí [52].

2.2 Lipidy

Lipidy jsou přírodní látky rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (ether, chloroform, aceton) a prakticky zcela nerozpustné ve vodě. Představují velmi rozmanitou skupinu biomolekul, které se od sebe mohou značně lišit ve struktuře (mastné kyseliny, acylglyceroly, fosfolipidy, steroidy, izoprenoidy, ...) i funkci, na které se v živých organismech podílejí – tuky a oleje jsou významné zásobní látky a tvoří energetickou rezervu, fosfolipidy představují základní strukturní složky biomembrán. Další lipidické molekuly pak mohou tvořit hormony, antioxidanty, pigmenty, vitaminy, steroidy či růstové faktory aj. Obecně tedy můžeme říci, že lipidy mají v organismech funkci strukturní (součást biomembrán), ochrannou (tepelně a mechanicky izolující tuková tkáň, vosky na povrchu rostlin), regulační (steroidní hormony, eikosanoidy, vitaminy) a především funkci zásobní (zásobárna chemické energie) [54].

2.2.1 Rozdělení

Lipidy můžeme rozdělit hned podle několika hledisek. Toto členění rozděluje lipidy podle chemického složení a je přejato z Bloorovy klasifikace [55]:

1. Jednoduché lipidy – estery mastných kyselin s různými alkoholy.
 - a) Tuky: estery mastných kyselin s glycerolem.
 - b) Vosky: estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy.
2. Složené lipidy – estery obsahující mimo mastné kyseliny a alkohol ještě další skupiny.
 - a) Fosfolipidy: lipidy, které obsahují kromě mastné kyseliny a alkoholu i zbytek kyseliny fosforečné. Často obsahují i dusíkaté báze a další substituenty. Dělí se dále na glycerolfosfolipidy, u nichž je alkohol glycerol, a sfingolipidy, kde alkohol je sfingosin.
 - b) Glykolipidy (glykosfingolipidy): lipidy obsahující mastnou kyselinu, sfingenin a sacharidovou složku.
 - c) Ostatní složené lipidy: sulfolipidy a aminolipidy. Mohou sem být zařazeny i lipoproteiny.
3. Prekurzory a odvozené lipidy: patří sem mastné kyseliny, steroidy, alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné alkoholy a ketolátky, uhlovodíky, v tucích rozpustné vitamíny a hormony.

2.2.2 Složené lipidy

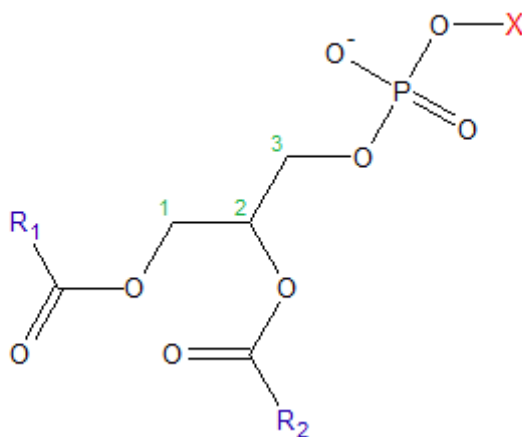
Jak již název napovídá, složené lipidy obsahují vedle mastných kyselin a alkoholu i nějakou další funkční skupinu. Pokud tuto funkční skupinu představuje zbytek kyseliny fosforečné, mluvíme o fosfolipidech. Biologicky významné fosfolipidy jsou pak glycerolfosfolipidy (alkoholem je glycerol) a sfingofosfolipidy (alkoholem je sfingosin). Další skupinu může představovat i sacharid navázaný na lipidovou část molekuly – tyto sloučeniny pak nesou

název glykolipidy. Složené lipidy mohou také obsahovat i složku se sirnou funkční skupinou – sulfolipidy, anebo s aminoskupinou – takové lipidy pak nazýváme aminolipidy. Do skupiny složených lipidů rovněž zařazujeme biologicky velice významné strukturní a transportní lipoproteiny [56].

2.2.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou molekuly, jež obsahují zbytek kyseliny fosforečné ($-OPO_3X$) esterově vázaný k alkoholu. Na tomto zbytku mohou být navázány další skupiny X jako serin, cholin, inositol aj. Tyto esterově vázané skupiny jsou společně se zbytkem kyseliny fosforečné polární a hydrofilní, propůjčují tedy fosfolipidům amfifilní charakter s nepolárními alifatickými uhlíkovými řetězci a polárními X-fosforylovanými hlavičkami. Díky obsahu hydrofilní i hydrofobní části jsou fosfolipidy označovány jako polární lipidy a mohou tvořit micely či dvojvrstvy [57].

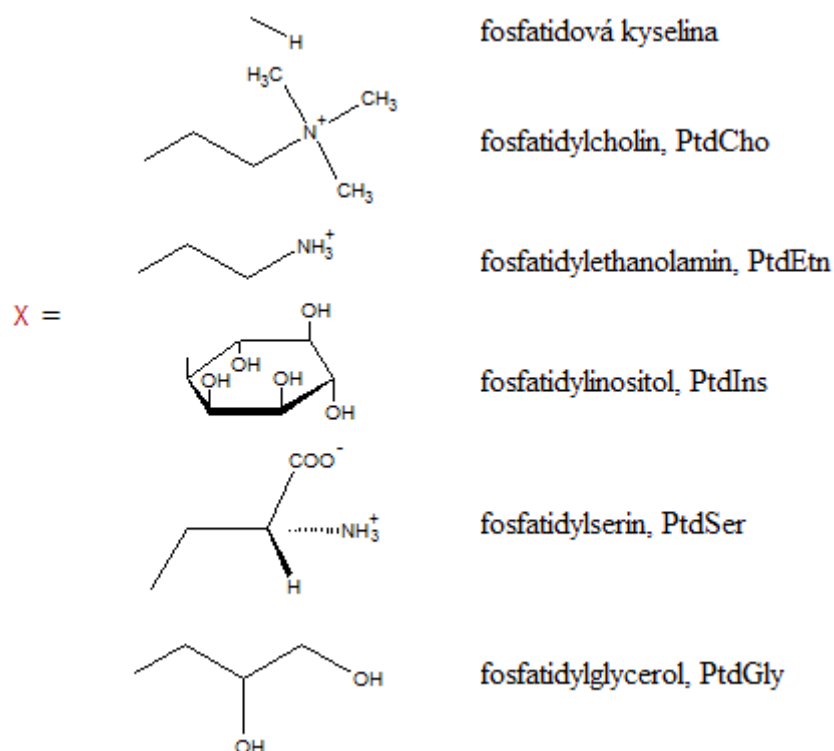
Glycerolfosfolipidy jsou jednou ze dvou hlavních biologicky významných skupin fosfolipidů. Tvoří hlavní lipidové složky biomembrán. Základní kostru tvoří, viz *Obrázek 10*, *sn*-glycero-3-fosfát (*-sn-* systém (*Stereo-chemical numbering*, tj. stereochemické číslování) se používá pro jednoznačné očíslování uhlíků glycerolu, neboť uhlíky 1 a 3 glycerolu nejsou identické, vnímáme-li je v trojrozměrném prostoru – glycerol je například vždy fosforylován glycerolkinázou na uhlíku *sn*-3 [55]), který je na uhlíkových atomech C1 a C2 esterifikován mastnými kyselinami (R_1 a R_2) a na své fosforylové skupině skupinou X, za vzniku třídy látek (viz *Obrázek 11*) [57].



Obrázek 10: Základní struktura glycerolfosfolipidů – sn-glycero-3-fosfát. Modře zbarvené R_1 a R_2 představuje uhlíkatý řetězec mastné kyseliny, červené X značí funkční skupinu esterově vázanou na fosforylovou skupinu. Zelené číslice označují číslování uhlíků na glycerolu.

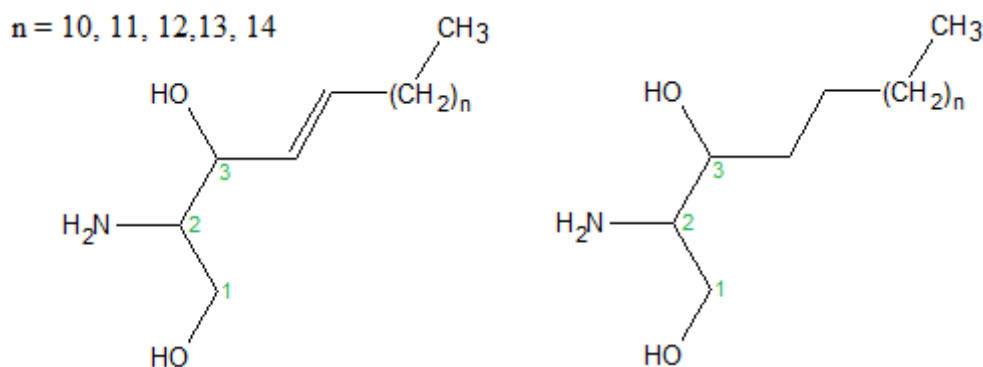
Nejjednodušší glycerolfosfolipidy, ve kterých X představuje vodík H, jsou fosfatidové kyseliny. Fosfatidová kyselina je důležitým mezistupněm při syntéze triacylglycerolů a fosfoglycerolů, ale ve tkáních se ve větším množství nevyskytuje. Veškeré ostatní fosfoacylglyceroly tedy můžeme považovat deriváty kyseliny fosfatidové, ve kterých dochází k reakci kyseliny fosfatidové s hydroxylovou skupinou ($-OH$) vhodného alkoholu za odstoupení molekuly vody, tedy esterifikaci. Do skupiny fosfoglycerolů pak zařazujeme fosfatidovou kyselinu, fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol,

fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, lysofosfolipidy, jež mají pouze jeden zbytek mastné kyseliny a plasmalogeny, které mají etherovou vazbu v pozici na *sn*-1 glycerolu [54], [55], [57], [58].



Obrázek 11: Běžné třídy glycerolfosfolipidů podle substituentu *X*. První sloupec se strukturami označuje vzorec substituentu *X* a sloupec vpravo představuje název glycerolfosfolipidu s tímto substituentem a jeho zkratku.

Druhou významnou skupinou patřící mezi fosfolipidy jsou sfingofosfolipidy, jež představují hlavní složkou některých biomembrán. Sfingolipidy neobsahují ve své molekule glycerol, ale jsou deriváty dusíkatého, osmnácti uhlíkatého alkoholu sfingosinu, či dihydrosfingosinu a jejich šestnácti, sedmnácti, devatenácti a dvaceti uhlíkatých homologů (viz Obrázek 12) [57].



Obrázek 12: Základní dusíkatý alkohol sfingofosfolipidů (vlevo) a jeho dihydro- analog (vpravo). Zelené číslice označují číslování uhlíků v této struktuře, přičemž mají znázorňovat podobnost se základním alkoholem glycerolfosfolipidů – glycerolem.

Dojde-li k navázání mastné kyseliny na dusík přes amidovou vazbu, dostaneme N-acyl-deriváty, které se nazývají ceramidy. Ceramidy se vyskytují v malé míře v rostlinných a živočišných tkáních, především ale tvoří základní složku hojnějších sfingolipidů. U sfingofosfolipidů dochází k fosforylaci na primární hydroxylové skupině za vzniku ceramid-fosfátu. Zbytek kyseliny fosforečné pak umožňuje navázání hydroxylových sloučenin, stejně jako u fosfatidů a lysofosfatidů. Významnou skupinu tvoří sfingomyeliny, což jsou ceramidy nesoucí buď fosforylethanolaminový nebo fosforylcholinový zbytek. Tyto sfingomyeliny se hojně nachází v mozku a nervové tkáni, kde se vyskytují v membránovém myelinovém pouzdře, jenž obklopuje a elektricky izoluje axony nervových buněk. Ačkoliv jsou sfingomyeliny chemicky odlišné od fosfatidylethanolaminu či fosfatidylglycerolu, jejich konformace a rozdělení nábojů je značně podobné [57], [58].

2.2.2.2 Kationtové lipidy

Kationtové lipidy se vyznačují tím, že další skupina, kterou kromě vyšších mastných kyselin a alkoholu obsahují, nese kladný náboj i při neutrálním pH. Tyto kladně nabitě lipidy se v přírodě prakticky nevyskytují. Nicméně díky kladnému náboji mohou interagovat s negativně nabitými komponentami buněk, či DNA. Roste tedy zájem o syntézu tohoto typu lipidů, které mohou být využity jako vektory v genové terapii či jako nosiče léčiv [59]. Kvůli svému náboji pak ve vodě tvoří zejména malé (< 50 nm) a málo lamelární útvary [60].

2.2.3 Lipozom – agregovaná forma lipidů

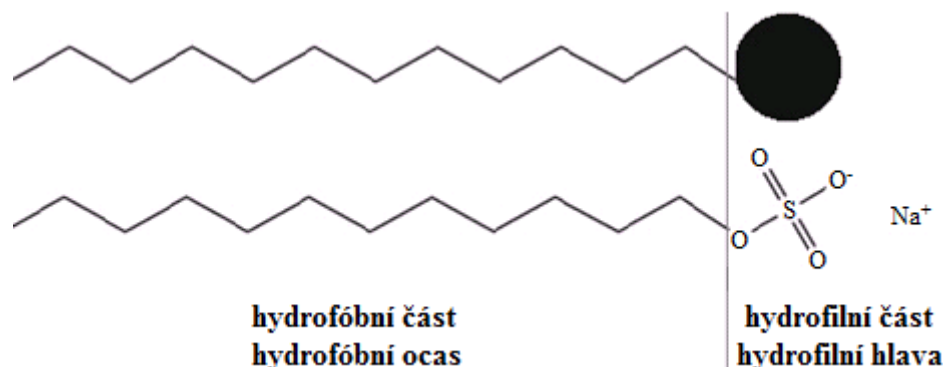
Lipidy jsou všeobecně špatně rozpustné ve vodě, protože v jejich molekule převažují nepolární skupiny. Avšak lipidy obsahující polární skupiny jako fosfolipidy, sfingolipidy a jiné, ve vodě rozpustné jsou. Vhodnou agregací jednotlivých amfifilních molekul lipidů tedy může být dosaženo struktury, která je ve vodě rozpustná, přičemž nedochází k nevýhodnému kontaktu hydrofobních oblastí s vodou. Jednou z takových struktur jsou i lipozomy. Lipozomy se poprvé objevily v publikaci v roce 1964, kdy vědci Bangham a Horne představili snímky z elektronového mikroskopu, kde byly zachyceny multilamelární fosfolipidové vezikuly (jejich vlastní objev se datuje k roku 1961 A. D. Banghamem) [61], [62]. Samotný název lipozomy navrhl G. Weismann, jenž takto pojmenoval fosfolipidové vezikuly [63].

2.2.3.1 Struktura

Lipozomy jsou sférické částice vezikulární morfologie tvořené lipidy, viz *Obrázek 14*. Jejich velikost (průměr) se pohybuje od 20 nm až po několik μm . Jsou tvořeny jednou nebo více soustřednými dvojvrstvami lipidových membrán, kdy tloušťka každé dvojvrstvy se pohybuje okolo 4 nm. Lipozomy do svého vnitřního prostoru uzavírají část okolního rozpouštědla a jsou primární bariérou všech živých buněk, neboť jsou součástí polopropustných buněčných membrán, jejichž základní součástí je fosfatidylcholin [64], [65].

Důvodem, proč dochází k tvorbě lipozomů či jiných agregovaných struktur, je shlukování amfifilních molekul, a to v důsledku upřednostňování různých druhů rozpouštědel. Všechny amfifily se totiž vyznačují tím, že jsou složeny z polárně odlišných částí – polární (hydrofilní) hlavy, která je v polárním prostředí rozpustná, a nepolárního (hydrofobního) ocasu, který je

rozpustný naopak v nepolárním rozpouštědle, viz *Obrázek 13*. Agregace amfifilních molekul je tedy podporována zejména v případě, je-li rozpouštědlo velmi nepolární nebo naopak velmi polární (voda). Hydrofobní část amfifilní molekuly je obvykle tvořena uhlíkovými řetězci, zatímco hydrofilní část tvoří nejčastěji ionogenní skupiny jako $-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{N}(\text{CH}_3)^+$ nebo neionogenní skupiny jako například $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ [66].



Obrázek 13: Schéma struktury amfifilní molekuly ve vodě – tenzid dodecylsírnan sodný.

Ve vodném prostředí se amfifilní molekuly vyskytují ve formě monomerů pouze při nízké koncentraci. Nad určitou hranicí spontánně vytváří agregované formy z důvodu dosažení stavu s nižší energií a vyšší stabilitou. Jsou-li ve vodě přítomny monomery amfifilu, dochází kolem hydrofobních částí k organizaci vody, tedy ke vzniku strukturované vody, což je doprovázeno nevýhodným snížením entropie systému. Díky agregaci hydrofobních oblastí se strukturovaná voda již nevytváří, což značně navýší entropii, přestože dochází k entropicky nevýhodné organizaci amfifilů. Hranice spontánní agregace amfifilních molekul se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). CMC je definována jako nejvyšší možná koncentrace, při níž se amfifil vyskytuje ve formě uniformních monomerů. Nad hranicí CMC dochází k samovolnému shlukování a vytváří se micely či jiné agregované formy amfifilu [67]. Kritická micelární koncentrace nejrozšířenějšího fosfolipidu DPPC ve vodě se řádově pohybuje kolem $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato velice nízká hodnota svědčí o tom, že amfifilní lipidy se ve vodném prostředí jako volné monomery téměř nevyskytují [68].

2.2.3.2 Druhy lipozomů

Rozeznáváme čtyři základní strukturní typy lipozomů [69]:

- malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles, SUV)
- velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles, LUV)
- velké multilamelární vezikuly (multilamellar large vesicles, MLV)
- multivezikulární vezikuly (multivesicular vesicles, MVV)

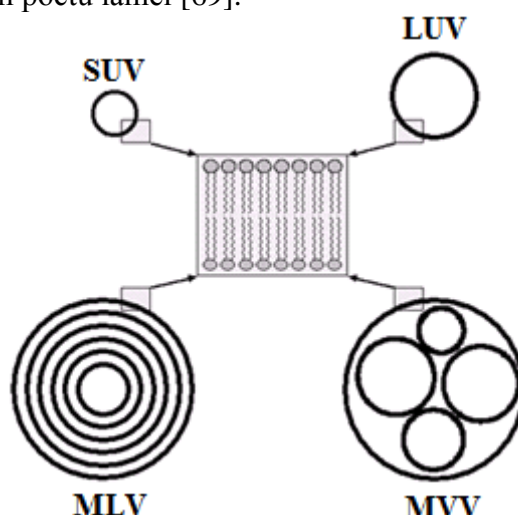
Malé unilamelární vezikuly jsou vezikuly tvořené pouze jedinou lipidovou dvojrůstvou o průměru $< 50 \text{ nm}$. Jejich membrána je značně zakřivena, takže membránové napětí je vysoké, z čehož vyplývají i specifické vlastnosti. U nejmenších lipozomů (průměr kolem 20 nm) obsahuje vnitřní vrstva téměř poloviční množství lipidů oproti vrstvě vnější. Tyto

lipozomy se vyznačují značnou nestabilitou, permeabilitou pro hydrofilní molekuly a náchylností k fúzi či interakci s velkými molekulami [69].

Velké unilamelární vezikuly jsou rovněž tvořeny jedinou lipidovou dvojvrstvou, ale vzhledem k většímu průměru (> 50 nm) vykazují nízké membránové napětí a větší stabilitu. Díky poměrně vysokému podílu obsahu vody mají potenciál jako nosiče hydrofilních léčiv. Rovněž mohou být využity jako model přirozené biologické membrány [69].

Velké oligolamelární vezikuly obsahují několik dvojvrstev membrán. Při aplikaci jako nosiče léčiv lze využít zpomaleného uvolňování léčiva díky silnější vrstvě lipidů, což dovoluje podání vyšších dávek léčiva a umožňuje prodloužení terapeutického efektu. Tyto lipozomy se tvoří zejména při přípravě velkých unilamelárních vezikul jako vedlejší produkt. MLV jsou pak tvořeny mnoha membránovými dvojvrstvami, přičemž dosahují velikosti 100–1 000 nm. Velký počet lipidových dvojvrstev rovněž zajišťuje zpomalené uvolňování inkorporovaného léčiva, což způsobuje výrazný depotní účinek [69].

Multivezikulární vezikuly značí typ lipozomu, kdy jedna větší vezikula obsahuje více menších vezikulů o různém počtu lamel [69].



Obrázek 14: Přehled základních strukturních typů lipozomů [70].

2.2.3.3 Aplikace

Nesporné přednosti lipozomů jsou široce využívány jak ve farmaceutickém, tak i kosmetickém průmyslu. Nicméně větší rozšíření perspektivních lipozomálních přípravků je dosud omezeno poměrně vysokou cenou základních surovin a technologickou náročností výroby [69].

Ve farmacii slouží lipozomy především při výrobě léčivých přípravků nové generace. Používají se jako nosiče léčiv, které při celkovém podání umožňují cílenou distribuci do postižené tkáně (*targeting*), či jako zásobníky léčiva pro řízené uvolňování. Kationtové lipozomy jsou pak často využívány v genové terapii k intracelulárnímu přenosu DNA – aplikují se jako vektory, neboť tvoří se záporně nabitou DNA tzv. lipoplexy [71]. Rovněž jsou lipozomy velice často používány jako model biologické membrány či distribuční model v biofarmacii a biofyzice [69].

V dermatologických a kosmetických přípravcích je využíváno jejich schopnosti penetrovat do hlubších vrstev kůže i přes neporušené povrchové struktury, což umožňuje vnášet léčivo do těchto spodnějších vrstev kůže [69].

2.3 Současný stav řešené problematiky

2.3.1 Agregované formy lipidů

Gzyl-Malcher a spol. se zabývali interakcemi monovrstev, které byly tvořeny kationtovým DPTAP a zwitteriontovým DPPC, s fytohormony indol-3-octové kyseliny (IAA) a selenanovými anionty ve vodném prostředí. Směs odlišných lipidů DPTAP a DPPC byla zvolena jako model membránové domény s rozdílnými elektrickými náboji. Pro účel této práce byly naměřeny, v závislosti na průměrné ploše (povrchu) molekuly, izotermy povrchového napětí. Tvorba domén byla zkoumána pomocí mikroskopie Brewsterova úhlu. Organizace lipidových částic v kondenzovaných monovrstvách byla zkoumána pomocí metody plochého dopadu rentgenového (RTG) záření.

Výsledky měření izoterem povrchového napětí a rozptylu RTG záření naznačují, že v porovnání se samotným DPTAP či DPPC dochází, při použití binární směsi lipidů DPPC a DPTAP, k výraznému zhuštění jednoduchých monovrstev lipidů. Tento zhušťující efekt může být způsoben reorientací dipólu polární hlavy DPPC tvořeného záporně nabitou fosfátovou skupinou a kladně nabitou trimethylamoniovou skupinou cholinu. Tento dipól je v případě membrány pouze z DPPC orientován paralelně s povrchem lipozomu. Po přidavku kladně nabitého DPTAP dochází k orientaci více vertikální. Malé kladně nabité polární hlavy DPTAP totiž mohou být zasunuty mezi záporně nabitou fosfátovou skupinou DPPC, což umožňuje (napomáhá) reorientaci. Zároveň může dojít k odstínění odpuzivých interakcí mezi kladně nabitými hlavami DPTAP. Dále bylo zjištěno, že selenanové ionty neutralizují kladný povrchový náboj lipozomu, což přispívá ke zhuštění monovrstev, zatímco molekuly IAA pronikají do lipidových monovrstev, což způsobuje jejich expanzi [72].

Junglas a spol. zkoumali uspořádání molekul a laterální difúzi v kationtových dvojrstvách (utvořených z DPTAP) v přítomnosti soli pomocí deuteriové NMR a mikrokolorimetrie. Získaná data pak srovnávali s daty zwitteriontového deuterovaného DPPC.

DPTAP vykazoval vyšší organizovanost jednotlivých molekul směrem k vnějšímu rozhraní dvojrstvy, přestože hodnoty uprostřed dvojrstvy byly naměřeny pro oba lipidy téměř identické. DDPC vykazoval mírně vyšší difúzní koeficient, přičemž zvýšením iontové síly se tento rozdíl navýšil (došlo k poklesu koeficientu laterální difúze DPTAP). Zdá se tedy, že ačkoliv molekuly DPTAP disponují kladným nábojem, jejich uspořádání v dvojrstvách je těsné, což způsobuje pokles laterální difuzivity. Vzhledem k prudkému poklesu uspořádání, v závislosti na zvyšující se pozici na řetězci, lze usuzovat, že kladně nabitá polární hlava má zásadní vliv na molekulové uspořádání. Avšak přídavek soli nezapříčinil změnu v charakteristice parametru uspořádání, z čehož vyplývá zásadní úloha sterických vlivů – malé polární hlavy DPTAP mohou být mnohem těsněji uspořádány než velké hlavy DPPC, z čehož pak pramení i odlišné profily parametru uspořádání molekul [60].

Regelin a spol. studovali fyzikální parametry a možnosti transfekce pomocí lipozomů z DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan) a jeho analogů s různými

hydrofobními uhlíkovými řetězci, které rovněž nesou jeden kladný náboj na trimethylamoniové skupině. U lipozomů i lipoplexů byla stanovena stabilita, velikost i fluidita. Analogy DOTAP (včetně DPTAP) byly studovány samotné nebo ve směsi s dalším lipidem – DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin) či cholesterolem, neboť přítomnost dalšího lipidu zvyšuje stabilitu lipozomů. Pro stanovení stability byla měřena distribuce velikostí lipozomů při teplotě přípravy a při následném snižování teploty (po 5 °C). Každých 15 minut tedy byla zaznamenána distribuce velikostí. Lipozomální disperze pak byla označena jako nestabilní, došlo-li k rychlému nárůstu velikostí částic během 15 minut (makroskopické agregáty byly detekovány vizuálně).

Směsné lipozomy jsou obecně charakterizovány středním průměrem < 100 nm. Lipozomy tvořené jediným kationtovým lipidem vykazovaly velikosti v rozmezí 23–50 nm, přičemž nebyla nalezena žádná závislost velikosti lipozomů na délce uhlíkového řetězce. V přítomnosti DOPE (pomocný lipid) pak byly naměřeny velikosti lipozomů v rozmezí 20–160 nm. V případě chosterolu jako pomocného lipidu to byly velikosti 53–95 nm.

U lipozomů z DPTAP bylo studováno anizotropní chování fluidity membrány při teplotách 20–60 °C. Fázový přechod, doprovázený značným snížením anizotropie, byl detekován při teplotách kolem 40 °C.

Bylo zjištěno, že pouze DOTAP tvoří při laboratorní teplotě stabilní lipozomy. Všechny jeho analogy při této teplotě tvoří částice nestabilní, což může souviset s teplotou fázového přechodu kationtových lipidů (ovlivňuje chování dvojrstvy v závislosti na teplotě). Teplota fázového přechodu pro DOTAP je < 5 °C, což může zřejmě souviset s nenasyceností vazeb uhlíkových řetězců (18:1). Pro analogy DOTAP, s nasycenými vazbami v řetězci, je teplota fázového přechodu značně vyšší, přičemž tato teplota je v korelaci s délkou řetězce. Nicméně jiné lipidy tvořící lipozomy, jako například lecitin, při teplotách pod teplotou fázového přechodu nevykazují tuto nestabilitu lipozomů. Jedinou odlišností mezi těmito typy lipidů je struktura polárních hlav – kationtová trimethylamoniová skupina analogů DOTAP a neutrální amfiontová skupina fosfocholinu lecitinu (obsahuje aniontovou fosfátovou skupinu a kationtovou trimethylamoniovou skupinu). V práci naznačují, že nestabilita lipozomů může souviset s preferencí hexagonální fáze před fází lamelární. Se snižující se velikostí polární hlavy (u kationtových lipidů) je preferována převrácená hexagonální fáze (u zwitteriontových lecitinových lipozomů se nevyskytuje přechod do hexagonální fáze až do teploty kolem 85 °C). U analogů DOTAP by tedy lipozomy v hexagonální fázi mohly způsobovat nestabilitu, což může být zapříčiněno tvorbou těsných iontových párů mezi kationtovými polárními hlavami a proti ionty při a pod teplotou fázového přechodu – dochází k odstínění elektrostatické repulze mezi stejně nabitými skupinami polárních hlav, což vyvolá snížení efektivní velikosti polární hlavy a přechod do hexagonální fáze. Přídavkem pomocného lipidu DOPE pak došlo k poklesu teploty, při které jsou lipozomy stabilní, nicméně pouze s cholesterolem došlo k poklesu až na laboratorní teplotu [73].

2.3.2 Interakce biopolymer-lipid

Crescenzi a spol. se zabývali interakcemi mezi hyaluronanem a DPPC lipozomy. Směsný vzorek HyA a lipozomů byl inkubován nad teplotou fázového přechodu DPPC. Vzniklé

struktury byly sledovány pomocí elektronové mikroskopie. Také byla provedena reologická měření.

V této práci byla pomocí elektronové mikroskopie potvrzena přítomnost supramolekulárních systémů DPPC a HyA. Reologickými měřeními bylo zjištěno, že v přítomnosti DPPC dochází k výraznému snížení viskozity vzorku, což přisuzovali interakci membrán lipozomu s řetězcí HyA pomocí hydrofobních interakcí. Tato interakce pak způsobí kolaps struktury hyaluronanu, která je odpovědná za vysokou viskozitu jeho roztoku [74].

Pasquali-Ronchetti a spol. se zabývali interakcemi hyaluronan-fosfolipid rovněž s využitím negativního barvení a elektronové mikroskopie. Do fosfolipidových suspenzí (DPPC a lecitin) byl přidáván HyA s různou molekulovou hmotností.

Ve směsných vzorcích došlo ke změnám struktury lipozomů v důsledku přidání hyaluronanu. Vzniklé útvary připomínaly proděravěné membrány a válečky (12 nm) se sklonem vytvářet listy. Tyto útvary byly pozorovány zejména v přítomnosti vysokomolekulárního hyaluronanu (1,9 MDa), nezávisle na původní lamelaritě lipozomů a typu fosfolipidu. Po inkubaci směsného vzorku při teplotě nad fázovým přechodem fosfolipidu dochází k tvorbě lineárních agregátů a vzájemně propojených krátkých řetězců z původních 15–30 nm širokých jednovrstevných částic. Vytvořená vlákna se po čase přeskupovala v užší řetězce s prakticky konstantní šířkou 12 nm, přičemž měla tendenci se sdružovat v pletivo (mřížku). V práci pak navrhli model interakce hyaluronan-fosfolipid, kde hyaluronan vytváří středové vlákno obklopené dvojrstvou fosfolipidu. Zároveň předpokládali, že tato interakce je založena na vzájemném působení mezi nabitými polárními oblastmi fosfolipidu a nabitými skupinami hyaluronanu. Nicméně nevylučovali ani možnost hydrofobní interakce mezi hydrofobními oblastmi hyaluronanu a prvními uhlíky acylového řetězce fosfolipidů [75].

Quemeneur a spol. se zabývali vlivem chemické struktury polyelektrolytů na interakce s lipozomy. Mimo jiné studovali i interakce mezi lipozomy a biokompatibilním hyaluronanem a alkylovaným hyaluronanem. Elektrostatickou interakcí hyaluronanu a lipidových dvojrstev dochází k tvorbě systému s charakteristickými vlastnostmi a zejména vysokou stabilitou. Tento systém lze aplikovat například v senzorech či jako nosič léčiv.

V této práci byla zkoumána závislost hustoty náboje HyA na adsorpci na membrány lipozomů (LUV). Závislost byla studována při dvou hodnotách pH – 3,5 a 6. Tyto dvě hodnoty pH byly voleny z důvodu různých stupňů disociace hyaluronanu. Při pH 6 je HyA značně záporně nabit (90 % karboxylových skupin je disociovaných), naopak při pH 3,5 je hustota záporných nábojů poměrně nízká (25 % karboxylových skupin je disociovaných).

Bylo zjištěno, že jakýkoliv typ hyaluronanu (nemodifikovaný či alkylovaný) může adsorbovat na membránu lipozomu a vytvořit tak záporně nabitě složené lipozomy. K adsorpci pak dochází zcela nezávisle na počátečním pH a náboji lipozomu [76].

Arpicco a spol. se zabývali studiem komplexu hyaluronanu s lipozomy, neboť tyto systémy by mohly být použity jako cílené nosiče chemoterapeutik do nádorových buněk.

Byly připraveny a charakterizovány lipozomy modifikované hyaluronanem obsahující proléčivo gemcitabinu (4-(N)-lauroyl-gemcitabin, C12GEM). Jako fosfolipid, jímž byl HyA dvou molekulových hmotností (4 800 Da a 12 000 Da) modifikován, byl použit 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin (DPPE). Samotné lipozomy nesoucí proléčivo byly připraveny z DPPC a cholesterolu (v molárním poměru 70:30). Byl studován zeta potenciál a metodou TEM byla porovnávána morfologie různých lipozomálních vzorků.

TEM testy ukázaly přítomnost sférických unilamelární váčků s velikostí 150–190 nm. V systému hyaluronanu a lipozomu byl pozorován povrchový povlak, který nebyl u lipozomů bez hyaluronanu detekován, což svědčí o tom, že molekuly hyaluronanu jsou vystaveny na povrchu lipozomu. HyA o molekulové hmotnosti 12 000 Da pak vykazuje vyšší afinitu k receptoru CD44 ve srovnání s HyA 4 800 Da. Inkorporované proléčivo způsobuje nárůst cytotoxické aktivity, oproti srovnávacím lipozomům bez proléčiva, přičemž lipozomy s modifikovaným povrchem více inhibují růst buněk. Výsledky ukazují, že komplex hyaluronanu a lipozomu může fungovat jako cílený nosič pro C12GEM proléčivo [77].

Peer a spol. se zabývali kryoprotektivním chováním hyaluronanu. Zkoumali, zda-li hyaluronan dokáže ochránit směsné částice DPPC a DPPE při lyofilizaci. Lyofilizace a následné rozptýlení farmaceutického produktu ve vodě jsou technické procesy, které nemění podstatu původních produktů u standardních látek. Nicméně u lipozomů dochází při rozptýlení lyofilizovaných lipozomů k tvorbě MLV místo původních malých ULV. Kryoprotektiva jsou tedy velice důležitá u lipozomů používaných v terapii, kde velikost částic hraje zásadní roli.

V této práci byly lipozomy míseny s aktivovaným hyaluronanem o různých koncentracích (0,5, 2 a 5 mg · cm⁻³). U těchto směsných částic byly proměřeny strukturální vlastnosti – velikost částic a zeta potenciál, a to před a po lyofilizaci.

Bylo zjištěno, že po rozptýlení lyofilizovaných částic s hyaluronanem ve vodě dochází pouze k mírnému nárůstu velikosti částic (méně než násobek původní velikosti) ve srovnání s lipozomy bez hyaluronanu (sedmnásobek původní velikosti). K tvorbě MLV dochází z důvodu odstranění veškerých molekul vody. A to i těch, které se vyskytují na povrchu lipozomů a stabilizují jejich strukturu pomocí vodíkových můstků. Při opětovné hydrataci lyofilizovaných lipozomů tedy dochází k tvorbě MLV. Hyaluronan na povrchu lipozomů pak může tuto strukturu stabilizovat pomocí tvorby vlastních H-můstků, zároveň může molekuly vody zadržovat i při lyofilizaci (vzhledem k jeho obrovské hydrofilitě a neochotě „vzdát“ se molekul vody i při sušení). Hyaluronan adsorbovaný na lipozomech tedy vykazuje kryoprotektivní chování [78].

2.3.3 Fázově separované systémy biopolymer-lipid

Tato práce zejména navazuje na studie prováděné na fakultě. Při výzkumu **Burdíkové J.**, která se zabývala agregačním chováním zwitteriontových/kationtových (DPPC/DPTAP) lipidů a vlivu hyaluronanu na formování vezikulů, bylo mimo jiné zjištěno, že u určitých vzorků dochází k fázové separaci. V této studii byly proměřeny koncentrační řady směsi lipidů s různými poměry lipidů DPPC/DPTAP (0/100, 50/50, 75/25, 80/20, 90/10), a to s hyaluronanem i bez něj. Vznik fázově separovaných systémů byl pozorován u vzorků

s koncentracemi lipidů vyšších než jejich stanovená kritická agregační koncentrace. Výsledky pak naznačují, že fázově separované systémy se tvoří při zachování určitého hmotnostního poměru lipidu DPTAP a HyA, nezávisle na obsahu DPPC ve směsi. Na základě těchto informací byla rozvržena experimentální část této diplomové práce.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Práce v laboratoři spočívala v přípravě fázově separovaných systémů založených na interakci polymer-lipid ve vodě. Lipidická složka systému byla tvořena vždy dvěma lipidy – DPPC a DPTAP, jež byly zformulovány do lipozomální struktury v různých molárních poměrech, přičemž základní poměr těchto dvou lipidů byl 50:50 (podle teoretického výpočtu tzv. „*packing parametru*“, jenž je v literatuře používán pro předpovězení typu samoseskupení amfifilních molekul, dochází, bez ohledu na poměr DPPC a DPTAP, k spontánní tvorbě lipozomů [79]). Vzhledem ke kladně nabitým trimethylamoniovým skupinám na lipidech byly polymery voleny aniontové – v této práci nejvýznamnější hyaluronan sodný, dále také chondroitin sulfát sodný a polystyrenulfonát sodný. Podstatnou podmínkou pro tvorbu fázově separovaných systémů pak bylo zachování určitého poměru mezi hmotnostní koncentrací lipidu DPTAP a polymeru. Interakce vedoucí ke vzniku fázově separovaných systémů byla následně ovlivňována změnou iontové síly v roztoku, chaotropy, kosmotropy, změnou pH, ...

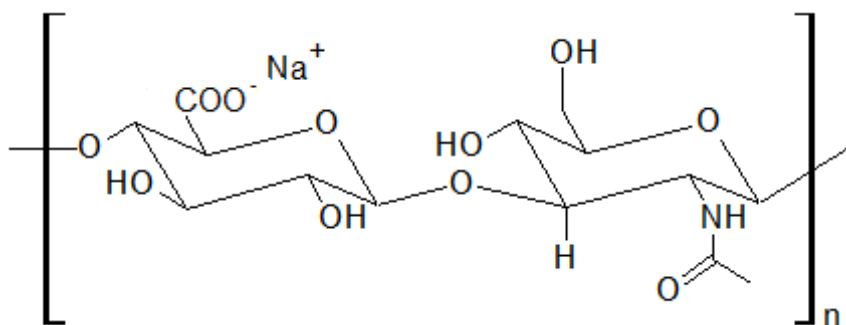
Velikost směsných lipozomů a jejich zeta potenciál byly proměřeny pomocí měření rozptylu světla (dynamického a elektroforetického). Veškeré vzniklé separované fáze byly vizuálně charakterizovány a vyfotografovány. Vybrané vzorky tvořící kompaktní fázově separované systémy byly podrobeny reologickým měřením, konkrétně oscilačním testům. Dále byla také testována schopnost solubilizace pro hydrofobní barvivo sudánovou červeň G. Složení sraženin bylo zkoumáno pomocí rentgenové fluorimetrie a elektronové skenovací mikroskopie, přičemž tyto dvě metody byly řešeny spoluprací se zaměstnanci CMV. Pomocí elektronové skenovací mikroskopie pak byla rovněž zkoumána morfologie povrchu fázově separovaných systémů.

3.1 Materiály

polymery

hyaluronan sodný (HyA)

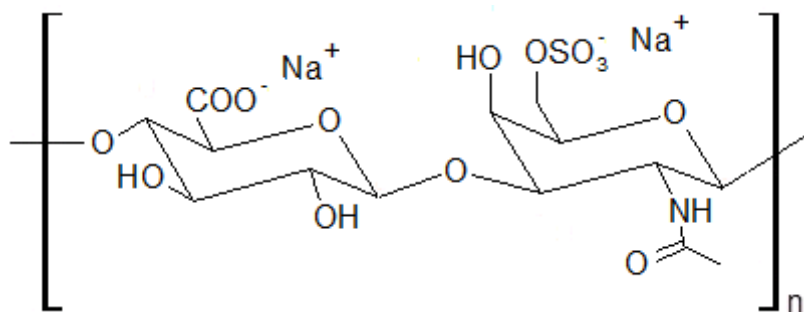
HyA $M_{monomer}$ 402,31 g·mol⁻¹, M_w : 500–750 kDa, Contipro, šarže 2013-480, CAS: 9067-32-7



Obrázek 15: Hyaluronan sodný.

chondroitin-6-sulfát sodný (CS)

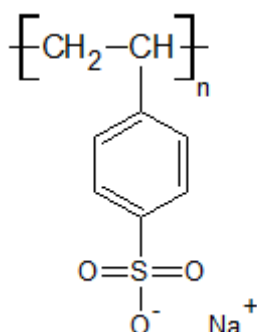
CS $M_{monomer}$ 503,35 g·mol⁻¹, Fluka, šarže 345668/1 22100, CAS: 12678-07-8



Obrázek 16: Chondroitin-6-sulfát sodný.

poly(4-styrenulfonát) sodný (PSS)

PSS M_{monomer} 206,20 g · mol⁻¹, M_w 1 000 kDa, Sigma, šarže 434574-100G, CAS: 25704-18-1

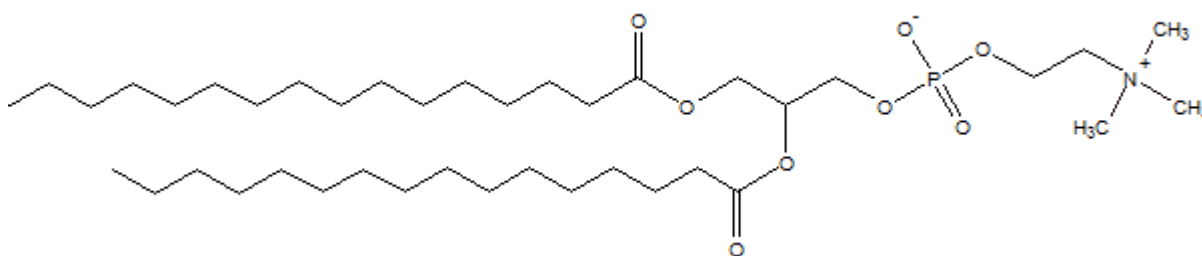


Obrázek 17: Poly(4-styrenulfonát) sodný.

lipidy

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-fosfocholin (DPPC)

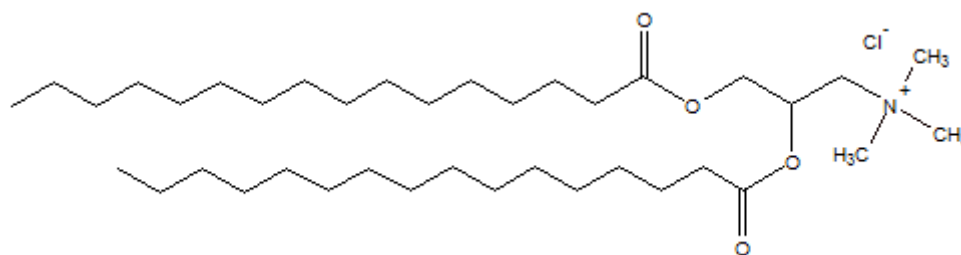
DPPC M_w 734,05 g · mol⁻¹, Avanti polar lipids, šarže: 80PC-315, CAS: 63-89-8



Obrázek 18: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-fosfocholin.

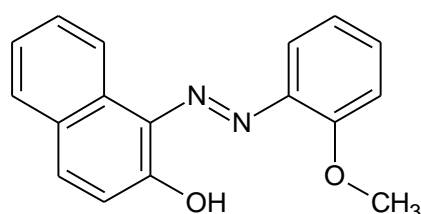
1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan (chloridová sůl) (DPTAP)

DPTAP M_w 646,47 g · mol⁻¹, Avanti polar lipids, šarže: 160TAP-36, CAS: 139984-36-4



Obrázek 19: 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamoniumpropan chloridová sůl.

hydrofobní barvivo **sudánová červeň G**
 M_w 278,28 g · mol⁻¹, Fluka, šarže 401930/1, CAS: 1229-55-6



Obrázek 20: Sudánová červeň G.

rozpouštědla

aceton

PENTA, šarže: 1212021209, CAS: 67-64-1

chloroform

Sigma-Aldrich, for UV-spectroscopy, šarže: PP/2008/05926/0, CAS: 67-66-3

superčistá voda (sytém PURELAB flex)

ostatní chemikálie

dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (NaH₂PO₄)

M_w 156,01 g · mol⁻¹, Lachema, šarže 310491101, CAS: 13472-35-0

dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)

M_w 136,09 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže PP/2009/00261, CAS: 7778-77-0

hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄)

M_w 174,18 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: 505620704, CAS: 7758-11-4

hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát (Na₂HPO₄·6H₂O)

M_w 358,14 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: 319061205, CAS: 10039-32-4

hydroxid sodný (NaOH)

M_w 40,00 g · mol⁻¹, PENTA, šarže: 1905160514, CAS: 1310-73-2

chlorid cesný (CsCl)

M_w 168,36 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: 318931205, CAS: 7647-17-8

chlorid draselný (KCl)

M_w 74,56 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: 304120306, CAS: 7447-40-7

chlorid hořečnatý, hexahydrát (MgCl₂·6H₂O)

M_w 203,31 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: PP/2012/11656, CAS: 7791-18-6

chlorid sodný (NaCl)

M_w 58,44 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: PP/2009/06278, CAS: 7647-14-5

chlorid vápenatý (CaCl)

M_w 110,99 g · mol⁻¹, Lachema, šarže: 309840802, CAS: 10043-53-4

jodid draselný (KI)

M_w 166,01 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: PP/2009/07679, CAS: 7681-11-0

močovina

M_w 60,06 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže 309000605, CAS: 57-13-6

síran měďnatý, pentahydrát (CuSO₄·5H₂O)

M_w 249,68 g · mol⁻¹, Lach:ner, šarže: PP/2014/10476, CAS: 7758-99-8

3.2 Metody

3.2.1 Příprava zásobních roztoků lipozomů.

Zásobní roztok lipozomů byl připraven tak, že do vialky bylo na analytických vahách naváženo příslušné množství jednotlivých lipidů (v různých poměrech jejich molárních koncentrací). Tato směsná navážka byla poté rozpuštěna v minimálním množství chloroformu (asi 0,5 ml pro přípravu zásobního roztoku o objemu 25 ml). Následně byla vialka ponechána volně na vzduchu, aby došlo k odpaření chloroformu. Po odpaření veškerého chloroformu bylo do vialky pipetováno rozpouštědlo v množství menším než finální objem zásobního roztoku. Takto připravený roztok byl sonifikován při 55°C tak dlouho, dokud nebyl opaleskující (přibližně pár hodin). Roztok byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky a jeho objem byl příslušným rozpouštědlem doplněn po rysku. Připravený zásobní roztok byl uchováván v lednici při 4 °C.

Takto byly připraveny základní lipozomální roztoky DPPC a DPTAP o celkové koncentraci 1 mmol · dm⁻³ v poměru molárních koncentrací 50:50, takže koncentrace každého lipidu v roztoku činila 0,5 mmol · dm⁻³. Následně byly připraveny lipozomální roztoky DPPC a DPTAP rovněž o celkové koncentraci 1 mmol · dm⁻³ avšak s různými molárními poměry jednotlivých lipidů (95:5, 90:10, 85:15, 15:85, 10:90 a 5:95), tedy koncentrační řada jednotlivých lipidů v lipozomálním roztoku, viz *Tabulka 1*.

Tabulka 1: Molární poměry lipidů DPPC a DPTAP v zásobních 1mM lipozomálních roztocích, tedy koncentrační řada DPTAP ve směsi.

molární poměr DPPC:DPTAP	c_{DPTAP} [mmol · dm ⁻³]	c_{DPTAP} [mg · dm ⁻³]
95:5	0,05	32,3
90:10	0,1	64,6
95:15	0,15	97,0
50:50	0,5	323,2
15:85	0,85	549,5
10:90	0,9	581,8
5:95	0,95	614,1

3.2.2 Příprava zásobních roztoků polymerů.

Zásobní roztoky polymerů byly připraveny navážením příslušného množství polymeru, přidavkem požadovaného množství rozpouštědla – voda – a následným ponecháním na magnetické míchačce až do úplného rozmíchání a homogenizace roztoku. Veškeré zásobní roztoky polymerů byly rovněž uchovávány v lednici při 4 °C.

Roztoky polymerů byly připravovány v různých poměrech hmotnostních koncentrací vzhledem k hmotnostní koncentraci DPTAP v lipozomálním roztoku, se kterým byly následně míseny. Protože hmotnostní koncentrace DPTAP v základním lipozomálním roztoku (molární poměr lipidů 50:50) činí $323 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, byly jako tři základní koncentrace polymerů voleny koncentrace $107 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $320 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, tedy poměr hmotnostních koncentrací DPTAP/polymer **3**, **2** a **1**. Rovněž byly připraveny roztoky PSS a CS v takové koncentraci, aby byl počet nábojů stejný jako v zásobním roztoku hyaluronanu s koncentrací $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (poměr 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/HyA), viz *Tabulka 2*. Pro mísení s lipozomálními roztoky s různým molárním poměrem jednotlivých lipidů byl zvolen hyaluronan, jakožto stěžejní polymer této práce. Byly tedy připraveny roztoky hyaluronanu v takové koncentraci, aby byl zachován poměr 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/HyA, tedy zásobní roztoky o koncentracích 16, 32, 49, 275, 291 a $307 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tabulka 2: Molekulové hmotnosti polymerů, jednotlivé nabitě skupiny na monomeru a koncentrace zásobních roztoků polymerů se stejným množstvím náboje v daném objemu.

polymer	molekulová hm. monomeru [g · mol ⁻¹]	nabitě skupiny monomeru	koncentrace zásobního roztoku [mg · dm ⁻³]	$c_{\text{DPTAP}}/c_{\text{polymer}}$ ve vzorku [mg · dm ⁻³]
hyaluronan	402,31	COO ⁻	160	2,0
chondroitin sulfát	503,35	COO ⁻ OSO ₃ ⁻	100	3,2
polystyrenulfonát	206,20	SO ₃ ⁻	82	3,9

3.2.3 Příprava rozpouštědel

V této práci byly kromě superčisté vody použity jako vodná prostředí také 0,15M roztok chloridu sodného a pufr (zkoumání stability gelovité struktury po přidavku NaOH do vzorků v různých prostředích). 0,15M roztok NaCl byl připraven navážením požadovaného množství chloridu sodného, rozpuštěním v menším objemu vody v odměrné baňce a následným doplněním po rysku. Postup přípravy pufru byl zcela analogický, pouze bylo naváženo kromě požadovaného množství chloridu sodného rovněž příslušné množství dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného. Veškeré zásobní roztoky rozpouštědel byly uchovávány při laboratorní teplotě.

3.2.4 Příprava vzorků

3.2.4.1 *Systém polymer-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50*

Pro studium vlivu poměru hmotnostní koncentrace DPTAP a polymeru bylo do centrifugační zkumavky pipetováno vždy 0,5 ml základního zásobního roztoku lipozomů a 0,5 ml daného polymeru o příslušné koncentraci. Směs byla následně důkladně promíchána na Vortexu a ponechána při laboratorní teplotě. Jelikož byly obě složky pipetovány ve stejném objemu, finální koncentrace složek ve vzorcích je poloviční. I takto malá koncentrace ekvimolární směsi lipidů DPPC a DPTAP ve vzorku ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) je však stále vyšší než její kritická agregační koncentrace, jež je ve vodě $0,046 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [80].

3.2.4.2 *Systém polymer-lipid s různým molárním poměrem lipidických složek*

Vliv molárního poměru lipidických složek v lipozomálním roztoku byl zkoumán pouze v kombinaci s polymerem hyaluronanem. Vždy 0,5 ml jeho roztoku bylo tedy postupně míseno s 0,5 ml jednotlivých vzorků koncentrační řady lipidů v lipozomálním roztoku.

3.2.4.3 *Systém polymer-lipid se solubilizovaným hydrofobním barvivem*

Z důvodu ověření možnosti solubilizace hydrofobní látky do lipozomů byly připraveny zásobní roztoky lipozomů se súdánovou červení G. Ty byly připraveny tak, že nejprve byl připraven zásobní roztok súdánové červeně G v těkavém rozpouštědle (acetonu) s koncentrací 10^{-4} M. Ten byl připraven navážením příslušného množství barviva, jeho rozmícháním v menším objemu rozpouštědla a následným doplněním na požadovaný objem v odměrné baňce. Lipozomální roztok se solubilizovaným barvivem byl připraven pipetováním takového množství zásobního roztoku súdánové červeně G v acetonu (10^{-4} M), aby po odpaření veškerého těkavého rozpouštědla a doplnění základním lipozomálním roztokem (s molárním poměrem lipidů 50:50), byla konečná koncentrace súdánové červeně G v roztoku lipozomů 10^{-6} M. Lipozomální roztok se súdánovou červení G byl následně ponechán na třepače 24 hodin, aby byla zabezpečena solubilizace veškerého barviva.

Rovněž byly připraveny systémy polymer-lipid se solubilizovaným hydrofobním barvivem súdánovou červení G z důvodu potvrzení struktury fázově separovaného systému polymer-lipid. Vzorek byl připraven smísením 0,5 ml roztoku polymeru s 0,5 ml lipozomálního roztoku se solubilizovanou súdánovou červení G v centrifugační zkumavce.

3.2.4.4 *Ovlivňování interakcí vedoucích k fázové separaci*

Interakce mezi oběma složkami byla ovlivňována u standardně připravených vzorků (připravených smísením 0,5 ml roztoku polymeru s 0,5 ml roztoku lipozomů s lipidy v ekvimolárním množství) zejména přidávkem rozličných typů solí, jak je znázorněno v *Tabulce 3*. Příslušné množství látky bylo naváženo a převedeno do zkumavky se vzorkem. Směs byla poté důkladně promíchávána na Vortexu až do úplného rozpuštění přidané látky a následně ponechána při laboratorní teplotě.

Tabulka 3: Látky, s nimiž byla ovlivňována interakce mezi polymery a lipozomy.

ovlivnění pomocí	látka
ionotvá síla	NaCl, CaCl ₂ , CuSO ₄ , MgCl ₂
chaotropy	KH ₂ PO ₄ , KCl, KI, CsCl, močovina
kosmotropy	KH ₂ PO ₄ , NaOH

3.2.5 Měření rozptylu světla

Metoda měření rozptylu světla (dynamického a elektroforetického) byla použita na zásobní roztoky směsných lipozomů.

Pro účel této diplomové práce bylo provedeno měření velikosti částic a zeta potenciálu. Toto měření bylo provedeno na přístroji Nano Zetasizer od firmy Malvern Instruments. Velikost částic i zeta potenciál každého vzorku byl proměřen celkem třikrát ve dvou sériích z důvodu reprodukovatelnosti výsledků. Výsledkem byla závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic a hodnota zeta potenciálu.

Metoda měření dynamického rozptylu světla na částicích vzorku probíhala ve skleněných kyvetách při konstantní teplotě 25 °C, kterou udržoval termostat. Před každým měřením byl nastaven tzv. „*equilibration time*“, který měl během 120 vteřin zajistit dosažení měřící teploty. Poloha v kyvetě, ve které laser přístroje o vlnové délce 633 nm snímá rozptyl světla částic, byla volena individuálně podle jednotlivých vzorků. Rozptyl světla byl měřen ve 173° – detekce zpětného rozptylu. Metoda měření elektroforetického rozptylu světla částic byla měřena ve skleněné kyvetě s vloženou dip celou, která obsahuje elektrody pro zavedení elektrického proudu do vzorku. Měření probíhalo rovněž při teplotě 25 °C.

3.2.6 Reologická měření

Pro reologická měření byly použity vzorky fázově separovaných systémů polymer-lipid (s poměrem 2 hmotnostní koncentrace DPTAP/polymer) po ovlivnění vzájemné interakce hydroxidem sodným. Dále byl jako vzorek srovnávací proměřen vzorek lipozomálního roztoku s přidavkem stejného množství hydroxidu sodného.

Pro tuto diplomovou práci byly provedeny dynamické oscilační testy. Měření probíhalo na rotačním reometru DISCOVERY HR2 od firmy TA Instruments s měřicí geometrií deska-deska s průměrem horní ocelové desky 20 mm. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát z důvodu reprodukovatelnosti výsledků.

Měření probíhala při konstantní teplotě 25° C, což zabezpečoval termostat, navíc byl před začátkem každého měření uskutečněn tzv. „*conditioning step*“, během kterého došlo ke stabilizaci měřicích podmínek. Aby přístroj měřil frekvenční závislost při optimální amplitudě deformace, v lineární oblasti viskoelastivity, bylo před každým měřením provedeno měření amplitudových testů, což je závislost modulů na měnící se amplitudě deformace. Toto měření bylo provedeno v rozsahu 0,01 % až 1 000 % při konstantní hodnotě frekvence oscilací 10 rad·s⁻¹. Na základě těchto měření byla vybrána jako optimální amplituda deformace 1 %. Viskoelastické vlastnosti všech vzorků byly následně měřeny při měnící se frekvenci oscilací v rozmezí 100 rad·s⁻¹ až 0,1 rad·s⁻¹.

3.2.7 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro skenovací elektronovou mikroskopii byly vybrány vzorky fázově separovaných systémů polymer-lipid s poměrem 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/polymer, přičemž fázově separovaný systém s chondroitin sulfátem byl proměřen ze vzorku s poměrem 3,2 DPTAP/CS.

Pro tuto diplomovou práci byla studována morfologie povrchu jednotlivých vzorků pomocí zpětně odražených elektronů. Rovněž byla provedena prvková analýza pomocí analyzátoru rentgenového záření. Měření probíhala s využitím skenovacího elektronového mikroskopu Jeol JSM-7600F.

Vzhledem k nutnosti absence jakékoliv vlhkosti ve vzorku (přístroj pracuje ve vysokém vakuu) byly vzorky připraveny odsátím vodného supernatantu nad odstředěnými fázově separovanými systémy v centrifugační zkumavce a následným ponecháním volně na vzduchu až do odpaření veškeré zbytkové vlhkosti. Suché vzorky pak byly pomocí skalpelu vyjmuty ze zkumavky a uchyceny na podložku. Následovalo pokovování vzorku v naprašovacím zařízení Automatic Sputter Coater a poté samotná měření ve skenovacím elektronovém mikroskopu.

3.2.8 Rentgenová fluorimetrie

Metodou rentgenové fluorimetrie byly proměřeny fázově separované systémy polymer-lipid s poměrem 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/polymer. Fázově separovaný systém obsahující chondroitin sulfát byl rovněž proměřen ze vzorku, jenž obsahoval chondroitin sulfát v poměru 3,2 hmotnostní koncentrace DPTAP/CS. Jako srovnávací vzorky byly použity supernatanty nad jednotlivými odstředěnými fázově separovanými systémy.

Vzorky byly připraveny filtrací za sníženého tlaku přes membránu s póry o velikosti 45 μm .

Samotné měření pak bylo provedeno ve spolupráci se zaměstnancem CMV, Ing. Pavlem Šilerem, Ph.D., jenž vzorky proměřil.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V následujících kapitolách bude velice často zmíněn určitý poměr hmotnostních koncentrací lipidu DPTAP a polymeru. Pro přehlednost a větší srozumitelnost bude uváděno pouze například „poměr 3 DPTAP/polymer“, čímž je míněn poměr hmotnostních koncentrací, nebude-li uvedeno jinak.

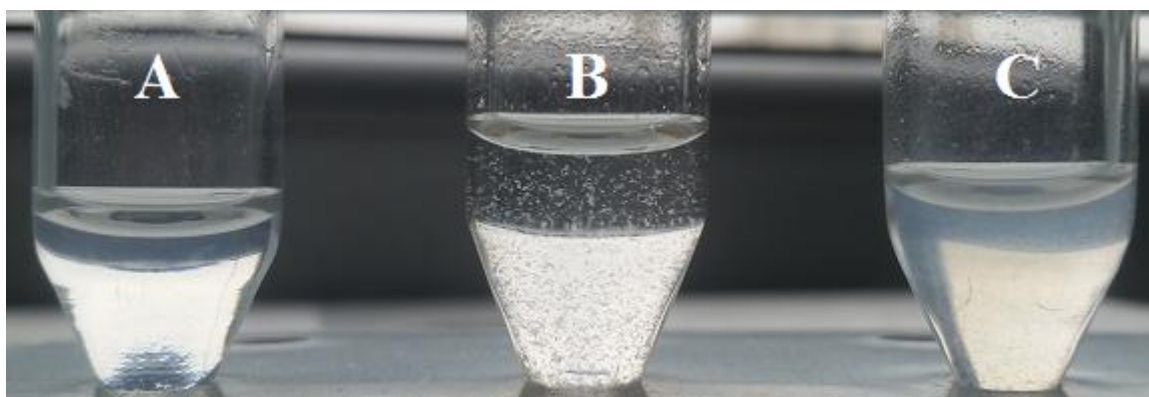
4.1 Vliv hmotnostního poměru DPTAP/polymer v systému polymer-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50

Po smísení roztoku polymeru se základním ekvimolárním lipozomálním roztokem (tedy v molárním poměru lipidů 50:50) byly v centrifugačních zkumavkách pozorovány různé podoby systému polymer-lipid v závislosti na hmotnostním poměru lipidu DPTAP a polymeru, jak shrnuje *Tabulka 4 a Obrázek 21, 23 a 25*. Bylo zjištěno, že u všech vzorků dochází k fázové separaci při poměru 2 DPTAP/polymer. Během dlouhodobého pozorování pak bylo zjištěno, že nedochází k žádným výrazným změnám v charakteru systémů, pouze k sedimentaci fázově separovaných částic, viz *Tabulka 4*.

Tabulka 4: Výsledky vizuálního pozorování systémů polymer-lipid s různým poměrem hmotnostních koncentrací DPTAP/polymer.

polymer	$c_{\text{DPTAP}}/c_{\text{polymer}}$ [mg · dm ⁻³]	vizuální pozorování
HyA	3	opaleskující roztok; časem frakce sedimentuje – vortexováním opět opaleskující roztok
	2	sraženina, sedimentuje roztok nad sraženinou čirý
	1	zákal, částice velice jemné, lze je pozorovat okem, časem dochází k sedimentaci
CS	3	sraženina, časem sedimentuje roztok nad sraženinou čirý
	2	sraženina, časem sedimentuje roztok nad sraženinou čirý
	1	opalescence, velice jemné částice pozorovatelné okem pouze při rozvření, sedimentují – vortexováním opaleskující roztok s viditelnými částicemi
PSS	3	sraženina, sedimentuje roztok nad sraženinou čirý
	2	sraženina, sedimentuje roztok nad sraženinou čirý
	1	opaleskující roztok, drobné částice lze pozorovat okem, dochází k sedimentaci – vortexováním opět roztok s pozorovatelnými částicemi

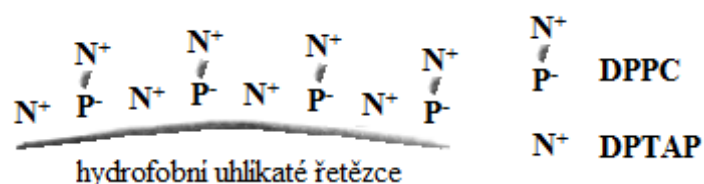
4.1.1 Systém hyaluronan-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50



Obrázek 21: Fotografie systémů hyaluronan-lipid s různým hmotnostním poměrem DPTAP/hyaluronan. A) poměr 3 – HyA $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, B) poměr 2 – HyA $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, C) poměr 1 – HyA $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Obrázek 21 znázorňuje systémy hyaluronan-lipid s různým hmotnostním poměrem lipidu DPTAP a hyaluronanu. Konkrétně se jedná o poměry 3 (HyA $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), 2 (HyA $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 1 (HyA $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

U hyaluronanu dochází k výrazné fázové separaci především v případě, kdy je poměr hmotnostní koncentrace DPTAP a HyA roven dvěma (viz Obrázek 21 – B). Toto je způsobeno zřejmě z důvodu vhodné koncentrace záporných nábojů karboxylových skupin na D-glukuronové kyselině. Lipozomy tvořené kationtovým lipidem (DPTAP) a zwitteriontovým lipidem (DPPC) si lze zjednodušeně představit jako kladně nabitě vezikuly. V návrhu povrchové struktury lipozomu (viz Obrázek 22), podle teorie Gzyl-Malchera a spol. [72], je předpokládáno, že při ekvimolárním množství obou lipidů při přípravě, vznikají lipozomy, jejichž lamely jsou tvořeny střídavě molekulou DPPC a DPTAP. Tím by mělo být dosaženo nejstabilnější struktury, neboť při tomto uspořádání jsou odstíněny repulze mezi kladně nabitými hlavami lipidu DPTAP, jelikož tyto menší kladně nabitě hlavy lipidu DPTAP jsou vsunuty mezi záporně nabitě fosfátové skupiny DPPC. Zároveň nedochází k přímému kontaktu mezi kladně nabitou trimethylamoniovou skupinou cholinu DPPC a trimethylamoniovou skupinou DPTAP.



Obrázek 22: Návrh orientace nabitých skupin polárních hlav na povrchu lipozomu tvořeného zwitteriontovým lipidem DPPC a kationtovým DPTAP v ekvimolárním poměru podle teorie Gzy-Malchera a spol.

Lipozomy pak mohou, při vhodné koncentraci záporných nábojů na polymeru, s tímto polymerem elektrostaticky interagovat, což se projeví fázovou separací a vznikem sraženiny,

kteřá by mohla mít podobu trojrozměrné struktury s uzlovými oblastmi tvořenými právě kladnými vezikuly.

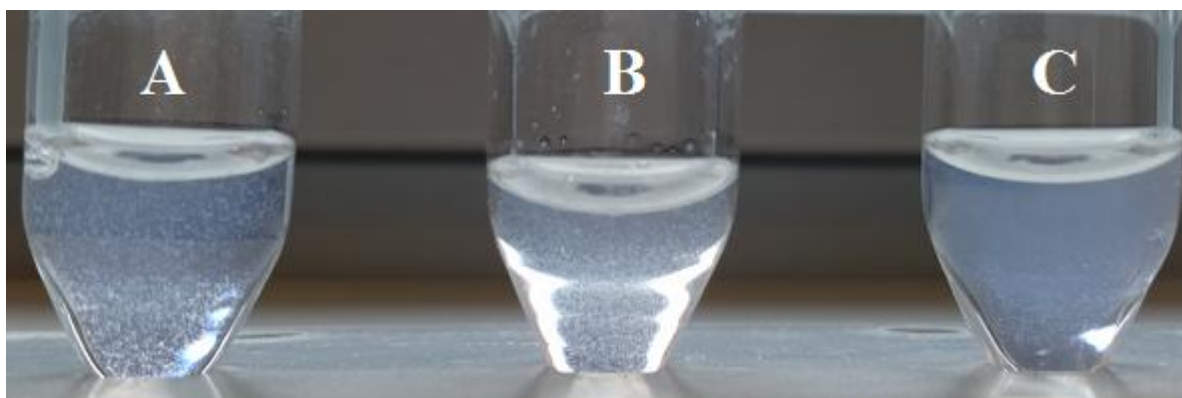
Tuto hypotézu by pak potvrzoval i vznik opaleskujícího roztoku v případě poměru 3 DPTAP a hyaluronanu (viz *Obrázek 21 – A*). V tomto případě se v roztoku zřejmě nachází velké množství kladně nabitých lipozomů, ale v porovnávání s předchozím případem (poměr 2 DPTAP/HyA) jen malé množství polymeru nesoucího záporný náboj. Řetězce hyaluronanu pak s lipozomy opět interagují. Vzhledem k repulzím mezi kladně nabitými lipozomy a v podstatě žádným elektrostatickým ani sterickým omezením pro hyaluronan, kdy je ho v roztoku málo, by mohlo docházet ke struktuře připomínající perlový náhrdelník, stejně jako tomu je při interakci hyaluronanu s micelami tvořenými kationtovými tenzidy. Dlouhé řetězce hyaluronanu tedy interagují s vezikuly, přičemž ty jsou mezi sebou neustále udržovány v určité vzhlednosti kvůli repulzím. Zároveň je, kvůli nízké koncentraci hyaluronanu, velice nepravděpodobné, že dojde k situaci, kdy jeden lipozom elektrostaticky interaguje s velkým počtem řetězců hyaluronanu současně, aby došlo k vzniku provázanější struktury s uzlovými oblastmi tvořenými lipozomy, která se následně fázově separuje. Díky této struktuře pak lze pozorovat opalescenci, která je způsobena jednotlivými koloidními vezikuly stejně jako v případě samotného roztoku lipozomů.

V případě poměru 1 DPTAP a hyaluronanu (viz *Obrázek 21 – C*) se ve vzorku nachází již větší množství polyelektrolytu a tedy i záporných nábojů, které jsou k dispozici k případné interakci s kladně nabitými vezikuly. Mezi těmito souhlasnými náboji však rovněž dochází k repulzi. Ve vzorku by se tedy mohly nacházet řetězce hyaluronanu elektrostaticky interagující pouze s jediným lipozomem. Vznikaly by tedy úvary připomínající lipozomy pokryté hyaluronanem, čímž by došlo k vysycení záporných nábojů na těchto řetězcích hyaluronanu, což by mělo být žádoucí kvůli jeho vyšší koncentraci. Množství kladně nabitých lipozomů pak zřejmě nestačí k tvorbě dostatečného počtu uzlů mezi větším počtem řetězců hyaluronanu. Nedochozí proto ke vzniku větších trojrozměrných struktur, ale pouze ke vzniku malých fázově separovaných systémů, což lze pozorovat jako velice jemné částice při rozvíření vzorku. Tyto částice jsou již pozorovatelné pouhým okem, jejich velikost je tedy větší než 50 μm . Vzorek pak sice vykazuje opalescenci, v porovnání se vzorkem *A* (poměr 3 DPTAP/polymer) se však jeví zakalenější, neboť obsahuje i hrubodisperzní, okem pozorovatelné, částice.

4.1.2 Systém chondroitin sulfát-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50

Obrázek 23 znázorňuje systémy chondroitin sulfát-lipid s různým hmotnostním poměrem lipidů DPTAP a chondroitin sulfátu. Konkrétně se jedná o poměry 3 (CS 54 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), 2 (CS 80 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 1 (CS 160 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Chondroitin sulfát, na rozdíl od hyaluronanu, tvoří fázově separované systémy v případě poměrů 2 ale i 3 DPTAP/CS, viz *Obrázek 23 – A, B*. Tato skutečnost je zřejmě způsobena vyšší hustotou záporných nábojů na řetězci, kdy každý sacharid opakující se disacharidové jednotky obsahuje jeden záporný náboj, a rovněž i jiným typem disociovatelných skupin (kromě karboxylové skupiny je to rovněž skupina sulfátová).



Obrázek 23: Fotografie systémů chondroitin sulfát-lipid s různým hmotnostním poměrem DPTAP/chondroitin sulfát. **A)** poměr 3 – CS $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, **B)** poměr 2 – CS $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, **C)** poměr 1 – CS $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Protože chondroitin sulfát obsahuje v rámci jediného monomeru při $\text{pH} > 4$ dvě disociující skupiny poskytující záporný náboj [81], přičemž hmotnost tohoto monomeru je vyšší než hmotnost monomeru hyaluronanu, byl proveden přepočítání hmotnostní koncentrace chondroitin sulfátu. Přepočítání bylo provedeno tak, aby při standardní přípravě vzorku (viz kapitola 3.2.4.1) byl pipetován stejný počet záporných nábojů jako v případě vzorku DPPC, DPTAP a hyaluronanu o koncentraci $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo vypočteno, že koncentrace chondroitin sulfátu ve vzorku by tedy měla být $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (viz Tabulka 2), přičemž poměr hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP v lipozomálním roztoku a chondroitin sulfátu by měl být 3,2.

Obrázek 24 zachycuje vzorek fázově separovaného systému chondroitin sulfát-lipid s poměrem 3,2 DPTAP/CS, tedy se stejným množstvím disociovaných skupin nesoucích záporný náboj jako vzorek s poměrem 2 DPTAP/HyA. Jak je z fotografie patrné, tento vzorek vykazuje stejné chování jako hyaluronan s charakteristickým poměrem 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/hyaluronan. U tohoto vzorku tedy také došlo k fázové separaci, což svědčí o zásadním vlivu množství disociovaných skupin nesoucích záporný náboj na řetězcích polymeru, které při fázové separaci elektrostaticky interagují s kladnými náboji na lipozomech.

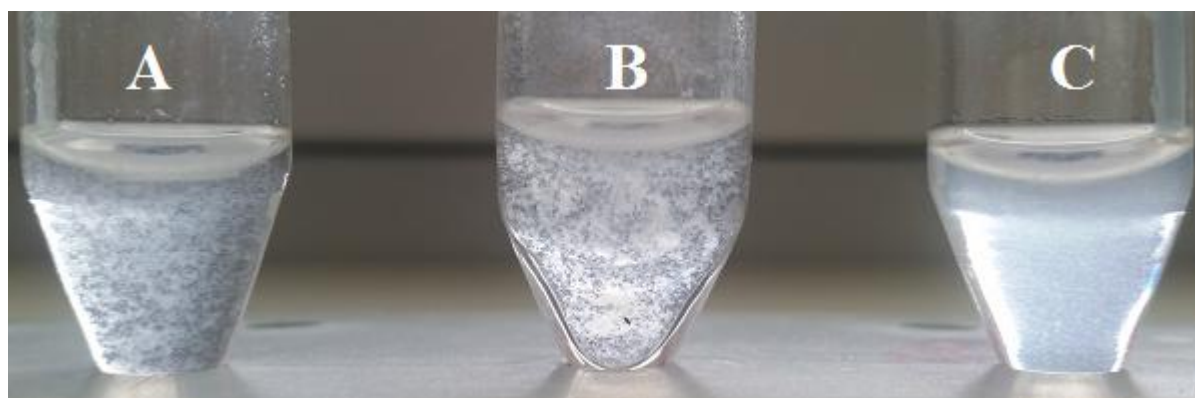


Obrázek 24: Fotografie fázově separovaného systému chondroitin sulfát-lipid s poměrem 3,2 (CS $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a chondroitin sulfátu.

Při přepočtech ostatních hmotnostních koncentrací chondroitin sulfátu v poměru množství nábojů vzhledem ke vzorkům s hyaluronanem bylo zjištěno, že vzorek s poměrem 1 DPTAP/HyA, tedy s hyaluronanem o koncentraci ve vzorku $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, odpovídá hmotnostní koncentraci chondroitin sulfátu ve vzorku $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorek s hmotnostní koncentrací chondroitin sulfátu $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Obrázek 23 – C), tedy nábojově odpovídá vzorku s hyaluronanem s poměrem 0,6 DPTAP/HyA. Tento vzorek s chondroitin sulfátem pak již není zakalený, ale opaleskuje, na rozdíl od vzorku s hyaluronanem při poměru 1 DPTAP/HyA (Obrázek 21 – C). Dá se proto předpokládat, že při malých poměrech DPTAP/polymer, je upřednostňována elektrostatická interakce řetězců s jediným lipozomem. I u vzorků s chondroitin sulfátem tedy může být aplikována teorie naznačená v předchozí kapitole 5.1.1. Při poměru 3,2 je ve vzorku přítomno vhodné množství záporných nábojů na řetězcích chondroitin sulfátu, dochází tedy k fázové separaci, přičemž sraženiny jsou poměrně veliké. Můžeme tedy usuzovat, že sraženiny jsou tvořeny mnoha řetězci CS a lipozomy, přičemž jediný řetězec interaguje s více lipozomy. Při snižování poměru kationtového lipidu DPTAP a polymeru pak sice množství lipozomů zůstává konstantní, ale zvyšuje se množství polyelektrolytu, takže dochází k repulzím mezi zápornými náboji na řetězcích. V důsledku toho pak nedochází k vzniku velkých sraženin, ale pouze menších fázově separovaných částic pozorovatelných okem. Při poměru DPTAP/CS, který nábojově odpovídá poměru 0,6 DPTAP/HyA, pak je již množství odpuzujících se záporných nábojů tak velké, že je především upřednostňováno vysycení těchto nábojů, takže řetězce interagují zejména s jediným lipozomem.

4.1.3 Systém polystyrensulfonyl-lipid s molárním poměrem lipidických složek 50:50

Obrázek 25 zobrazuje systémy polystyrensulfonyl-lipid s různým hmotnostním poměrem lipidu DPTAP a polystyrensulfonylu. Konkrétně se jedná o poměry 3 (PSS $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), 2 (PSS $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 1 (PSS $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).



Obrázek 25: Fotografie systémů polystyrensulfonyl-lipid s různým hmotnostním poměrem DPTAP/polystyrensulfonylu. A) poměr 3 – PSS $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, B) poměr 2 – PSS $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, C) poměr 1 – PSS $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Jak je z Obrázku 25 zřejmé, u polystyrensulfonylu dochází k fázové separaci při poměrech 3 i 2 DPTAP/PSS, stejně jako u předchozího chondroitin sulfátu. I zde by se tedy dala uplatnit

stejná hypotéza vzniku odlišných systémů polymer-lipid založená na elektrostatických interakcích přítomných záporných nábojů, na řetězcích polymeru, s kladně nabitými lipozomy.

Pokud však vezmeme v úvahu, že polystyrensulfonát obsahuje na každé své monomerní jednotce jednu sulfonovou skupinu nesoucí záporný náboj, je třeba opět provést přepočítání hmotnostní koncentrace polystyrensulfonátu, stejně jako tomu bylo u chondroitin sulfátu, viz kapitola 4.1.2. Jelikož je molekulová hmotnost polystyrensulfonátu $206,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, jeho koncentrace ve vzorku by tedy měla být $41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, což odpovídá poměru 3,9 hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a polystyrensulfonátu, jak uvádí *Tabulka 2*.



Obrázek 26: Fotografie fázově separovaného systému polystyrensulfonát-lipid s poměrem 3,9 (PSS $41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a polystyrensulfonátu.

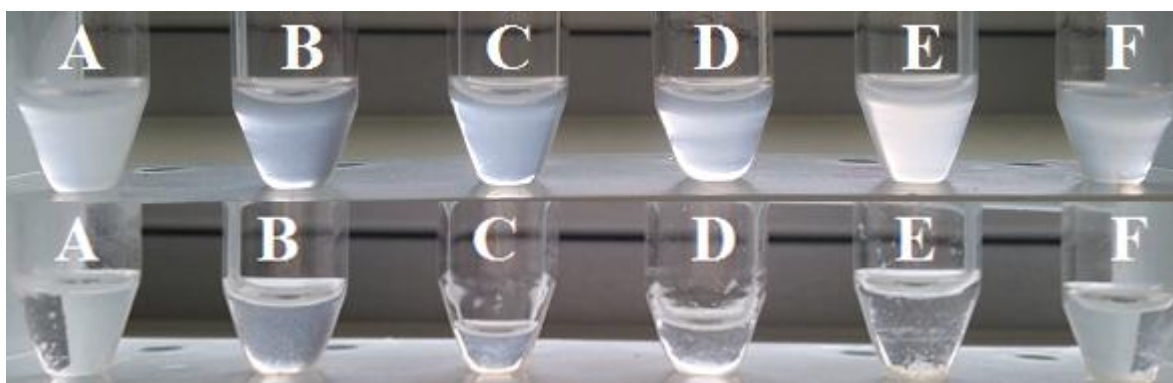
Obrázek 26 znázorňuje fázově separovaný systém s polystyrensulfonátem o přepočtené hmotnostní koncentraci PSS ve vzorku ($41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), přičemž poměr hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a polystyrensulfonátu je 3,9. I u tohoto systému dochází k fázové separaci stejně jako u vzorku s poměrem 2 a 3 DPTAP/PSS.

Za povšimnutí pak stojí, že ačkoliv i u polystyrensulfonátu dochází k fázové separaci při poměru 3,9 DPTAP/PSS (tedy při stejném množství nábojů jako u vzorků s hyaluronanem při koncentraci $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a s chondroitin sulfátem o koncentraci $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), tato sraženina se v porovnání s fázově separovaným systémem tvořeným při poměru 2 DPTAP/PSS nejeví jako ta, která je tvořena největšími trojrozměrnými strukturami (viz Příloha 1). Tato skutečnost je zřejmě způsobena zejména díky samotné struktuře PSS. Polystyrensulfonát je složen z poměrně malých monomerních jednotek v porovnání s disacharidovou jednotkou hyaluronanu, přičemž každá tato jednotka nese jednu sulfonovou skupinu zajišťující polyelektrolytový charakter. Nábojová hustota PSS je tedy značná. Sulfonovou skupinu rovněž lze považovat za slabý nukleofil, jelikož se jedná o sůl silné kyseliny sulfonové (pK_a benzensulfonové kyseliny $\approx -2,8$). V důsledku toho pak nelze každý náboj na monomerní jednotce PSS považovat za rovnocenný náboji na jednotce hyaluronanu a přepočítání tedy není možné provést jen na základě hmotnosti monomeru nesoucího jeden záporný náboj. Na základě tohoto pozorování byl pro další práci s fázově separovanými systémy volen zejména vzorek obsahující PSS o koncentraci $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, tedy s poměrem 2 DPTAP/PSS.

Při smísení roztoku libovolného polymeru s lipozomálním roztokem bylo zjištěno, že k fázové separaci dochází u všech vzorků s poměrem 2 hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a daného polymeru. Dalo by se tedy tvrdit, že poměr 2 DPTAP/polymer je významným parametrem, který rozhoduje o fázové separaci v systémech polymer-lipid. Za tímto poměrem je však třeba vidět zejména celkové množství záporně nabitých disociovaných skupin polymeru a kladných kvartérních amoniových dusíků lipidů DPTAP a DPPC tvořících lipozomy. Tyto dvě složky pak spolu elektrostaticky interagují, kdy při vhodném poměru nábojů dochází k rozsáhlé fázové separaci, a tedy i k jevu podobnému fyzikálnímu zesílení gelů s vysokou pevností uzlů. Na základě této úvahy a provedení přepočtu použitých koncentrací u CS a PSS tak, aby pipetované množství daného polymeru obsahovalo stejný počet nábojů jako hyaluronan s poměrem 2 DPTAP/HyA, bylo dále zjištěno, že je rovněž důležitá i nábojová hustota a samotná skupina odpovědná za polyelektrolytový charakter polymeru.

4.2 Vliv molárního poměru lipidických složek DPPC, DPTAP v systému polymer-lipid

Vliv molárního poměru lipidických složek DPPC a DPTAP byl zkoumán při zachování poměru 2 hmotnostních koncentrací lipidu DPTAP a hyaluronanu. Rovněž byl pro mísení se vzorky s různým molárním poměrem lipidů použit zásobní roztok o koncentraci $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.



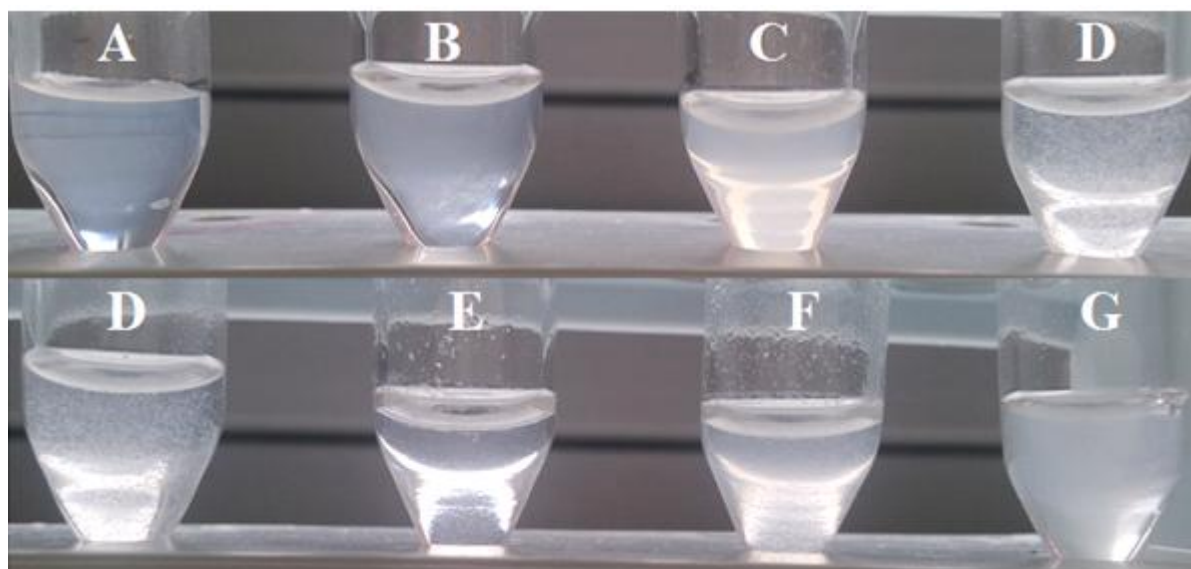
Obrázek 27: Fotografie systémů hyaluronan-lipid s různým molárním poměrem lipidu DPPC a DPTAP. A) 95:5, B) 90:10, C) 85:15, D) 15:85, E) 10:90, F) 5:95. Horní snímek je zachycen krátce po smísení, spodní snímek pak po fázové separaci. U této koncentrační řady lipidu DPTAP byl zachován poměr 2 hmotnostní koncentrace lipidu DPTAP a hyaluronanu.

Po smísení roztoku hyaluronanu s lipidickými roztoky s různým molárním poměrem lipidu DPPC a DPTAP (v poměru 2 DPTAP/HyA) byl v centrifugačních zkumavkách pozorován nejprve vznik zakalených roztoků, následně došlo ke vzniku různých typů fázově separovaných systémů, viz *Obrázek 27*. Tyto fázově separované systémy jsou pak popsány v *Tabulce 5*.

Tabulka 5: Výsledky vizuálních pozorování systému polymer-lipid s různým poměrem molárních koncentrací DPPC a DPTAP při zachování poměru 2 hmotnostních koncentrací lipidu DPPC a hyaluronanu.

molární poměr DPPC:DPTAP	C_{DPTAP} [mg · dm ⁻³]	C_{HyA} [mg · dm ⁻³]	vizuální pozorování
95:5	16,2	8,1	malé množství sraženiny ulpívající na skle
90:10	32,3	16,2	velmi jemná sraženina, zákal
85:15	48,5	24,3	velmi jemná sraženina, zákal
15:85	275,0	137,5	sraženina, sedimentuje
90:10	291,0	145,5	sraženina, sedimentuje
5:95	307,0	153,5	sraženina, sedimentuje

Jak shrnuje Tabulka 5, ke vzniku fázově separovaného systému došlo při všech molárních poměrech lipidů. Vznik různých množství sraženin lze přisuzovat množství hyaluronanu ve vzorku, neboť byl do vzorků přidáván při zachování poměru 2 DPTAP/HyA. I při nízké hmotnostní koncentraci DPTAP a tím tedy i hyaluronanu lze ve vzorku pozorovat fázovou separaci, kterou zřejmě způsobují lipozomy s obsahem DPTAP, přičemž sraženiny se tvoří málo kvůli nízkému obsahu hyaluronanu ve vzorcích. Roztok nad sraženinou pak opaleskuje, neboť jsou v roztoku přítomny neinteragující lipozomy. Při vysokém množství lipidu DPTAP se pak ve vzorku nachází i značné množství hyaluronanu, tudíž i sraženiny se tvoří více. V tomto případě roztok nad sraženinou neopaleskuje, takže se dá předpokládat, že se veškeré lipozomy účastní elektrostatické interakce s řetězcí hyaluronanu.



Obrázek 28: Fotografie systémů hyaluronan-lipid s různým molárním poměrem lipidu DPPC a DPTAP. A) 95:5, B) 90:10, C) 85:15, D) 50:50, E) 15:85, F) 10:90, G) 5:95. U této koncentrační řady lipidu DPTAP byla použita konstantní koncentrace hyaluronanu ve vzorku, a to 80 mg · dm⁻³.

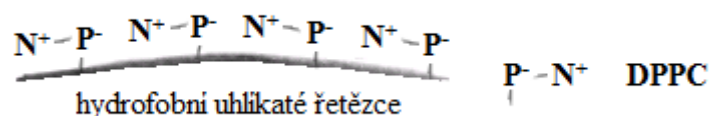
Po smísení roztoku hyaluronanu s lipidickými roztoky s různým molárním poměrem lipidu DPPC a DTAP (při použití jednotné koncentrace hyaluronanu $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) byly v centrifugačních zkumavkách pozorovány různé podoby systému polymer-lipid, jak znázorňuje *Obrázek 28*. Výsledky vizuálního pozorování těchto systémů jsou pak shrnuty v *Tabulce 6*.

Tabulka 6: Výsledky vizuálních pozorování systému polymer-lipid s různým poměrem molárních koncentrací DPPC a DPTAP při použití jednotné koncentrace zásobního roztoku hyaluronanu, a to $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

molární poměr DPPC:DPTAP	c_{DPTAP} [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]	c_{HyA} [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]	$c_{\text{DPTAP}}/c_{\text{polmyer}}$ [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]	vizuální pozorování
95:5	16,2	80	0,2	opaleskující roztok
90:10	32,3	80	0,4	opaleskující roztok
85:15	48,5	80	0,6	zakalený roztok, jemné částice lze okem pozorovat
50:50	161,5	80	2,0	sraženina, roztok nad sraženinou čirý
15:85	275,0	80	3,4	větší kusy sraženin plovoucí na hladině; roztok po fázové separaci čirý
90:10	291,0	80	3,6	zakalený roztok; částice pozorovatelné okem, větší než v případě C
5:95	307,0	80	3,8	zakalený roztok, částice větší, lze pozorovat okem

Při použití jednotné koncentrace hyaluronanu bylo zjištěno, že k fázové separaci u vzorků, v nichž jsou lipozomy téměř výhradně tvořeny zwitteriontovým lipidem DPPC, prakticky nedochází. Toto může být způsobeno strukturou uspořádání nábojů na povrchu lamel lipozomů, kdy zřejmě dochází k reorientaci skupin polární hlavy DPPC (dle teorie ve studii *Gzyl-Malchera a spol.* [72]) do horizontální polohy (viz *Obrázek 29*) oproti návrhu povrchové struktury v kapitole 4.1.1 (viz *Obrázek 22*). Tím dochází k odstínění repulzí mezi souhlasnými náboji na skupinách polárních hlav lipidu DPPC, přičemž lipozomy s takovouto povrchovou strukturou jsou již mnohem méně elektrostaticky aktivní, co se týče případné interakce se záporně nabitým polyelektrolytem. V případě vzorku s poměrem lipidů 85:15 pak dochází k mírné fázové separaci, což lze vysvětlit přítomností většího množství kladných nábojů, díky vyšší koncentraci DPTAP, které mohou interagovat s určitým množstvím řetězců hyaluronanu (zřejmě v poměru 2 DPTAP/HyA).

Při ekvimolárním poměru lipidových složek lipozomu pak dochází k očekávané fázové separaci, přičemž roztok nad sraženinou je čirý a neopaleskuje, takže se dá předpokládat, že se do interakce zapojily veškeré lipozomy.



Obrázek 29: Návrh orientace nabitých skupin polárních hlav na povrchu lipozomu tvořeného zejména zwitteriontovým lipidem DPPC podle teorie Gzyl-Malchera a spol.

Zvyšováním poměru lipidů ve prospěch kationtového DPTAP dochází k postupné opalescenci až zákalu, přičemž fázově separované systémy se tvoří ve všech případech. Ačkoliv jsou tedy poměry DPTAP/HyA poměrně vysoké, k fázové separaci dochází, na rozdíl od vzorku s poměrem 3 DPTAP/HyA, viz *Obrázek 21 – A*. Toto může být způsobeno téměř výhradním zastoupením DPTAP v lipozomech, či vyšší koncentrací obou interagujících složek, než v případě, který je na *Obrázku 21 – A* (DPTAP $161,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, HyA $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Srovnáme-li informace z výsledků výše, získáme detailnější objasnění podmínek, při kterých dochází k fázové separaci ve vzorcích. Ze vzorků s různými molárními poměry lipidů při použití jednotné koncentrace hyaluronanu vyplývá, že lipozomy s většinovým podílem lipidu DPPC neinteragují s hyaluronanem v takové míře, aby došlo k fázové separaci. Toto je zřejmě způsobeno rozložením nábojů na povrchu lipozomu, kdy se zřejmě střídají disociované fosfátové skupiny nesoucí záporný náboj s kladně nabitými skupinami obsahujícími kvartérní amoniový dusík. Tato struktura však není příznivě nakloněna pro interakci se zápornými náboji na karboxylových skupinách hyaluronanu. Při dosažení ekvimolární směsi lipidů poté dochází k vertikálnímu uspořádání polárních hlav lipidu DPPC, neboť jsou mezi ně vklíněny kladně nabitě polární hlavy lipidu DPTAP, čímž je dosaženo stabilní struktury. Lipozom se tedy na svém povrchu jeví jako kladně nabitá částice, takže může elektrostaticky interagovat s opačně nabitým polyelektrolytem. Při zvyšování poměru lipidů ve prospěch kationtového DPTAP jsou lipozomy na svém povrchu opět kladně nabitý zejména díky kladně nabitým polárním hlavám DPTAP. Mohou proto interagovat s řetězcem hyaluronanu, což vede k fázové separaci. Přístupné kladně nabitě skupiny se pak ukázaly jako podstatné i při fázové separaci u vzorků, u nichž byl volen jako konstantní poměr 2 hmotnostní koncentrace kationtového lipidu DPTAP a hyaluronanu. U těchto vzorků se ukázalo, že i při nízké koncentraci DPTAP v lipozomálních formulacích dochází k interakci s dostupným hyaluronanem, což vede k fázové separaci. Zabudování DPTAP do lipozomu tvořeného zejména DPPC zřejmě způsobí lokální změnu uspořádání polární hlavy DPPC, kdy dojde k vertikální orientaci skupin, čímž se kvartérní amoniová skupina DPPC stane dostupnější pro elektrostatickou interakci. Dojde tedy k fázové separaci, přičemž okolní roztok vykazuje opalescenci díky lipozomům, jež se neúčastní interakce s polyelektrolytem. Pokud pak lipid DPTAP představuje převládající složku tvořící lipozomy, ve vzorku se nenachází vezikuly, jež by se neúčastnily elektrostatické interakce s hyaluronanem. Roztok nad těmito fázově separovanými systémy tedy nevykazuje opalescenci.

4.3 Měření rozptylů světla

4.3.1 Elektroforetický rozptyl světla

Zeta potenciál byl získán na základě měření elektroforetického rozptylu světla. Představuje elektrostatickou stabilitu částic v roztoku – čím vyšší je jeho absolutní hodnota, tím více se odpuzují jednotlivé částice, takže nedochází ke koagulaci. Jako mezní hodnota prahu koagulace je označován zeta potenciál ± 30 mV. Má-li tedy částice absolutní hodnotu zeta potenciálu vyšší než 30 mV, lze ji označit za stabilní.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty zeta potenciálů lipozomů.

vzorek	poměr lipidů	Ø ζ [mV]	
		první série	druhá série
DPPC, DPTAP	95:5	41,8 ± 2,0	38,3 ± 0,9
	90:10	55,2 ± 5,6	34,3 ± 0,5
	85:15	46,3 ± 1,7	49,5 ± 1,8
	50:50	84,0 ± 1,8	85,9 ± 2,7
	15:85	40,8 ± 1,7	50,5 ± 4,1
	10:90	58,7 ± 2,4	56,0 ± 2,0
	5:95	52,9 ± 2,4	48,5 ± 2,6

Tabulka 7 shrnuje průměrné hodnoty zeta potenciálů lipozomů s různým molárním poměrem jednotlivých lipidů.

Jak je z Tabulky 7 zřejmé, ačkoliv se naměřené zeta potenciály v první a druhé sérii u některých vzorků poměrně liší, veškeré lipozomy mají vysokou hodnotu zeta potenciálu, tudíž je všechny lze považovat za elektrostaticky stabilní. Dá se tedy předpokládat, že tyto částice ve vzorku neagregují a zachovávají si strukturu samostatných lipozomů, což se potvrdilo vizuálním pozorováním jednotlivých zásobních roztoků – ani v průběhu delšího časového úseku nedocházelo ke vzniku zákalu či větších okem pozorovatelných částic. Vzhledem k odlišnosti dat jednotlivých sérií měření pak nelze příliš hodnotit ani trend koncentrační řady DPTAP ve vzorcích. Nicméně je zajímavé, že při všech měřeních nejvyšší hodnotu zeta potenciálu vykazují lipozomy s ekvimolárním zastoupením obou lipidů. Tato hodnota je téměř o 30 mV vyšší než nejvyšší zeta potenciál u neekvimolární směsi. Dá se tedy předpokládat, že tento systém je elektrostaticky nejstabilnější, a že zastoupení kladných nábojů na povrchu těchto částic je největší. Zároveň je zajímavé, že lipozomy tvořené téměř výhradně DPTAP vykazují mnohem menší zeta potenciál, než ekvimolární směs, ačkoliv jsou tvořeny téměř výhradně kationtovými lipidy. To může být způsobeno množstvím částic, které tvoří jednotlivé lipozomy a způsobují povrchový náboj lipozomu. Malé lipozomy DPTAP (viz kapitola 4.3.2) jsou tvořeny, díky repulzím mezi kladně nabitými hlavami, menším množstvím lipidů, než velké lipozomy s ekvimolární směsí. U těch může docházet k hustějšímu uspořádání jednotlivých lipidů díky odstínění repulzí mezi nabitými skupinami lipidů, viz Obrázek 29 (návrh orientace nabitých skupin polárních hlav na povrchu lipozomu).

4.3.2 Dynamický rozptyl světla

Velikost částic zásobních roztoků byla stanovena pomocí měření dynamického rozptylu světla. Během tohoto měření přístroj měří časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla v důsledku Brownova pohybu částic. Z analýzy intenzity rozptýleného světla pak lze určit difúzní koeficient částic a stanovit intenzitní distribuci velikosti. Přístroj rovněž data sám koreluje a kumulativní analýzou stanoví průměrnou velikost částic, která je vážená podle šesté mocniny (z Rayleighovy aproximace) průměru částice – tzv. Z-průměr [82]. Velké částice jsou tedy mnohem více patrné, jelikož jsou přístrojem nadhodnoceny. Může se pak stát, že se složka malých částic v intenzitní distribuci vůbec neobjeví, neboť intenzita jimi rozptýleného světla je mnohem menší v porovnání s většími částicemi. Je vhodné proto provést přepočítání intenzitní distribuce částic na objemovou. Pro tento přepočítání je však nutno znát hodnotu indexu lomu částic ve vzorku. Pro samotné DPPC, je index lomu 1,49 [83]. Pro směsné částice s různým molárním zastoupením jednotlivých lipidů však index lomu definován není, proto bylo pracováno pouze s intenzitní distribucí velikosti částic a tato měření byla považována pouze jako orientační.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty Z-průměrů velikostí lipozomů.

molární poměr DPPC:DPTAP	Ø Z-průměr [nm]	
	první série	druhá série
95:5	103,30 ± 0,28	88,89 ± 1,21
90:10	117,00 ± 0,42	113,50 ± 0,83
85:15	52,47 ± 0,08	57,78 ± 0,49
50:50	134,80 ± 0,14	128,37 ± 0,62
15:85	39,98 ± 0,92	38,66 ± 0,75
90:10	38,75 ± 0,38	40,44 ± 0,03
5:95	38,23 ± 1,05	42,69 ± 0,32

Tabulka 8 shrnuje průměrné hodnoty Z-průměrů lipozomů s různým molárním poměrem jednotlivých lipidů.

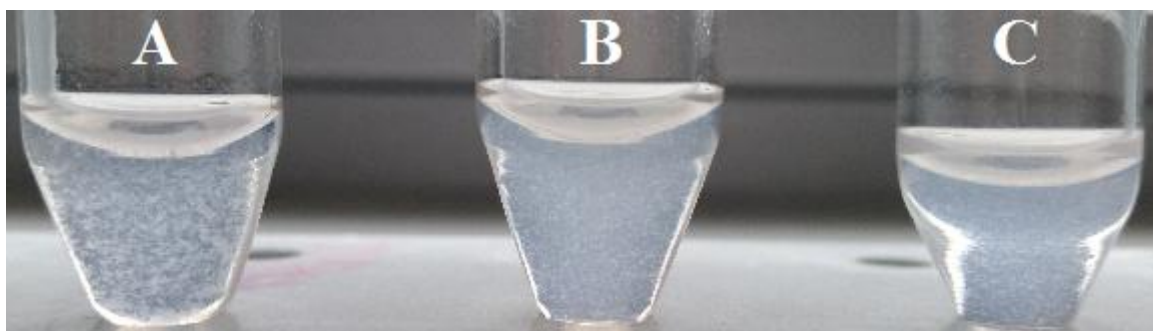
Z jednotlivých sérií měření nelze usuzovat jednoznačný trend koncentrační řady lipidů DPTAP v lipozomech. Lze však alespoň porovnat velikosti částic při ekvimolárním zastoupení a při většinovém zastoupení DPPC či DPTAP. Z Tabulky 8 je patrné, že největší částice se tvoří při ekvimolárním poměru lipidů, zatímco nejmenší částice se tvoří při většinovém podílu kationtového lipidu. Největší částice (při ekvimolárním množství lipidů) jsou zřejmě tvořeny díky odstínění repulzí mezi polárními hlavami lipidů, takže lipozomy jsou tvořeny velkým počtem lipidů, což naznačuje i měření zeta potenciálu. Lipozomy s většinovým podílem DPPC pak mohou být větší, než lipozomy s většinovým podílem DPTAP, zřejmě díky vertikální orientaci polárních hlav, viz Obrázek 29.

Z měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla lze usuzovat, že částice tvořené při ekvimolárním množství lipidů jsou největší a nejstabilnější, a to z důvodu optimálního

uspořádání, kdy dochází k odstínění repulzí mezi stejnými náboji. Pro interakce s polyelektrolyty byla tedy volena, zejména díky nejvyššímu zeta potenciálu, ekvimolární směs lipidů.

4.4 Systém polymer-lipid se solubilizovaným hydrofobním barvivem

Z dřívějších pozorování vyplývá, že při smísení roztoku polymeru s lipozomálním roztokem ve specifickém poměru, hmotnostních koncentrací lipidů DPTAP a polymeru, dochází k fázové separaci a vzniku sraženin. Po smísení roztoků polymerů s lipidy, jejichž koncentrace v roztoku je taková, že tvoří agregované formy (tedy vyšší než kritická agregační koncentrace, která je pro směs lipidů DPPC a DPTAP s molárním poměrem lipidů 50:50 ve vodě $0,0458 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [80]), ve kterých obsahuje solubilizované hydrofobní barvivo sudánovou červeň G, vznikají fázově separované systémy s růžovým či narůžovělým zbarvením vůči okolnímu roztoku. Tyto narůžovělé fázově separované systémy vznikají ve všech typech systémů, viz *Obrázek 30*.



Obrázek 30: Fotografie systémů polymer-lipid s inkorporovaným barvivem sudánová červeň G – koncentrace $10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) hyaluronan-lipid, B) chondroitin sulfát-lipid, C) polystyrenulfonát-lipid.

Vznik narůžovělých fázově separovaných systémů svědčí o vzájemné elektrostatické interakci mezi polymerem, který má charakter aniontového polyelektrolytu, a opačně nabitými lipidy. Tyto lipidy jsou v koncentraci, při které tvoří vezikuly s lipidovou dvojvrstvou, v níž může být pomocí hydrofobní interakce vázáno hydrofobní barvivo sudánová červeň G (což bylo potvrzeno vznikem narůžovělého opaleskujícího lipozomálního roztoku). Tato elektrostatická interakce je pak například podstatou fyzikálního zesítnění hyaluronanových hydrogelů. Jejich uzlové oblasti vytváří micely tvořené tenzidy, které ve své struktuře obsahují hydrofobní domény, v nichž může být rovněž solubilizováno hydrofobní barvivo. Hydrofobní domény pak obsahují i tyto fázově separované systémy, takže stejně jako hyaluronanové hydrogely dokážou do své struktury inkorporovat hydrofobní látky, což by mohlo být významnou a přínosnou vlastností při případné aplikaci v medicíně či kosmetice, neboť většina léčivých a prospěšných látek má právě hydrofobní charakter.

Je velice zajímavé, že při použití vyšší koncové koncentrace hydrofobního barviva ve vzorcích ($10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), dochází k fázové separaci pouze u vzorku s hyaluronanem. U ostatních polymerů nedochází k žádné fázové separaci, vzorek zůstává pouze jako opaleskující narůžovělý roztok, viz Příloha 2. Při vyšší koncentraci hydrofobního barviva zřejmě nedochází k solubilizaci veškerého barviva, popřípadě dochází k nedokonalé

solubilizaci, kdy se barvivo nenachází zcela uvnitř lipidové dvojvrstvy. Potom se na fázové separaci mohou podílet i interakce hydrofobní, jichž se může účastnit právě hyaluronan, a to díky své struktuře, kdy hydrofobní oblast vytváří axiální vodíky.

4.5 Ovlivňování interakcí vedoucích k fázové separaci

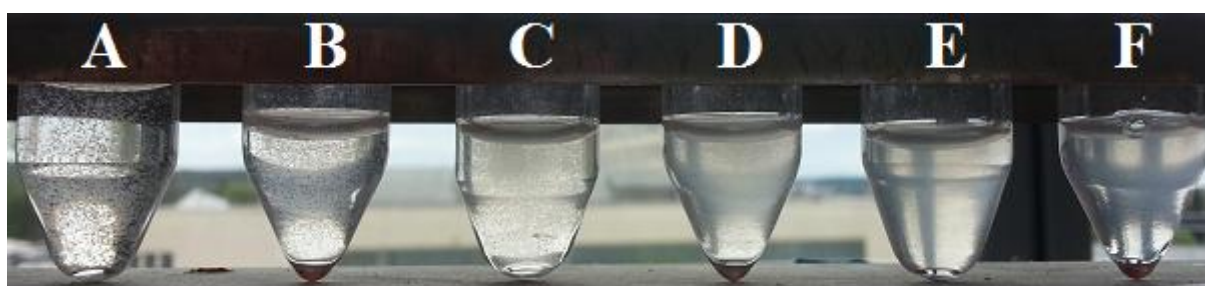
Interakce vedoucí ke vzniku fázově separovaných systémů má svůj původ s největší pravděpodobností v elektrostatickém působení, nicméně mohou se zde uplatňovat například i interakce hydrofobní. Pomocí ovlivňování interakcí zejména různými solemi pak byla snaha tuto interakci stanovit. Další snahou této práce bylo rovněž pokusit se základní fázově separované systémy polymer-lipid zformulovat do takové podoby, jež by mohla mít aplikační potenciál v medicíně či kosmetice, tedy například hydrogel, čehož by se dalo dosáhnout opět vhodným ovlivněním interakce vedoucí k fázové separaci.

4.5.1 Iontová síla

Iontová síla ve vzorcích s fázově separovanými systémy byla ovlivňována pomocí jednomocných i vícemocných iontů. Z jednomocných iontů byl vybrán chlorid sodný, zejména proto, že 0,15M roztok této soli se používá jako model fyziologického roztoku, tudíž bylo příhodné ověřit chování fázově separovaných systémů nejen při této koncentraci. Vícemocné ionty pak byly reprezentovány chloridem vápenatým, síranem měďnatým a chloridem hořečnatým.

4.5.1.1 Jednomocné ionty – NaCl

Přídavkem chloridu sodného do vzorků obsahujících hyaluronan a lipozomální roztok, které se vyznačují fázovou separací (poměr 2 hmotnostní koncentrace DPTAP a hyaluronanu), dochází k oslabení interakce vedoucí k fázové separaci, jak je naznačeno na *Obrázku 31* a jak shrnuje *Tabulka 9*.



Obrázek 31: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid s různou koncentrací chloridu sodného. A) 0 M NaCl, B) 70 mM NaCl, C) 150 mM NaCl, D) 250 mM NaCl, E) 500 mM NaCl, F) 1 M NaCl.

Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací chloridu sodného v roztoku dochází ke zmenšování fázově separovaných částic. Toto zjemňování sraženiny je způsobeno zvyšováním iontové síly v roztoku, což má za následek stlačení iontové atmosféry a vysycení nábojů na polymeru i lipozomu protiionty pocházejícími z NaCl. Z tohoto důvodu není

elektrostatická interakce mezi opačnými náboji již tak silná, a proto nevznikají větší sraženiny, ale pouze menší částice, což lze vizuálně pozorovat.

Tabulka 9: Výsledky vizuálního pozorování ovlivňování interakcí v systému hyaluronan-lipid pomocí iontové síly v roztoku jednomocnými ionty NaCl.

elektrolyt	c_{NaCl} [mmol · dm ⁻³]	I [mmol · dm ⁻³]	vizuální pozorování
NaCl	12	12	- se zvyšující se iontovou silou
	26	26	ve vzorcích dochází k postupnému
	42	42	zjemnění sraženiny
	70	70	- jemné částice lze stále pozorovat
	83	83	až do koncentrace 1 M
	155	155	- při koncentraci 2 M a 3 M
	250	250	sraženina není okem pozorovatelná,
	500	500	vzorek se jeví jako opaleskující
	900	900	roztok
	1000	1000	
2000	2000		
3000	3000		

Při ovlivnění iontové síly ve vzorcích s fázově separovanými systémy tvořenými polymery chondroitin sulfátem a polystyrenulfonátem bylo zjištěno analogické chování jako u vzorků s hyaluronanem. Při zvyšování iontové síly bylo rovněž zaznamenáno oslabení interakce, které se projevilo zjemněním sraženin, jak je znázorňuje Příloha 3 a Příloha 4.

4.5.1.2 Vícemocné ionty

V rámci ovlivňování iontovou silou byl rovněž zkoumán vliv vícemocných iontů. Přídavkem solí s vícemocnými ionty do vzorků obsahujících hyaluronan a lipozomální roztok, které se vyznačují fázovou separací (poměr 2 DPTAP/HyA), dochází opět k oslabení interakce vedoucí k fázové separaci, jak shrnuje *Tabulka 10*.

Tabulka 10: Výsledky vizuálního pozorování ovlivňování interakcí v systému hyaluronan-lipid pomocí iontové síly v roztoku vícemocnými ionty.

elektrolyt	$c_{elektrolyt}$ [mmol · dm ⁻³]	I [mmol · dm ⁻³]	vizuální pozorování
CaCl ₂	136	408	opaleskující roztok s velmi jemnými částicemi
CuSO ₄ ·5H ₂ O	141	564	opaleskující roztok s velmi jemnými částicemi
MgCl ₂ ·5H ₂ O	148	444	opaleskující roztok s velmi jemnými částicemi

Při přidavku vícemocných iontů do vzorku rovněž dochází ke zmenšování fázově separovaných částic. Toto zmenšování sraženiny je způsobeno zvyšováním iontové síly v roztoku, takže opět dochází k oslabení elektrostatické interakce mezi záporně nabitým polymerem a kladně nabitými lipozomy. Při porovnání fázově separovaných systémů se stejnou iontovou silou v roztoku způsobenou jednomocnými ionty NaCl, nebyl zaznamenán žádný zásadní vliv použití iontů vícemocných. Oslabení interakce tedy nezávisí na typu použitého elektrolytu, ale pouze zvýšení iontové síly, které tento elektrolyt ve vzorku vyvolá.

4.5.2 Ovlivnění chaotropy

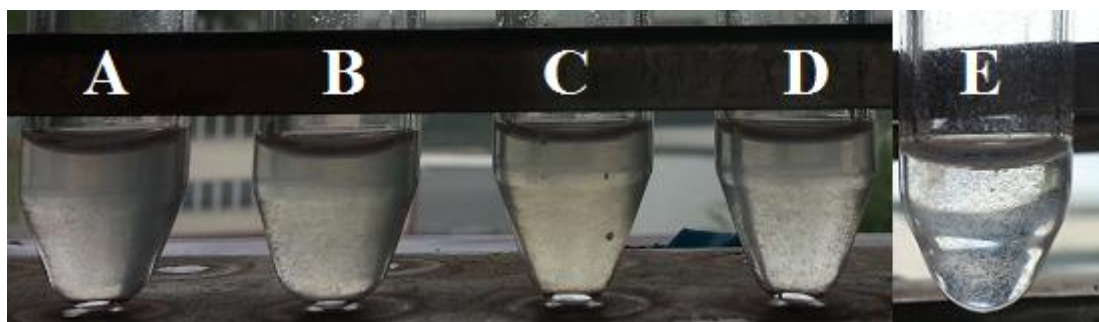
Termín chaotropy je používán zejména pro ionty, které rozrušují strukturovanost vody, neboť silně interagují s vodou pomocí vodíkových můstků, čímž konkurují provázání molekul vody mezi sebou. Mezi chaotropy se řadí slabě hydratované měkké anionty s nízkou hustotou náboje (například SCN^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , HCO_3^- , I^- , Cl^- , NO_3^-) a silně hydratované tuhé kationty s vysokou hustotou náboje (například NH_4^+ , Cs^+ , K^+ , $(\text{NH}_2)_3\text{C}^+$ (guanidinium), $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ (tetramethylamonium)). Mezi chaotropy se rovněž řadí látky neiontové povahy, jako močovina. Tyto ionty snižují povrchové napětí a zvyšují rozpustnost uhlovodíků [54], [84].

Interakce vedoucí ke vzniku fázově separovaných systémů byla ovlivňována pomocí iontových chaotropů (KH_2PO_4 , KCl, KI, CsCl) a neiontové močoviny.

Přidáním chaotropů do vzorků obsahujících hyaluronan a lipozomální roztok, které se vyznačují fázovou separací (poměr 2 hmotnostní koncentrace DPTAP/HyA), dochází k oslabení interakce vedoucí k fázové separaci, jak je naznačeno na *Obrázku 32* a jak shrnuje *Tabulka 11*.

Tabulka 11: Výsledky vizuálního pozorování ovlivňování interakcí v systému hyaluronan-lipid pomocí chaotropů.

chaotrop	C_{chaotrop} [mmol · dm ⁻³]	vizuální pozorování
KH ₂ PO ₄	30	sraženina - v roztoku, ale i ulpívající i na skle zkumavky
	164	jemné částice, sedimentace
KCl	30	sraženina, sedimentace
	199	jemné částice sraženiny, sedimentace
KI	30	sraženina, sedimentace
	174	jemné částice, sedimentace
CsCl	30	sraženina ulpívající na skle
	156	jemné částice, sedimentace
močovina	30	sraženina
	281	sraženina



Obrázek 32: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce chaotropy o koncentraci $30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) KH_2PO_4 , B) KCl , C) KI , D) CsCl , E) močovina.

Přidáním chaotropů do vzorků s fázově separovanými systémy dochází, stejně jako při ovlivnění interakce iontovou silou ke vzniku jemnějších sraženin. Dochází tedy k oslabení interakce. U chaotropů by pak mělo docházet k oslabení případných hydrofobních interakcí. Chaotropy by měly narušovat strukturovanou vodu kolem hydrofobních oblastí. Tím by měly umožnit jejich lepší rozpustnost, v důsledku čehož není nutné, aby docházelo k interakci hydrofobních oblastí, neboť strukturovaná voda se kolem nich již netvoří v takové míře. Iontové chaotropy však rovněž v roztoku disociují, čímž zvyšují iontovou sílu v roztoku. K oslabení interakce tedy může docházet i díky tomuto jevu. Elektrostatickou interakci ve vzorcích pak potvrzuje i to, že v případě močoviny, která v roztoku nedisociuje, tudíž nezvyšuje iontovou sílu roztoku, nedochází k pozorovatelnému zjemnění sraženiny a tedy i oslabení interakce.

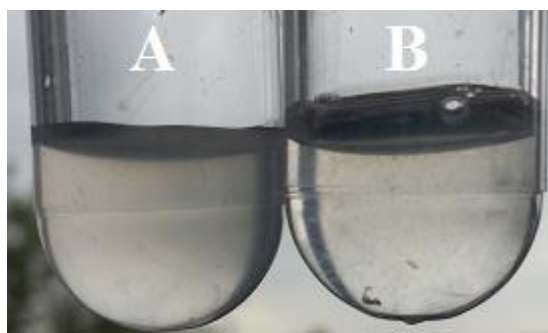
4.5.3 Ovlivnění kosmotropy

Kosmotropy, na rozdíl od chaotropů, přispívají ke stabilitě strukturované vody. Mezi kosmotropní ionty se řadí slabě hydratované měkké kationty s nízkou hustotou náboje (například Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , Na^+ , H^+) a silně hydratované tuhé anionty s vysokou hustotou náboje (například SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , OH^- a PO_4^{3-}). Tyto ionty zvyšují povrchové napětí a stabilitu bílkovin, snižují rozpustnost uhlovodíků a denaturaci bílkovin a mají silný vysolovací účinek, takže podporují hydrofobní interakce a fázovou separaci [54], [84].

Interakce vedoucí ke vzniku fázově separovaných systémů byla ovlivňována pomocí iontových kosmotropů reprezentovaných Na_2HPO_4 a NaOH .

Přidáním kosmotropů do vzorků obsahujících hyaluronan a lipozomální roztok, které se vyznačují fázovou separací (poměr 2 hmotnostní koncentrace DPTAP/HyA), dochází k oslabení interakce vedoucí k fázové separaci, jak je naznačeno na *Obrázku 33* a jak shrnuje *Tabulka 12*.

Přidání kosmotropních iontů do vzorků s fázově separovanými systémy způsobil, stejně jako při ovlivnění interakce iontovou silou i chaotropy, zjemnění sraženin. I při ovlivnění interakce kosmotropy tedy dochází k oslabení interakce na základě zvýšení iontové síly v roztoku, ačkoliv by měly podporovat případné hydrofobní interakce a fázovou separaci.



Obrázek 33: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce kosmotropy o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) Na_2HPO_4 , B) NaOH .

Tabulka 12: Výsledky vizuálního pozorování ovlivňování interakcí v systému hyaluronan-lipid pomocí kosmotropních iontů.

chaotrop	c_{chaotrop} [$\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	vizuální pozorování
Na_2HPO_4	150	jemná sraženina, zákal
NaOH	150	jemná sraženina – po čase dochází ke vzniku kompaktní gelovité struktury, která se ale opět po čase rozpadá

Jak je z výsledů zřejmé, interakce způsobující fázovou separaci ve vzorku lipozomů, tvořených ekvimolárním množstvím DPPC, DPTAP, s polymery má svůj původ v elektrostatických interakcích, neboť i při použití kosmotropů došlo k oslabení interakce a s tím spojeným zjemněním sraženiny. K tomuto oslabení interakce došlo na základě zvýšení iontové síly v roztoku, přestože by kosmotropy měly podpořit případné hydrofobní interakce a fázovou separaci.

4.5.4 Fázově separované systémy polymer-lipid s NaOH

Ve vzorcích s NaOH byl po čase pozorován vznik kompaktní gelovité struktury, viz Příloha 5. Tato gelovitá struktura se zřejmě netvoří pouze na základě působení NaOH jako kosmotropu, který podporuje hydrofobní interakce a fázovou separaci, neboť vzorek s druhým kosmotropem (Na_2HPO_4) toto chování ani po delším čase stání nevykazuje.

Svou úlohu může hrát zásadité prostředí, které NaOH ve vzorku vytváří, což potvrzuje vznik různě kompaktních struktur v závislosti na koncentraci NaOH ve vzorku, jak znázorňuje Obrázek 34. Při vysoké koncentraci NaOH ve vzorku, tedy při vysokém pH, dochází k disociaci veškerých přítomných karboxylových skupin (při pH 7 nemusí být veškeré karboxylové skupiny disociovány, jak naznačuje studium zhášení fluorescence v důsledku interakce hyaluronanu a barviva [85]). Na polymerních řetězcích je tedy při poměru 2 DPTAP/HyA maximální možné množství záporných nábojů, takže se tvoří silně provázané trojrozměrné struktury. Tyto struktury jsou pak schopny vázat velké množství vody, neboť propletená struktura zadržuje velké množství volných pohyblivých iontů,

keré jsou osmoticky aktivní. Tuto hypotézu by pak potvrdil vznik ne příliš kompaktní struktury v případě PSS (viz Příloha 6), který na svých monomerních jednotkách obsahuje sulfonovou kyselinu. Tato skupina je díky svému nízkému pKa (pKa benzensulfonové kyseliny $\approx -2,8$) plně disociována již při neutrálních hodnotách pH, kdy nemusí být disociovány veškeré karboxylové skupiny ostatních polyelektrolytů. Zvýšením pH ve vzorku s PSS tedy nedochází ke zvýšení množství disociovaných sulfonových skupin na řetězcích PSS. Nicméně jak již bylo řečeno, PSS je plně disociován i při neutrálních pH. Ke vzniku gelovité struktury by tedy u PSS mělo, na základě této hypotézy, docházet i bez zvýšení pH, tedy u vzorků bez NaOH.

Výše zmíněnou teorii však rovněž vyvrací vznik kompaktní gelovité struktury i v případě samotného vzorku DPPC,DPTAP po přidavku NaOH. V případě vysoké koncentrace NaOH může docházet k reorganizaci lipidů, tvořících lipozomy bez přítomnosti NaOH, v provázanější struktury. Tato struktura pak opět ve vzorku botná díky obsahu volných iontů, což se navenek projeví jako kompaktní gelu podobná struktura. Síťovanou strukturu pak naznačují i reologická měření, viz kapitola 4.6.

Vzhledem k tomu, že lipidy tvořící lipozomy jsou hydrolyzovatelné, může rovněž, při vysoké koncentraci NaOH, docházet k alkalické hydrolyze přítomných esterově vázaných vyšších mastných kyselin. V tomto případě vznikají soli vyšších mastných kyselin, které by mohly vytvářet agregované formy. Zároveň vzniká glycerol, který se řadí mezi neionogenní kosmotropy [86], takže může ve vzorku podporovat fázovou separaci. Gelovitá struktura by pak mohla být způsobena opět botnáním díky obsahu pohyblivých iontů v agregovaných strukturách solí mastných kyselin.



Obrázek 34: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce NaOH o různé koncentraci. A) $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, B) $95 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, C) $145 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, D) $375 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tabulka 13: Výsledky vizuálního pozorování ovlivňování interakcí v systému hyaluronan-lipid pomocí kosmotropu NaOH v závislosti na jeho koncentraci ve vzorku.

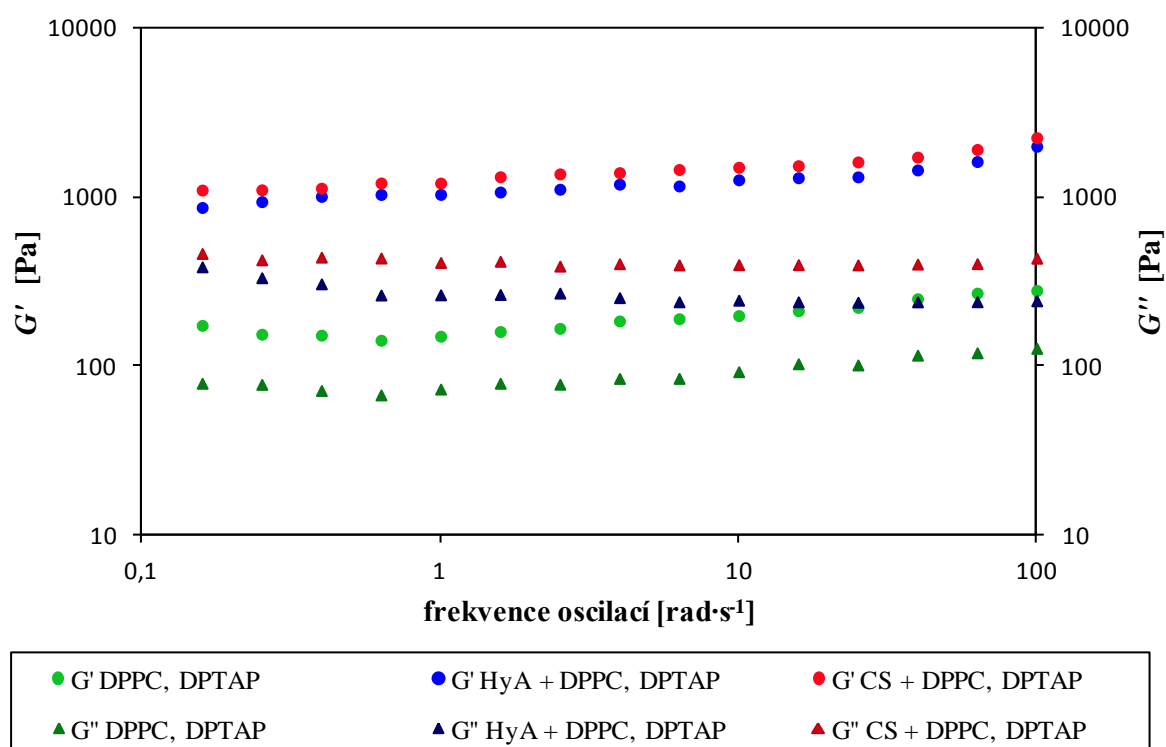
vzorek	c_{NaOH} [$\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	vizuální pozorování
A	50	samostatné drobné sraženiny
B	95	agregace i samostatné drobné sraženiny
C	145	soudržná sraženina
D	375	kompaktní sraženina, gel

Kompaktní struktura připomínající gel se však po určitém čase opět rozpadá na jemné fázově separované systémy, viz Příloha 7. Totéž se opakuje i při vyjmutí kompaktní gelovité struktury a vložení do různých prostředí – superčistá voda, p-pufr a 0,15M NaCl, viz Příloha 8.

Vysoká koncentrace NaOH tedy sice indukuje vznik kompaktních struktur připomínajících gel, na základě neobjasněného působení, avšak v čase tato struktura není stabilní, neboť se rozpadá na drobné fázově separované systémy.

4.6 Reologická měření

Tato kapitola se zabývá viskoelastickými vlastnostmi vybraných vzorků, které byly testovány oscilačními reologickými testy. Na základě frekvenčních oscilačních testů byly získány závislosti elastického a viskózního modulu, dále také závislosti komplexní viskozity na měnící se frekvenci oscilací měřicí geometrie. Výsledkem pak je srovnání jednotlivých závislostí elastického a viskózního modulu a komplexní viskozity na měnící se frekvenci oscilací, přičemž byl pozorován vliv polymeru na reologické chování kompaktních fázově separovaných systémů ovlivněných působením NaOH. Jako srovnávací vzorek byl použit vzorek samotných lipidů se stejným přidavkem NaOH, který rovněž vykazoval podobu kompaktního fázově separovaného systému.

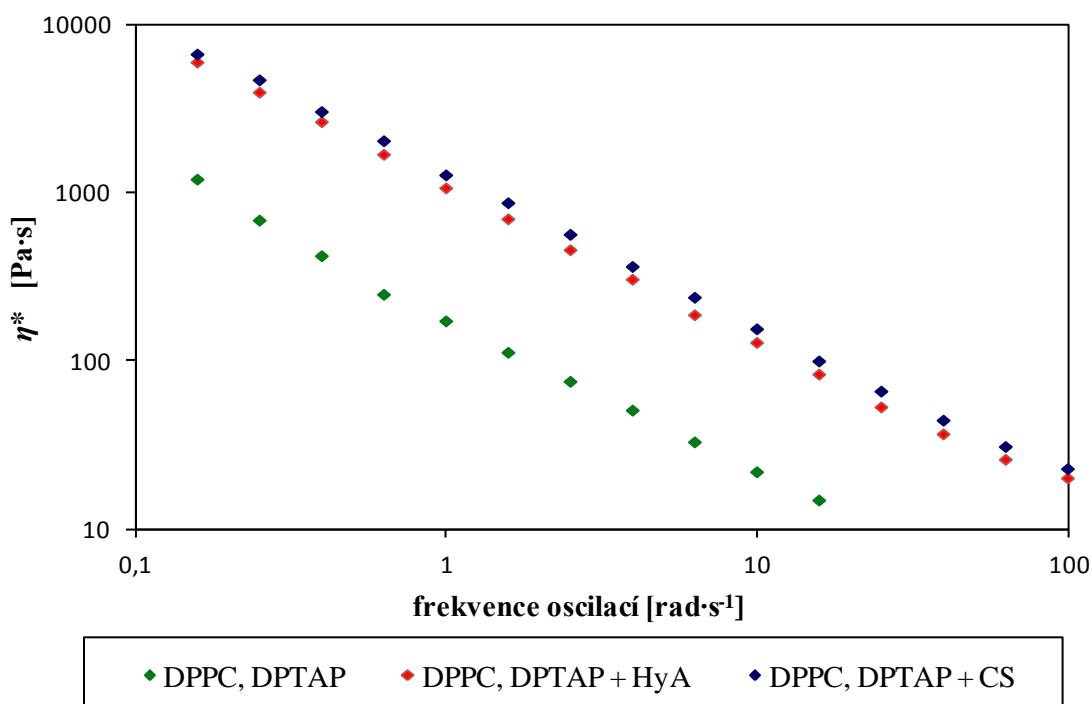


Obrázek 35: Závislost elastického a viskózního modulu na frekvenci oscilací pro samotné DPPC, DPTAP a v systému s hyaluronanem a chondroitin sulfátem po ovlivnění interakce NaOH.

Na *Obrázku 35* jsou uvedena data naměřená pro systém polymer-lipid s polymery hyaluronanem a chondroitin sulfátem (PSS měřen nebyl, neboť nevytvářel dostatečně kompaktní strukturu, viz Příloha 6). Obrázek dále obsahuje srovnávací data, tedy samostatné DPPC, DPTAP.

Jak je z *Obrázku 35* patrné, u všech vzorků v celém měřeném rozsahu frekvencí oscilací, elastický modul G' převládá nad modulem viskózním G'' , takže vzorky vykazují viskoelastické chování elastického charakteru. Toto chování je charakteristické pro plně síťované hydrogely s vysokou pevností uzlů, kde jsou tyto uzly schopny odolávat vystavené deformaci v podobě měnící se frekvence oscilace. Dá se tedy předpokládat, že ve vzorku, který obsahuje pouze lipidy po přidavku NaOH, dochází k reorganizaci lipozomů v jiné, větší a komplexnější struktury.

Je-li ve vzorku přítomen i polymer, dochází k posunům obou modulů k vyšším hodnotám, téměř nezávisle na typu polymeru. Vyšší hodnoty modulů svědčí o větší rigiditě daných systémů a lepší odolnosti vůči mechanickému namáhání, než samotné lipidy. Tato větší odolnost kompaktních struktur může být zapříčiněna interakcí polymerů s reorganizovanými lipidovými strukturami, což pak vede k vyšší odolnosti systému. Polymery však mohou být zachyceny v nově přeskupené struktuře například jen díky mechanickému strhávání při reorganizaci lipidů. K žádné elektrostatické ani hydrofobní interakci pak docházet nemusí, ačkoliv při reologických měřeních dochází ke zvýšení odolnosti, a to vzhledem k výskytu polymerních řetězců v kompaktní struktuře jako takových.



Obrázek 36: Závislost komplexní viskozity na frekvenci oscilací pro samotné DPPC, DPTAP a v systému s hyaluronanem a chondroitin sulfátem po ovlivnění interakce NaOH.

Na *Obrázku 36* jsou uvedena data naměřená pro systém polymer-lipid s polymery hyaluronanem a chondroitin sulfátem. Obrázek dále obsahuje srovnávací data, tedy samostatné DPPC, DPTAP.

Z klesajících hodnot komplexní viskozity se zvyšující se frekvencí oscilací, lze u všech vzorků předpokládat provázanou strukturu. Tento průběh křivek je označován jako pseudoplastické chování a je charakteristický pro polymerní roztoky. Při nulovém namáhání je systém schopen udržovat svou strukturu, takže viskozita je vysoká. Při namáhání a zvyšování frekvence oscilací již interakce nestačí k udržení uspořádání, v důsledku čehož viskozita systému klesá.

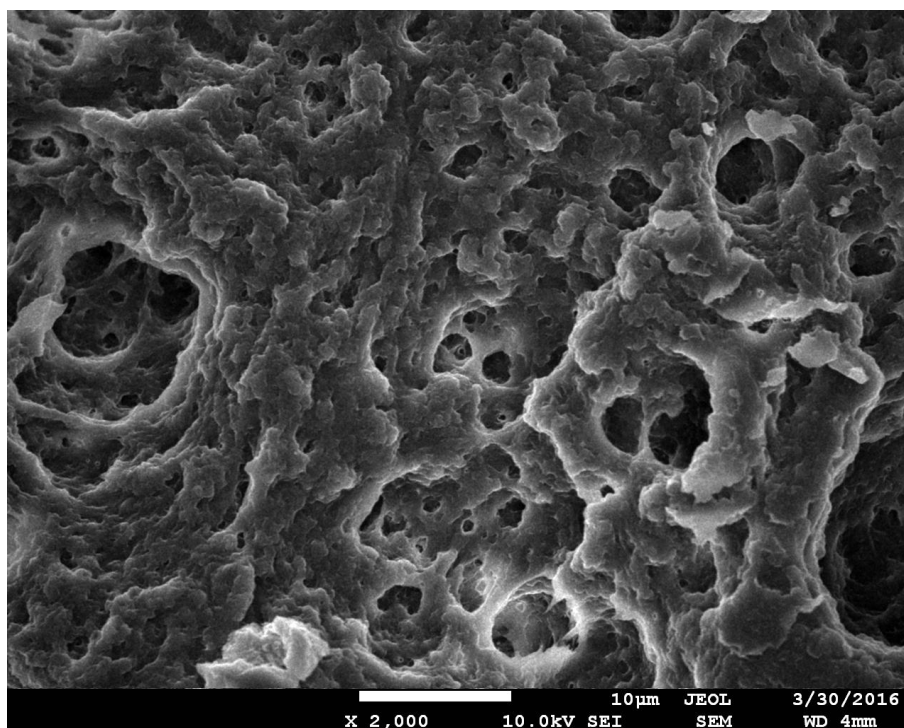
I zde se pak projevil obsah polymeru zvýšením hodnot komplexní viskozity, zcela nezávisle na typu polymeru.

Z měření frekvenčních testů vyplývá, že všechny vzorky vykazují viskoelastické chování s převládající elastickou odezvou charakteristickou pro gely. U vzorků obsahujících hyaluronan či chondroitin sulfát dochází ke zvýšení hodnot obou modulů v porovnání s kompaktním systémem tvořeným pouze lipidy. Přídavkem polymeru tedy dochází ke zvýšení mechanické odolnosti fázově separovaných kompaktních systémů při namáhání. Rovněž dochází ke zvýšení hodnot komplexní viskozity, která má pro všechny vzorky klesající průběh charakteristický pro pseudoplastické chování polymerních roztoků.

4.7 Elektronová mikroskopie

Jelikož je v celé této práci předpokládáno, že vznikající fázově separované systémy jsou tvořeny vzájemnou elektrostatickou interakcí mezi aniontovými polyelektrolyty a kladnými lipozomy, byl rovněž věnován čas stanovení těchto sraženin. S využitím skenovací elektronové mikroskopie byla u vybraných základních vzorků provedena prvková analýza s cílem ověřit a potvrdit složení fázově separovaných systémů. Rovněž byla zkoumána morfologie povrchu těchto vzorků s cílem alespoň přiblížit povrchovou strukturu. Nejprve tedy bylo pořízeno několik snímků povrchu vzorků o různém zvětšení a následně byla vybrána různá místa vzorku, pro stanovení prvkového složení.

Při zkoumání povrchu fázově separovaných systémů byla pořízena řada snímků, viz *Obrázek 37*, Příloha 9 a Příloha 10. Z těchto snímků však nelze jednoznačně usuzovat na morfologii fázově separovaných systémů z důvodu nutnosti měření pouze zcela suchých vzorků (měření probíhá za vysokého vakua). Jak se ukázalo již při přípravě vzorků, fázově separované systémy jsou značně hydratovány, takže po odpaření veškeré vlhkosti zůstal na stěně zkumavky deponován velice tenký film, který byl následně převeden na podložku a měřen. Lze předpokládat, že vysušením dojde k převedení předpokládané trojrozměrné struktury na strukturu v podstatě dvojrozměrnou, dojde tedy k „naskládání“ případných makromolekulárních sítí na sebe. Na *Obrázku 37* pak lze pozorovat vzorek s chondroitin sulfátem, jenž zřejmě obsahuje takovouto zhuštěnou strukturu, přičemž „díry“ ve struktuře by mohly být způsobeny odpařováním vody ze vzorku. Dalším problémem při pořizování snímků bylo tavení vzorků při velkých zvětšeních. Nebylo tedy možné pořídit fotografie se zvětšením, které by bylo vhodné pro pozorování částic, které mají průměr kolem 100 nm.



Obrázek 37: Snímek systému chondroitin sulfátu-lipid z elektronového mikroskopu při 2 000násobném zvětšení.

S ohledem na výše zmíněné lze pak zřejmě objasnit velmi překvapivé prvkové složení měřených vzorků s hyaluronanem a polystyrensulfonátem. Ve výsledcích prvkové analýzy se objevovaly prvky jako křemík, vápník, draslík, hliník, ale i titan, přičemž očekávatelný prvek jako uhlík, který se hojně vyskytuje jak v polymeru, tak i u lipidů, se u mnohých měření neobjevil vůbec, ačkoliv měření byla provedena několikrát na mnoha různých pozicích. Přítomnost širokého spektra prvků lze zřejmě přisuzovat malému množství vzorku, které zůstalo deponováno na zkumavce, kdy při odebrání vzorku skalpelem mohla být odebrána i část skla zkumavky. Tato měření tedy nelze považovat za relevantní. Pouze u vzorku s chondroitin sulfátem byla naměřena přítomnost prvků, které by se daly očekávat za předpokladu, že fázově separovaný systém je tvořen CS a lipozomy s obsahem fosfolipidu a kationtového lipidu, bez přítomnosti dalších prvků. Ve vzorku byl přítomen C (86,51 %hm.), O (11,46 %hm.), P (1,21 %hm.), S (0,82 % hm.), přičemž při dalších měřeních se ve spektru objevil i chlor a sodík. Mezi zastoupenými prvky se však při žádném z měření neobjevil dusík, který se nachází jak na monomeru chondroitin sulfátu, tak na každém z lipidů.

Měření prvkové analýzy s využitím elektronového mikroskopu se neukázalo jako vhodná metoda pro stanovení fázově separovaných systémů zejména z důvodu problémů při přípravě vzorků spojených s nutností suchosti vzorku. Zároveň nemohlo být provedeno ani měření prvkového složení srovnávacího vzorku (roztok nad sraženinou), neboť již při měření samotných sraženin došlo k velkému zkreslení prvkového složení z důvodu minimálního množství suchého vzorku. Z důvodu velké hydratace fázově separovaných systémů pak nelze

příliš usuzovat ani na strukturu těchto systémů z pořízených snímků. Pro případné objasnění struktury nativního fázově separovaného systému by bylo vhodnější použít metodu cryo-SEM, která umožňuje zachování struktury vzorku i při pozorování ve vakuu mikroskopu.

4.8 Rentgenová fluorimetrie

S využitím rentgenové fluorimetrie byla u vybraných základních vzorků provedena prvková analýza s cílem, stejně jako u elektronové mikroskopie (viz kapitola 4.7), ověřit a potvrdit složení fázově separovaných systémů.

Při této metodě bylo zkoumáno prvkové složení sraženiny, která byla za sníženého tlaku přefiltrována přes membránu o pórech 45 μm . Membrána by tedy měla být propustná pro samostatné lipozomy i případné menší systémy vzniklé vzájemnou interakcí. Jako kontrolní vzorek bylo provedeno měření membrány, přes kterou byl přefiltrován supernatant nad odstředěnými fázově separovanými systémy.

Tabulka 14: Výsledky prvkové analýzy pomocí metody rentgenové fluorimetrie.

polymer	intenzita P [%]		intenzita S [%]	
	blank	vzorek	blank	vzorek
HyA	5	40	0	16
CS	19	37	26	30
PSS	4	22	24	57

V Tabulce 14 jsou zobrazeny vybrané výsledky prvkové analýzy fázově separovaných systémů a jejich srovnávacích vzorků, přičemž jsou zastoupeny pouze prvky – fosfor, který je součástí lipidů DPPC, a síra, která se nachází pouze na chondroitin sulfátu a polystyrenulfonátu. Ostatní prvky charakteristické pro systémy polymer-lipid jako uhlík, kyslík, vodík, (dusík) nebyly měřeny, neboť vzorky byly proměřovány na celulózové membráně, takže by tyto výsledky mohly být zatíženy velkou chybou. Díky membráně tvořené různými estery celulózy se pak zřejmě ve výsledcích objevily prvky hořčík, měď, vápník, železo a hliník.

Z porovnání procentuelního zastoupení fosforu v měřených vzorcích a vzorku srovnávacím lze jednoznačně usuzovat, že fázově separované systémy obsahují ve své struktuře lipozomy s lipidem DPPC, jenž je nositelem fosfátové skupiny. Zároveň lze tvrdit, že fázově separované systémy vznikají interakcí lipozomů a polymeru, neboť samotné lipozomy filtrem prochází. Malé množství fosforu ve srovnávacích vzorcích může být způsobeno přípravou srovnávacích vzorků, kdy spolu se supernatantem mohlo být na membránu naneseno i malé množství sraženiny, jež se následně na membráně zachytilo a bylo detekováno. Srovnávací vzorek chondroitin sulfátu pak zřejmě obsahoval větší množství nanesených sraženin, takže intenzity obou měřených prvků srovnávacího vzorku jsem poměrně vysoké.

Z měření intenzity síry u vzorku hyaluronanu lze usuzovat, že celulózová membrána obsahuje sulfatované estery. Ty mohou zkreslovat výsledky měření pro tento prvek, neboť samotné vzorky s hyaluronanem žádnou síru neobsahují. Nicméně i při odečtení intenzity síry srovnávacího vzorku od vzorku se sraženinou u polystyrenulfonátu získáme 33% intenzitu pro tento prvek. Poměr korigovaných intenzit fosforu a síry pro PSS je tedy

0,6. Při koncentraci roztoku lipidů ve vzorku $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, je koncentrace DPPC, jenž je nositelem fosforu, $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace monomerních jednotek PSS nesoucích fosfor je $0,38 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poměr koncentrací DPPC a PSS je pak 0,7. Získané intenzity fosforu a síry pro PSS tedy odpovídají předpokládanému zastoupení těchto prvků u fázově separovaných systémů, které vznikají v důsledku interakce kladně nabitých lipozomů s aniontovými polyelektrolyty.

Analýza vybraných prvků fázově separovaných systémů pomocí metody rentgenové fluorimetrie potvrdila předpoklad této práce. Tím je vzájemná interakce kladně nabitých lipozomů s aniontovými polyelektrolyty, jež vede k fázové separaci.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí v systémech polymer-lipid. Hlavním těžištěm této práce pak byly interakce vedoucí k fázové separaci.

V první části experimentální práce byly připraveny vzorky s konstantním ekvimolárním poměrem lipidů DPPC a DPTAP a různým hmotnostním poměrem lipidů DPTAP a polymeru. Bylo zjištěno, že k fázové separaci dochází u všech vzorků se specifickým hmotnostním poměrem DPTAP/polymer, resp. specifickým poměrem záporných nábojů na polyelektrolytu a kladných nábojů na povrchu lipozomu. Zároveň hraje, při fázové separaci, významnou roli i nábojová hustota a samotná skupina odpovědná za polyelektrolytový charakter polymeru. Bylo tedy navrženo, že při fázové separaci dochází k interakci a jevu podobnému fyzikálnímu zesílení hyaluronanových hydrogelů s vysokou pevností uzlů.

Následně byly připraveny vzorky s různým molárním poměrem lipidů DPPC/DPTAP a hyaluronanem. Byly připraveny dvě řady vzorků, ve kterých byl zachováván buď konstantní hmotnostní poměr 2 DPTAP/HyA či konstantní koncentrace hyaluronanu (v poměru 2 DPTAP/HyA pro ekvimolární směs, tedy s koncentrací hyaluronanu $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Z těchto měření vyplývá, že pro fázovou separaci jsou důležité zejména přístupné kladně nabitě skupiny na povrchu lipozomu, které mohou interagovat s opačnými náboji na polyelektrolytu.

U směsných lipozomů, s různým molárním poměrem lipidů DPPC a DPTAP, byla proměřena velikost částic a zeta potenciál pomocí měření rozptylů světla (dynamického a elektroforetického). Z těchto měření lze usuzovat, že částice tvořené při ekvimolárním zastoupení lipidů jsou největší a nejstabilnější, a to z důvodu optimálního uspořádání, kdy dochází k odstínění repulzí mezi stejně nabitými skupinami, což bylo naznačeno i v dostupné literatuře. Pro další práci s fázově separovanými systémy byla tedy volena, zejména díky nejvyššímu zeta potenciálu, ekvimolární směs lipidů.

Pro vybrané systémy polymer-lipid byla ověřena možnost inkorporace hydrofobního barviva sudánové červeně G. Vznik narůžovělých opaleskujících zásobních roztoků lipozomů s inkorporovaným hydrofobním barvivem nasvědčoval, že samotné lipozomy jsou schopny solubilizovat hydrofobní látky. Narůžovělé fázově separované systémy pak svědčí o vzájemné interakci mezi polymerem, který má charakter aniontového polyelektrolytu, a opačně nabitými lipidy. Tyto fázově separované systémy tedy obsahují hydrofobní domény, takže stejně jako například hyaluronanové hydrogely dokážou do své struktury inkorporovat hydrofobní látky.

V další části práce byla snaha stanovit interakci, jež vede k fázové separaci. Pro tento účel byla navržena série experimentů, ve kterých byla interakce vedoucí k fázové separaci ovlivňována, a to zejména různými solemi (a neiontovou močovinou). Látky byly voleny tak, aby byla snížena buď případná elektrostatická, nebo hydrofobní interakce. Popřípadě aby byla posílena hydrofobní interakce a fázová separace. Jak je z výsledků zřejmé, interakce způsobující fázovou separaci, ve vzorcích s kladně nabitými lipozomy a opačně nabitými polyelektrolyty, má svůj původ v interakcích elektrostatických, neboť i při použití kosmotropů došlo k oslabení interakce. K tomuto oslabení interakce došlo na základě zvýšení iontové síly v roztoku, přestože by kosmotropy měly podpořit případné hydrofobní interakce a fázovou separaci.

U vzorků s přídavkem NaOH byl po čase pozorován vznik kompaktních gelovitých struktur. Tato struktura však byla pozorována i ve vzorku samotných lipidů. Vysoká koncentrace NaOH tedy indukuje vznik kompaktních struktur připomínajících gel, bohužel na základě neobjasněného působení. Nicméně tato struktura není stabilní v delším časovém úseku, kdy se po určitém čase opět rozpadá na drobné fázově separované systémy.

Kompaktní fázově separované systémy pak byly podrobeny reologickým měřením z důvodu charakterizace struktury tvořící tento systém. Z měření frekvenčních testů vyplývá, že všechny vzorky (samotné lipidy i ty s přídavkem polymeru) vykazují viskoelastické chování s převládající elastickou odezvou charakteristickou pro gely. U vzorků obsahujících i polymer dochází ke zvýšení hodnot obou modulů v porovnání s kompaktním systémem tvořeným pouze lipidy. Přídavkem polymeru tedy dochází ke zvýšení mechanické odolnosti fázově separovaných kompaktních systémů při mechanickém namáhání. Rovněž dochází ke zvýšení hodnot komplexní viskozity, která má pro všechny vzorky klesající průběh charakteristický pro pseudoplastické chování polymerních roztoků.

V poslední části této práce byl věnován čas ověření složení fázově separovaných systémů pomocí měření prvkové analýzy s využitím elektronové mikroskopie (zároveň byla zkoumána morfologie povrchu vzorků s cílem alespoň přiblížit povrchovou strukturu) a rentgenové fluorimetrie. Tyto dvě metody byly řešeny ve spolupráci se zaměstnanci CMV. Měření prvkové analýzy s využitím elektronového mikroskopu se bohužel neukázalo jako vhodná metoda pro stanovení fázově separovaných systémů zejména z důvodu problémů při přípravě vzorků spojených s nutností suchosti vzorku. Ze stejného důvodu pak nelze příliš usuzovat ani na strukturu těchto systémů z pořízených snímků. Nicméně z měření rentgenové fluorescence fázově separovaných systémů, lze usuzovat, že fázově separované systémy jsou tvořeny vzájemnou interakcí kladně nabitých lipozomů s aniontovými polyelektrolyty. Touto analýzou byl tedy potvrzen předpoklad této práce.

Co se týče využití těchto systémů ve farmacii a medicíně, nabízí se použití gelu podobných systémů, které s největší pravděpodobností obsahují hydrofobní i hydrofilní (část rozpouštědla uzavřená při tvorbě lamel) domény. Tyto systémy by samozřejmě musely být nejprve mnohem lépe charakterizovány, například pomocí metody cryo-SEM, která umožňuje zachování struktury vzorku i při pozorování ve vakuu mikroskopu. Zároveň by se musela stabilizovat struktura, aby nedocházelo k její rychlé degradaci. Nicméně pokud by se toto podařilo, a potvrdila se dvojvrstevná lamelární struktura, dostali bychom systémy, které mohou inkorporovat jakékoliv léčivo. Zvýšením lamelarity by tento systém mohl vykazovat výrazný depotní účinek – systémy by tedy disponovaly zpomaleným řízeným uvolňováním. Uplatnění by pak mohly najít i lipozomy pokryté polymerem, které se zřejmě tvoří při nízkých poměrech DPTAP/polymer, a to jako cílené nosiče léčiv, neboť tyto systémy se již v této podobě (avšak zejména s modifikovaným hyaluronanem) využívají.

Závěrem lze říci, že cíle diplomové práce byly splněny. Byly připraveny fázově separované systémy založené na interakci (bio)polymer-lipid. Složení fázově separovaných systémů založených na nekovalentní interakci pak bylo vhodnými metodami ověřeno a samotná interakce stanovena. Zároveň bylo zhodnoceno potenciální využití těchto systémů ve farmacii a medicíně.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SVORČÍK, V.: Polymery stručně. [online]. 2012. [cit. 2016-02-11]. Dostupné také z: <http://old.vscht.cz/ipl/osobni/svorcik/Polymery.pdf>.
- [2] DUCHÁČEK, V.: *Polymery výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemická, 2006. 280 s.
- [3] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: Harperova biochemie. 3. vyd. Jinočany: H&H, 1998. 872 s. ISBN: 80-85787-38-5.
- [4] Škrob [online]. [cit. 2016-02-12]. Dostupné také z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/%C5%A0krob>.
- [5] Celulóza [online]. [cit. 2016-02-12]. Dostupné také z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Celul%C3%B3za>.
- [6] Protein structure [online]. [cit. 2016-03-01]. Dostupné také z: https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure.
- [7] Aminokyseliny, peptidy a proteiny [online]. [cit. 2016-02-03]. Dostupné také z: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:B%C3%ADlkoviny#Terci.C3.A1rn.C3.AD_s_truktura.
- [8] MIDURA, R. J., HASCALL, V. C., RODÉN, L., GOODSTONE, N. J., PLAAS, A., CALABRO, A.: Structure and Biosynthesis of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan. *Proteoglycans: Structure, Biology And Molecular Interactions*. 1. vyd. New York: Marcel Dekker, 2000. Kapitola 2, s. 5–26. ISBN 978-203-90972-0.
- [9] SCHUBERT, M., HAMERMAN, D.: Amino Sugar-containing Compounds in Cartilage, Tendon, and Intervertebral Discs. *Distribution and Biological Role: The Chemistry and Biology of Compounds Constraining Amino Sugars. VOLUME IIA: Distribution and Biological Role*. New York: Academic Press, 1965. Kapitola 31, s. 257–279.
- [10] LEOCI, R.: Animal by-products (ABPs): origins, uses, and European regulations. 1. vyd. Mantova: Universitas Studiorum, 2014. 192 s. ISBN 978-88-97683-47-6.
- [11] BHAVANANDAN, V. P., DAVIDSON, E. A.: Proteoglycans: Structure, Synthesis, Function. *Glycoconjugates: Composition, Structure, and Function*. 1.vyd. New York: Marcel Dekker, 1992. Kapitola 7, 689 s. ISBN:0-8247-8431-6.
- [12] HARDINGHAM, T. E., FOSANG, A. J. P.: Proteoglycans: many forms and many functions. *The FASEB Journal* [online]. 1992, roč. 6, č. 3, s. 861–870 [cit. 2016-02-27]. Dostupné také z: <http://www.fasebj.org/content/6/3/861.long>.
- [13] ICHIJO, H., SUGIURA, N., KIMATA, K.: Application of Chondroitin Sulfate Derivatives for Understanding Axonal Guidance in the Nervous System during Development. *Polymers* [online]. 2013, roč. 5, č. 1, s. 254–268 [cit. 2016-02-27]. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/5/1/254/htm>.
- [14] PAVELKA, K., ADAM, M., OLEJÁROVÁ, M.: Osteoartróza. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén, 2003. Část II: kapitola 35, s. 391–413.
- [15] OLEJÁROVÁ, M.: Chondroitin sulfát. *Remedia* [online]. 2010, roč. 20, č. 3, s.158–163 [cit. 2016-02-27]. Dostupné také z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Chondroitin-sulfat/6-I-Tz.magarticle.aspx>.
- [16] KIAINI, C., CHEN, L., WU, Y. J., YEE, A. J., YANG, B. B.: Structure and fiction of aggrecan. *Cell Research* [online]. 2002, roč. 12, č. 1, s. 19–32 [cit. 2016-02-27]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942407>
- [17] SLANINA, J.: Polysacharidy.[online přednáška]. Brno: Biochemický ústav LF MU (E.T.), 2013 [cit. 2016-02-28]. Dostupné také z: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:rkFT9BfVGeIJ:is.muni.cz/e>

[l/1411/podzim2013/BLLC0111p/um/polysacharidy13.ppt%3Flang%3Dcs+&cd=3&hl=cs&ct=clnk&gl=cz](http://1411/podzim2013/BLLC0111p/um/polysacharidy13.ppt%3Flang%3Dcs+&cd=3&hl=cs&ct=clnk&gl=cz).

- [18] LIEBERMAN, M., MARKS, A. D.: Mark's Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach. 4. vyd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1 024 s. ISBN: 978-809315727.
- [19] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K.: Biosynthesis of food components. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 2006. 497 s. ISBN: 978-80-86659-12-1.
- [20] CAMPO, G. M., AVENOSO, A., CAMPO, S., FERLAZZO, A. M., CALATRONI, A.: Chondroitin sulphate: Antioxidant properties and beneficial effects. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2006, roč. 6, č. 12, s. 1 311–1 160 [cit. 2016-02-27]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17168807>.
- [21] JIRSOVÁ, K.: Příprava rohovky pro transplantaci: historie, současnost, budoucnost. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2013. 169 s. ISBN 978-80-246-2475-4.
- [22] DUNG, P. A KOLEKTIV: Ortopedie: 2., přepracované a doplněné vydání. 2. Vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014. 1 681s. ISBN978-80-247-4357-8.
- [23] Proenzi Premium [online]. [cit. 2016-03-04]. Dostupné také z: <http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/42/proenzi.pdf>.
- [24] Pohled na chondroitin sulfát se dramaticky mění. *Medical Tribune* [online]. 2015, č. 8 [cit. 2016-03-03]. Dostupné také z: <http://www.tribune.cz/clanek/35922-pohled-na-chondroitin-sulfat-se-dramaticky-meni>.
- [25] MEYER, K., PALMER, J. W. J.: Polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1934, č. 54, s. 629–634 [cit. 2016-02-02]. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/content/54/3/629.full.pdf+html>.
- [26] DICKER, K. T., GURSKI, L. A., PRADHAN-BHATT, S., WITT, R. L., FARACH-CARSON, M. C., JIA, X.: Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia* [online]. 2014, roč. 10, č. 4, s. 1 558–1 570 [cit. 2016-02-10]. ISSN 1742-7061. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113006156>.
- [27] SLÍVA, J., MINÁRIK, J.: Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine* [online]. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75–79 [cit. 2016-02-04]. Dostupné také z: http://neumm.cz/public/img/neumm_09_1-2/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf.
- [28] ATKINS, E. D., SHEEHAN, J. K.: The molecular structure of hyaluronic acid. *Biochemical journals* [online]. 1971, sv. 125, č. 4, s. 92 [cit. 2016-02-10]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1178299/?page=1>.
- [29] COWMAN, K. M., MATSUOKA, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate research* [online], 2005, č. 340, s. 791–809 [cit. 2016-03-13]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621505000534>.
- [30] HASCALL, V., LAURENT, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online]. 1997, sv. 98, č. 8, s. 2 663–2 684 [cit. 2016-03-13]. Dostupné také z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#IV>.
- [31] NECAS, J., BARTOSKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina* [online]. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397–411 [cit. 2016-03-13]. Dostupné také z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>.
- [32] KOGAN, G., ŠOLTĚS, L., STERN, R., GEMEINER, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, roč. 29, č. 1, s. 17–25 [cit. 2016-02-28]. Dostupné také z: <https://www.visibleyouth.com/pdf/ha-natural-biopolymer.pdf>.

- [33] Hyaluronát sodný – kyselina hyaluronová [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné také z: <http://www.cocky-kontaktni.cz/kyselina-hyaluronova.html>.
- [34] RAH, M.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry* [online]. 2011, roč. 82, č. 1, s. 38–43 [cit. 2016-02-15]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1529183910005129>.
- [35] ATALA, A., LANZA, R., NEREM, R., THOMSON, J. A.: Principles of regenerative medicine. Boston: Elsevier Academic Press, 2011. 1 472 s. ISBN 978-0-12- 369410-2.
- [36] PAVELKA, K.: Intraartikulární léčba kyselinou hyaluronovou. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. Kapitola 17, s. 183–194. ISBN: 80-247-0459-8.
- [37] JIN, Y.-J., UBONVAN, T. KIM, D.-D.: Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2010, roč. 40, č. special issue, s. 33–43 [cit. 2016-01-04]. Dostupné také z: [http://www.snupharm.ac.kr/ddkim/erp/erpmenus/professor_thesis/upLoadFiles/%EC%A7%84%EC%9C%A0%EC%A7%84-J%20Pharm%20Invest-Review%20\(2010.10\).pdf](http://www.snupharm.ac.kr/ddkim/erp/erpmenus/professor_thesis/upLoadFiles/%EC%A7%84%EC%9C%A0%EC%A7%84-J%20Pharm%20Invest-Review%20(2010.10).pdf).
- [38] Hyodine [online]. [cit. 2016-02-01]. Dostupné také z: <http://www.hyiodine.cz/spatne-hojeni-ran>.
- [39] Poly(sodium 4-styrenesulfonate) [online]. [cit. 2016-02-20] Dostupné také z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/434574?lang=en®ion=CZ>.
- [40] COUGHLIN, J. E., REISCH, A., MARKARIAN, M. Z., SCHLENOFF J. B.: Sulfonation of polystyrene: Toward the “ideal” polyelectrolyte. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2013, roč. 51, č. 8, s. 2 416–2 424 [cit. 2016-02-20]. Dostupné také z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pola.26627/abstract>.
- [41] MOCK, R. A.: Polymerization of styrene sulfonic acid. US patent 3123589 A, Sept 09, 1960.
- [42] FÖLSCH, U. R., KOCHSIEK, K., SCHMIDT, R. F.: Patologická fyziologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2003. 251–255 s. ISBN 80-247-0319-X.
- [43] SCHÜCK, O.: Poruchy metabolismu vody a elektrolytů v klinické praxi. 1.vyd. Praha Grada Publishing, 2000. 54–131 s. ISBN 80- 247- 9023- 3.
- [44] Calcium resonium [online]. [cit. 2016-02-20]. Dostupné také z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0137275&tab=texts>.
- [45] ICSI – nejprve prosím oloupat spermie [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné také z: <http://www.osel.cz/1461-icsi-prosim-nejprve-oloupat-spermie.html>.
- [46] Akrosin [online]. [cit. 2016-02-13]. Dostupné také z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/akrosin>.
- [47] ZANEVELD, L. J. D. ET AL: Efficacy and Safety of a New Vaginal Contraceptive Antimicrobial Formulation Containing High Molecular Weight Poly(Sodium 4-Styrenesulfonate). *Biology of reproduction* [online]. 2002, roč. 66, č. 4, s. 886–894 [cit. 2016-02-23]. Dostupné také z: <http://www.biolreprod.org/content/66/4/886.full>.
- [48] RABIŠKOVÁ, M., DVOŘÁČKOVÁ, K., MASTEIKOVÁ, R.: Mikrobicidy v lékových formách. *Remedia* [online]. 2008, č. 2, s. 181–184 [cit. 2016-02-22]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Mikrobicidy-v-lekovych-formach/6-H-jo.magarticle.aspx>.
- [49] Herpes simplex [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné také z: <http://www.pohlavni-nemoci-a-jejich-priznaky.cz/herpes-simplex>.
- [50] Kapavka, bakterie Neisseria gonorrhoeae [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné také z: <http://www.venerologie.cz/onemocneni/kapavka/>.

- [51] Chlamydia trachomatis [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chlamydia_trachomatis.
- [52] HEROLD, B. C. ET AL.: Poly(Sodium 4-Styrene Sulfonate): An Effective Candidate Topical Antimicrobial for the Prevention of Sexually Transmitted Diseases. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 2000, roč. 181, č. 2, s. 770–773 [cit. 2016-03-12]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669374>.
- [53] SIMOES, J. A., CITRON, D. M., AROUTCHEVA, A., ANDERSON, JR. R. A., CHANY, C. J., WALLER, D. P., FARO, S. ZANEVELD, L. J.: Two Novel Vaginal Microbicides (Polystyrene Sulfonate and Cellulose Sulfate) Inhibit *Gardnerella vaginalis* and Anaerobes Commonly Associated with Bacterial Vaginosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, roč. 46, č. 8, s. 2 692–2 695 [cit. 2016-02-23]. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/content/46/8/2692.fu>.
- [54] KODÍČEK, M.: Biochemické pojmy – výkladový slovník. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2004. 171 s. ISBN: 80-7080-551-X.
- [55] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: Harperova biochemie. 3. vyd. Jinočany: H&H, 1998. 872 s. ISBN: 80-85787-38-5.
- [56] Klasifikace a struktura lipidů [online]. [cit. 2016-03-04]. Dostupné také z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Klasifikace_a_struktura_lipid%C5%AF.
- [57] VOET, D., VOETOVÁ, J. G.: Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing a.s., 1995. 1 362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [58] Fosfolipidy [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné také z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-lipidy-fosfolipidy>.
- [59] SIMBERG, D., WEISMAN, S., TALMON, Y., BARENHOLZ, Y.: DOTAP (and Other Cationic Lipids): Chemistry, Biophysics and Transfection. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2014, sv. 21, č. 4, s. 257–317 [cit. 2016-03-16]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638468>.
- [60] JUNGLAS, M., DANNER, B., BAYERL, T. M.: Molecular Order Parameter Profiles and Diffusion Coefficients of Cationic Lipid Bilayers on a Solid Support. *Langmuir* [online]. 2003, r. 19, č. 5, s. 1 914–1 917 [cit. 2016-01-23]. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la026468s>.
- [61] SOPPIMATH, K. S.: What are liposomes? *NanoPharmaceuticals* [online]. 2006 [cit. 2016-01-22]. Dostupné také z: <<http://www.nanopharmaceuticals.org/Liposomes.html>>.
- [62] BANGHAM, A. D., HORNE, R. W.: Negative staining of phospholipids and structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964, č. 8, s. 660–668.
- [63] WEISMANN, G.: Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *The Journal of Lipid Research*. 1968, 9, s. 310–318.
- [64] BERGSTRAND, N.: Liposomes for Drug Delivery. Uppsala University (Sweden), 2003. 71 s. ISBN 91-554-5592-1.
- [65] DEAMER, D. W.: From „Banghasomes“ to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010. *The FASEB Journal* [online]. 2010, sv. 24, č. 5, s. 1 308–1 310 [cit. 2016-01-22]. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/24/5/1308.full> www.fasebj.org/content/24/5/1308.full.
- [66] Povrchově aktivní látky. [online]. Textilní chemie - Katedra textilních materiálů, Technická univerzita v Liberci [cit. 2016-04-04]. Dostupné také z: <http://www.ft.tul.cz/depart/ktm/files/20130311/TCH-úloha3-povrchově%20aktivní%20látky.pdf>.
- [67] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav, Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80–7080–475–0.

- [68] SHARMA, V. K., MISHRA, D. N., SHARMA, A. K., SRIVASTAVA, B.: Liposomes: Present Prospective and Future Challenges. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* [online]. 2010, r. 1, č. 2, 16 s. [cit. 2016-03-20]. Dostupné také z: <http://impactfactor.org/PDF/IJCPR/1/IJCPR,Vol1,Issue2,Article2.pdf>.
- [69] HADAŠOVÁ, E.: Lipozomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, č. 4, 433–437 s. [cit. 2016-01-28]. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>.
- [70] DANIELS, R.: Galenic principles of modern skin care products. *Skin Care Forum* [online]. 2001 [cit. 2016-03-16]. Dostupné také z: <http://www.skin-care-forum.basf.com/en/artikel/haut/galenic-principles-of-modern-skin-care-products/2001/04/15?id=81fb2fb5-f040-4e82-9f6f-8f4b20e9e05f&mode=Detail>.
- [71] THIASUN, L., RODNEY, J. Y.: Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical science* [online]. 2001 sv. 90, č. 6 [cit. 2016-03-25]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357170>.
- [72] GZYL-MALCHER, B., FILEK, M., BREZESINSKI, G.: Mixed DPPC/DPTAP Monolayers at the Air/Water Interface: Influence of Indolilo-3-acetic Acid and Selenate Ions on the Monolayer Morphology. *Langmuir* [online]. 2011, č. 27, s. 10 886–10 893 [cit. 2016-01-25]. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la201765u>.
- [73] REGELIN, A. E., FANKHAENEL, S., GÜRTECH, L., PRINZ, C., KIEDROWSKI, G., MASSING, U.: Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2000, sv. 1 464, č. 1, s. 151–164 [cit. 2016-01-26]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273600001267>.
- [74] CRESCENZI, V., TAGLIANTI, A., PASQUALI-RONCHETTI, I.: Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an elektron microscopy and rheometric study. *Colloids and Surfaces* [online]. 2004, sv. 245, s. 133–135 [cit. 2016-02-04]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775704004236>.
- [75] PASQUALI-RONCHETTI, I., QUAGLINO, D., MORI, G., BACCHELI, B., GHOSH, P.: Hyaluronan-Phospholipid interaction. *Journal of Structural Biology* [online]. 1997, sv. 120, č. 1, s. 1–10 [cit. 2016-01-28]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847797939083>.
- [76] QUEMENEUR, F., RINAULDO, M., PÉPIN-DONAT, B.: Influence of polyelectrolyte chemici structure on their interaction with lipid membrane of zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules* [online]. 2008, r. 9, č. 8 s. 2 237–2 243 [cit. 2016-01-27]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590310>.
- [77] ARPICCO, S., LERDA, C., DALLA POZZA, E., COSTANZO, C., TSAPIS, N., STELLA, B., DONADELLI, M., DANDO, E., FATTAL, E., CATTEL, L., PALMIERI, M.: Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine: an electron microscopy and rheometric study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2013, sv. 85, č. 3, s. 373–380 [cit. 2016-02-01]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964111300221X>.
- [78] PEER, D.: Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* [online]. 2003, sv. 1 612, č. 1, s. 76–82 [cit. 2016-01-20]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273603001068>.

- [79] TROUTIER, A. L., VÉRON, L., DELAIR, T., PICHOT, CH., LADAVIERE, C.: New insights into selforganization of a model lipid mixture and quantification of its adsorption on spherical polymer particles. *Langmuir* [online]. 2005, roč. 21, č. 22, s. 9 901–9 910 [cit. 2016-01-15]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229507>.
- [80] SZEWIECZKOVÁ, J.: Fosfolipidy jako základ biodegradabilních nosičových systémů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [81] VÁCLAVÍKOVÁ, E., KVASNIČKA, F.: Quality Control of Chondroitin Sulphate used in Dietary Supplements. *Czech Journal of Food Science* [online]. 2015, roč. 33, č. 2, s. 165–173 [cit. 2016-03-18]. Dostupné také z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/148549.pdf>.
- [82] Dynamický rozptyl světla. Krystalografická společnost [online]. [cit. 2016-03-20]. Dostupné také z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>.
- [83] KIENLE, D. F., de SOUZA, J. V., WATKINS, E. B., KUHL, T. L.: Thickness and refractive index of DPPC and DPPE monolayers by multiple-beam interferometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, sv. 406, č. 19, s. 4 725–4 733 [cit. 2016-03-29]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842403>.
- [84] CHAPLIN, M.: Kosmotropes and Chaotropes. Water Structure and Science [online]. [cit. 2016-03-30]. Dostupné také z: http://www1.lsbu.ac.uk/water/kosmotropes_chaotropes.html.
- [85] MONDEK, J., MRAVEC, F., VENEROVÁ, T., HNÝLUCHOVÁ, Z., PEKAŘ, M.: Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyt-Surfactant Interaction. *Langmuir*. 2014, roč. 30, č. 29, s. 8 726–8 734.
- [86] RUSSO, D.: The impact of kosmotropes and chaotropes on bulk and hydration shell water dynamics in a model peptide solution. *Chemical Physics* [online]. 2008, sv. 345, č. 2, s. 200–211 [cit. 2016-03-31]. Dostupné také z: http://www.ncnr.nist.gov/instruments/dcs/dcs_pdf_files/Russo2008.pdf.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam zkratky
CMC	kritická micelární koncentrace
CS	chondroitin-6-sulfát sodný
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-fosfoethanolamin
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylamonium-propan
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-fosfocholin
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-fosfoethanolamin
DPTAP	1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan
HyA	hyaluronan sodný
IAA	kyselina indol-3-octová
LUV	velké unilamelární vezikuly
MLV	velké multilamelární vezikuly
MVV	multivezikulární vezikuly
PSS	poly(4-styrensulfonát) sodný
SUV	malé unilamelární vezikuly

7.2 Seznam symbolů

Symbol	Význam veličiny	Jednotka
M_w	molekulová hmotnost	Da = g · mol ⁻¹
ζ	zeta potenciál	mV
η^*	komplexní viskozita	Pa · s
G'	paměťový (elastický) modul	Pa = N · m ⁻²
G''	ztrátový (viskózní) modul	Pa = N · m ⁻²

8 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Fotografie systémů polystyrensulfonát-lipid s různým hmotnostním poměrem DPTAP/polystyrensulfonát. **A)** poměr 3,9 – PSS $82 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, **B)** poměr 3 – PSS $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, **C)** poměr 2 – PSS $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, **D)** poměr 1 – PSS $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- Příloha 2: Fotografie systémů polymer-lipid s inkorporovaným barvivem sudánová červeň G – koncentrace 10^{-4} M . **A)** hyaluronan-lipid, **B)** chondroitin sulfát-lipid, **C)** polystyrensulfonát-lipid.
- Příloha 3: Fotografie fázově separovaných systémů chondroitin sulfát-lipid s poměrem 3,2 hmotnostních koncentrací DPTAP/CS s různou koncentrací chloridu sodného. **A)** $0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **B)** $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **C)** $250 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **D)** $500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **E)** $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$.
- Příloha 4: Fotografie fázově separovaných systémů polystyrensulfonát-lipid s poměrem 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/PSS s různou koncentrací chloridu sodného. **A)** $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **B)** $500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **C)** $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, **D)** $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$.
- Příloha 5: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce kosmotropy o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. **A)** Na_2HPO_4 , **B)** NaOH . Foceno po 48 hodinách od přidavku kosmotropů.
- Příloha 6: Fotografie fázově separovaných systémů polymer-lipid po ovlivnění interakce NaOH o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. **A)** HyA, **B)** CS, **C)** PSS.
- Příloha 7: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce NaOH o různé koncentraci. **A)** $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, **B)** $95 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, **C)** $145 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, **D)** $375 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Foceno po 45 dnech od vzniku kompaktní struktury.
- Příloha 8: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce NaOH o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a vložení do různých prostředí. **A)** $0,15 \text{ M NaCl}$, **B)** pufr, **C)** superčistá voda. Horní snímek focen ihned po vložení, střední po 48 hodinách, spodní po 7 dnech.
- Příloha 9: Snímek systému hyaluronan- lipid z elektronového mikroskopu při 2 000násobném zvětšení.
- Příloha 10: Snímek systému polystyrensulfonát- lipid z elektronového mikroskopu při 2 000násobném zvětšení.

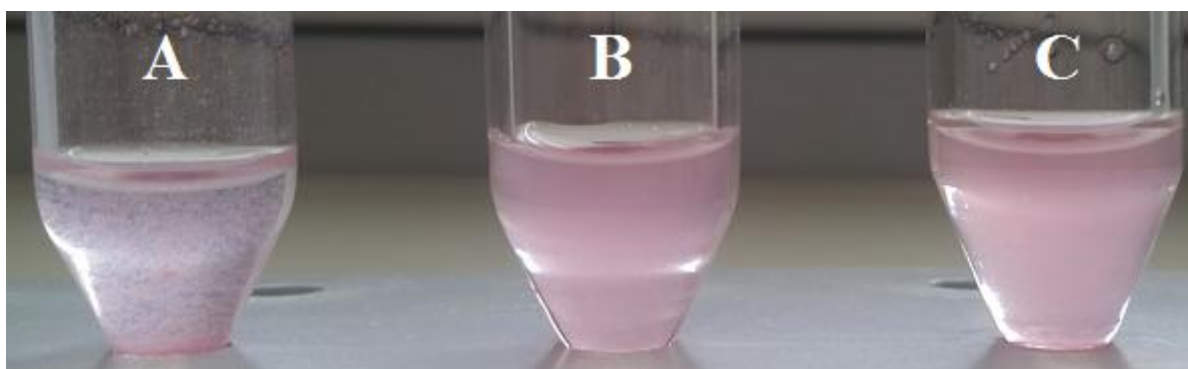
10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1



Obrázek 38: Fotografie systémů polystyrensulfoát-lipid s různým hmotnostním poměrem DPTAP/polystyrensulfoát. A) poměr 3,9 – PSS $41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, B) poměr 3 – PSS $54 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, C) poměr 2 – PSS $80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, D) poměr 1 – PSS $160 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

10.2 Příloha 2



Obrázek 39: Fotografie systémů polymer-lipid s inkorporovaným barvivem sudánová červeň G – koncentrace $10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) hyaluronan-lipid, B) chondroitin sulfát-lipid, C) polystyrensulfoát-lipid.

10.3 Příloha 3



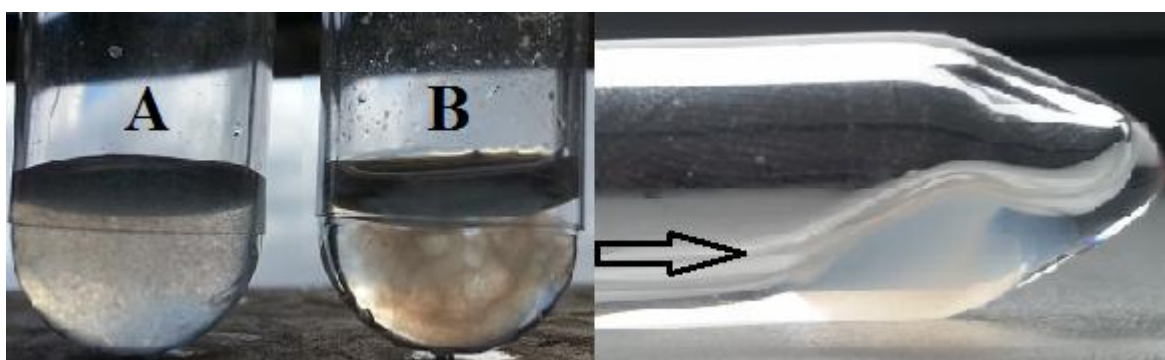
Obrázek 40: Fotografie fázově separovaných systémů chondroitin sulfát-lipid s poměrem 3,2 hmotnostních koncentrací DPTAP/CS s různou koncentrací chloridu sodného. A) $0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, B) $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, C) $250 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, D) $500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, E) $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl.

10.4 Příloha 4



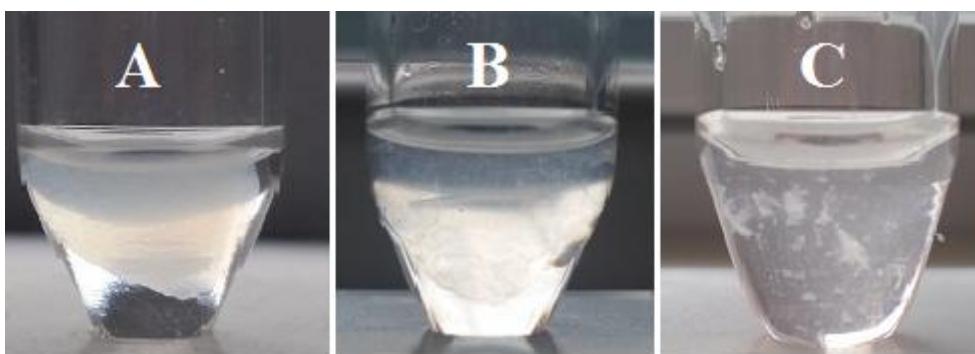
Obrázek 41: Fotografie fázově separovaných systémů polystyrensulfonyl-lipid s poměrem 2 hmotnostních koncentrací DPTAP/PSS s různou koncentrací chloridu sodného. A) $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, B) $500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, C) $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, D) $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$.

10.5 Příloha 5



Obrázek 42: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce kosmotropy o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) Na_2HPO_4 , B) NaOH . Foceno po 48 hodinách od přidavku kosmotropů.

10.6 Příloha 6



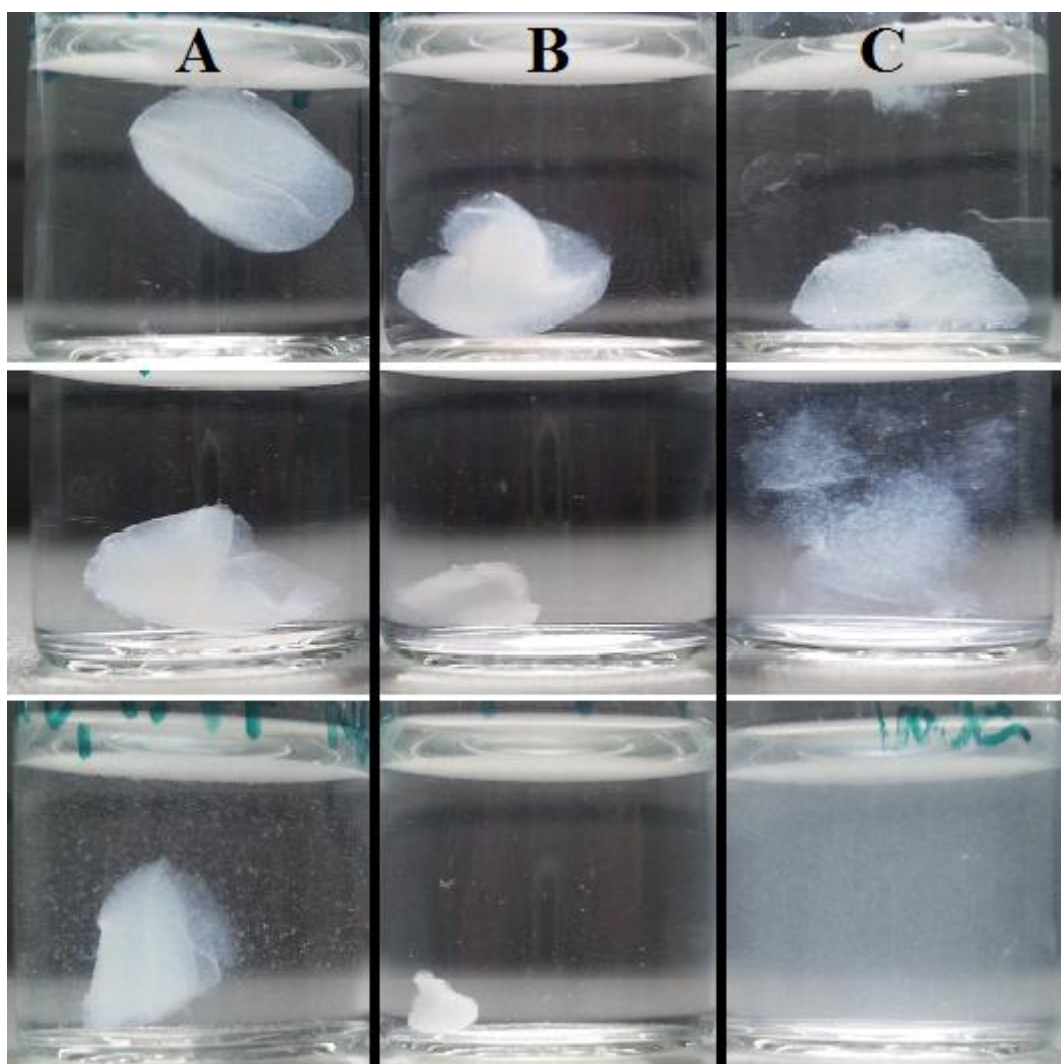
Obrázek 43: Fotografie fázově separovaných systémů polymer-lipid po ovlivnění interakce NaOH o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. A) HyA, B) CS, C) PSS.

10.7 Příloha 7



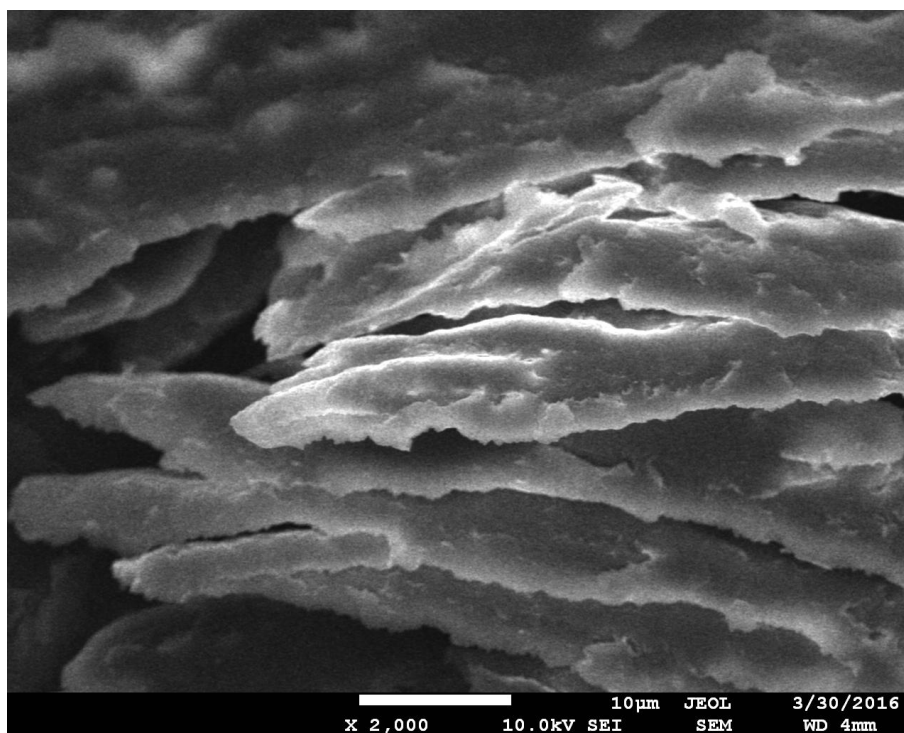
Obrázek 44: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce NaOH o různé koncentraci. A) $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, B) $95 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, C) $145 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, D) $375 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Foceno po 45 dnech od vzniku kompaktní struktury.

10.8 Příloha 8



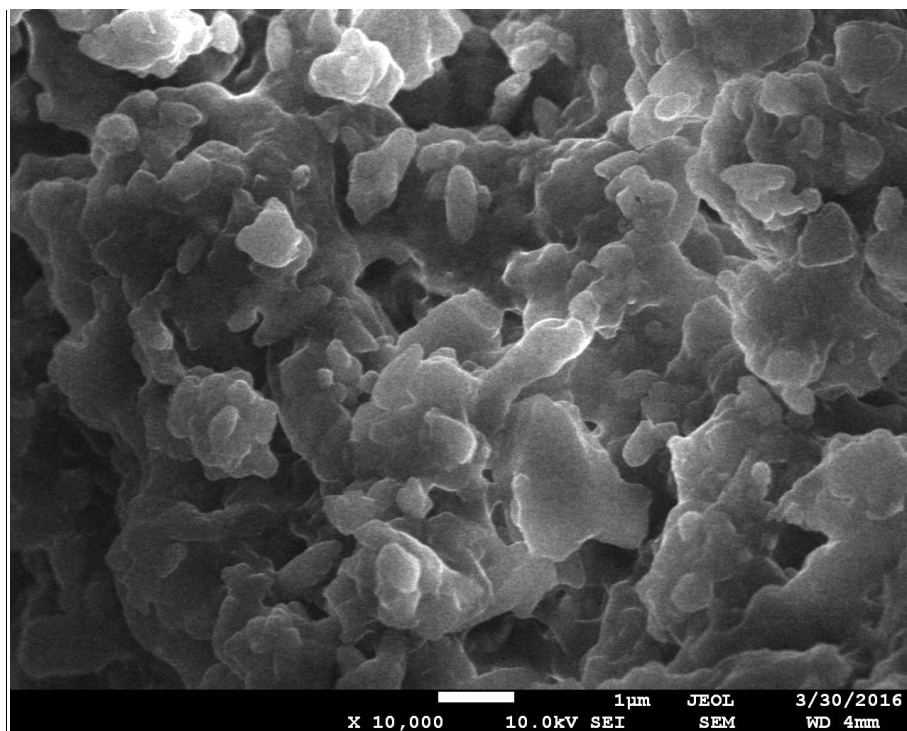
Obrázek 45: Fotografie fázově separovaných systémů hyaluronan-lipid po ovlivnění interakce NaOH o koncentraci $150 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a vložení do různých prostředí. A) $0,15 \text{ M NaCl}$, B) pufr, C) superčistá voda. Horní snímek focen ihned po vložení, střední po 48 hodinách, spodní po 7 dnech.

10.9 Příloha 9



Obrázek 46: Snímek systému hyaluronan- lipid z elektronového mikroskopu při 2 000násobném zvětšení.

10.10 Příloha 10



Obrázek 47: Snímek systému polystyrenesulfonát- lipid z elektronového mikroskopu při 10 000násobném zvětšení.