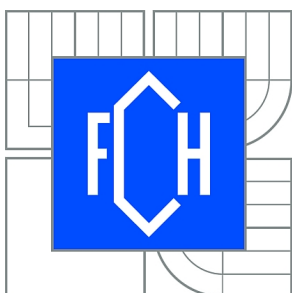


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

FOSFOLIPIDY JAKO ZÁKLAD BIODEGRADABILNÍCH NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ

PHOSPHOLIPIDS AS THE BASIS OF BIODEGRADABLE DELIVERY SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA SZEWIECZKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0767/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Jana Szewieczková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

Název diplomové práce:

Fosfolipidy jako základ biodegradabilních nosičových systémů

Zadání diplomové práce:

1. Shromáždit literární poznatky o chování fosfolipidů a interakci nativního hyaluronanu a fosfolipidů.
2. Na základě rešerše vybrat fosfolipidy a metody studia využitelné ke studiu interakcí mezi fosfolipidem a hyaluronanem.
3. Navrhnout a provést experimenty agregace fosfolipidů v přítomnosti hyaluronanu.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití takovýchto komplexů v kosmetice a farmacii.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Szewieczková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na zkoumání systému fosfolipid-hyaluronan. Nejdříve byla nalezena vhodná metoda pro přípravu zásobního roztoku fosfolipidu/lipidu a vhodná fluorescenční sonda. Jako metoda přípravy zásobního roztoku byla vybrána sonifikace a jako fluorescenční sonda pyren. Ze skupiny fosfolipidů byl použit lecitin. Pro srovnání byl vedle fosfolipidu použit i lipid fosfátovou skupinu postrádající (DPTAP), popřípadě směs lipidu a fosfolipidu (DPPC a DPTAP). Kromě hyaluronanu byly pro srovnání použity i jiné polyelektrolyty (polystyrensulfonát sodný a alginát sodný). Měření probíhala jak ve vodě, tak v roztoku fosfátového pufru. Veškerá měření proběhla pomocí fluorescenční spektroskopie a dynamického rozptylu světla.

ABSTRACT

This thesis is focused on investigation of phospholipid-hyaluronan system. First, appropriate method for preparation of bulk solution of phospholipid/lipid and suitable fluorescence probe were chosen. Sonification was selected as a method for preparation of bulk solution and pyrene was chosen as a fluorescence probe. From the group of phospholipids lecithin was selected. Next to phospholipid, lipid with no phosphate group (DPTAP) was utilized for comparison, alternatively a mixture of lipid (DPTAP) and phospholipid (DPPC). Instead of hyaluronan another polyelectrolytes (sodium polystyrene sulfonate, sodium alginate) were used too. Measurements were performed in water environment and in phosphate buffer saline (PBS). All investigation was accomplished by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, polystyrensulfonát, alginát, lipid, fosfolipid, fluorescence, fluorescenční sondy, dynamický rozptyl světla

KEY WORDS

hyaluronan, polystyrene sulfonate, alginate, lipid, phospholipid, fluorescence, fluorescence probes, dynamic light scattering

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..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za metodické vedení a věcné připomínky při zpracování diplomové práce, dále konzultantce Ing. Tereze Halasové za cenné podněty a obětavou spolupráci a prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborné rady.

Děkuji také své rodině a příteli za podporu při studiu a pomoc při psaní diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Lipidy.....	8
2.1.1	Rozdělení lipidů.....	8
2.1.2	Kationické lipidy.....	8
2.1.3	Fosfolipidy	8
2.1.4	Lecitin	9
2.2	Liposomy	10
2.2.1	Agregace amfifilních molekul	11
2.2.2	Packing parametr	12
2.2.3	Lipidové dvojvrstvy a lamelární fáze	12
2.2.4	Příprava liposomů	12
2.2.5	Liposomy v kosmetice	14
2.3	Kyselina hyaluronová	15
2.3.1	Historie.....	15
2.3.2	Chemická struktura	15
2.3.3	Struktura v roztoku	16
2.3.4	Výskyt a funkce	17
2.3.5	Metabolismus.....	17
2.3.6	Izolace	17
2.3.7	Využití	18
2.4	Polystyrenulfonát sodný.....	19
2.4.1	Příprava	19
2.4.2	Využití	19
2.5	Alginát sodný.....	19
2.5.1	Struktura a vlastnosti	19
2.5.2	Zdroje alginátu	20
2.5.3	Využití	20
2.6	Fluorescenční spektroskopie.....	20
2.6.1	Jabloněského diagram	20
2.6.2	Fluorescence	21
2.6.3	Fluorescenční zákony	22
2.6.4	Instrumentace.....	22
2.6.5	Fluorescenční sondy	23
2.7	Dynamický rozptyl světla	24
2.7.1	Velikost.....	24
2.7.2	Zeta potenciál a elektrická dvojvrstva	26
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	28
4	MATERIÁLY A METODY	34
4.1	Použité chemikálie.....	34
4.2	Metody.....	36
4.2.1	Příprava zásobních roztoků lipidů	36
4.2.2	Příprava zásobních roztoků polyelektrolytů a pufro.....	36
4.2.3	Příprava vzorků.....	37

4.2.4 Měření a zpracování výsledků	37
4.2.5 Statistika.....	38
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1 Vliv způsobu přípravy na agregační chování lecitinu	39
5.2 Agregace DPTAP ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů	42
5.3 Agregace lecitinu ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů	47
5.4 Agregace směsi DPPC a DPTAP ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů ...	51
5.5 Shrnutí naměřených průměrů částic a zeta potenciálů jednotlivých systémů	57
6 ZÁVĚR	58
7 POUŽITÁ LITERATURA	60
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	64
9 SEZNAM PŘÍLOH	65
10 PŘÍLOHY.....	66
10.1 Příloha 1	66
10.2 Příloha 2.....	67

1 ÚVOD

Ideální kosmetický přípravek pro každodenní použití by měl pokožku dobře hydratovat, nedráždit a také vyživovat. Pokud chceme tyto podmínky splnit, musíme připravit kosmetický přípravek z látek tělu vlastních, které budou snadno penetrovat přes svrchní vrstvy pokožky. Je známo, že zcela hydrofilní či zcela hydrofobní látky pokožkou prostupovat nemohou.

Spojením vynikajících hydratačních vlastností kyseliny hyaluronové a fosfolipidových liposomů by mohl vzniknout přípravek tyto vlastnosti mající. Lipidy jsou součástí nejsvrchnější vrstvy pokožky (*stratum corneum* – vrstva rohová), i vrstev dalších (*stratum granulosum* – vrstva zrnitá, *stratum spinosum* – vrstva ostnitá), proto jsou schopny pronikat do vnitřních vrstev pokožky. Kyselina hyaluronová i fosfolipidy jsou zcela biokompatibilní, lidskému tělu vlastní, samy o sobě by tedy neměly způsobit žádné podráždění pokožky. Navíc, dojde-li k vytvoření stabilních liposomů, mohou být schopné nést hydrofobní látky, jejichž aplikace v čistě hydrofilním systému by nebyla možná.

Tato práce je zaměřena na studium systémů lipid-hyaluronan z hlediska agregačního chování a stability v pufru a ve vodě. Bylo provedeno srovnání interakcí v systémech obsahujících i jiný polyelektrolyt, kromě hyaluronanu sodného byly studovány i agregace lipidů v přítomnosti polystyrensulfonátu sodného a některé i v přítomnosti alginátu sodného.

Z fosfolipidů byl vybrán lecitin, jenž tvoří buněčnou membránu téměř všech buněk. Nese jak kladný tak záporný náboj. Lecitin je směsí fosfolipidů s různými délkami alkylových řetězců, jež mohou být nasycené i nenasycené. Dále byl použit DPTAP (1,2-dipalmitoyl-3-trimetylamonium-propan), jenž na rozdíl od lecitinu neobsahuje fosfatidovou skupinu, tedy nese pouze kladný náboj, a na základě rešerše byla připravena i ekvimolární směs DPTAP a DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín), tedy směs kationaktivního lipidu a zwitterionického fosfolipidu.

U všech lipidů byla pomocí fluorescenční spektroskopie studována agregace jich samotných, dále ve směsi s hyaluronanem a polystyrensulfonátem, a to ve vodě i v pufru. Agregační chování ve směsi s alginátem bylo prostudováno pouze v případě lecitinu a DPTAP ve vodě. Při vybraných charakteristických koncentracích lipidu byla také vždy měřena s využitím metody dynamického rozptylu světla (DLS) i velikost agregátů a prostřednictvím zeta potenciálu i jejich stabilita v roztoku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy jsou heterogenní skupina sloučenin, která má přímo nebo nepřímo vztah k mastným kyselinám. Jejich společnou vlastností je relativní rozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech jako éter, chloroform a benzen.

2.1.1 Rozdělení lipidů

Následující rozdělení lipidů je odvozeno z Bloorovy klasifikace [1]:

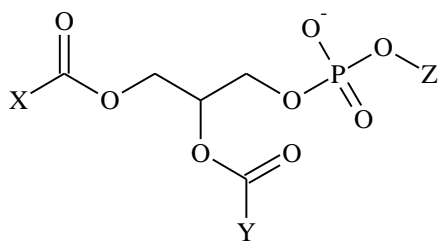
1. Jednoduché lipidy – estery mastných kyselin s různými alkoholy.
 - a) Tuky: Estery mastných kyselin s glycerolem. Tekuté tuky se nazývají oleje.
 - b) Vosky: Estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy.
2. Složené lipidy – estery obsahující mimo mastné kyseliny a alkohol ještě další skupiny.
 - 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. Prekursory a odvozené lipidy: Patří sem mastné kyseliny, steroidy, alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné alkoholy a ketolátky, uhlovodíky, v tucích rozpustné vitamíny a hormony.

2.1.2 Kationické lipidy

Nejvýznamnějším znakem kationických lipidů, které se v přírodě moc nevyskytují, je jejich kladný náboj při neutrálním pH. To umožňuje silné Coulombovy interakce s mnoha hlavně negativně nabitými komponenty buněk. Kationické lipidy ukotvené v membráně mohou být díky interakcím dalekého dosahu považovány za molekulární senzory pro spojování biomolekul. Kationické lipidy díky svému náboji tvoří ve vodě samovolně velmi malé útvary (menší než 50 nm) [2].

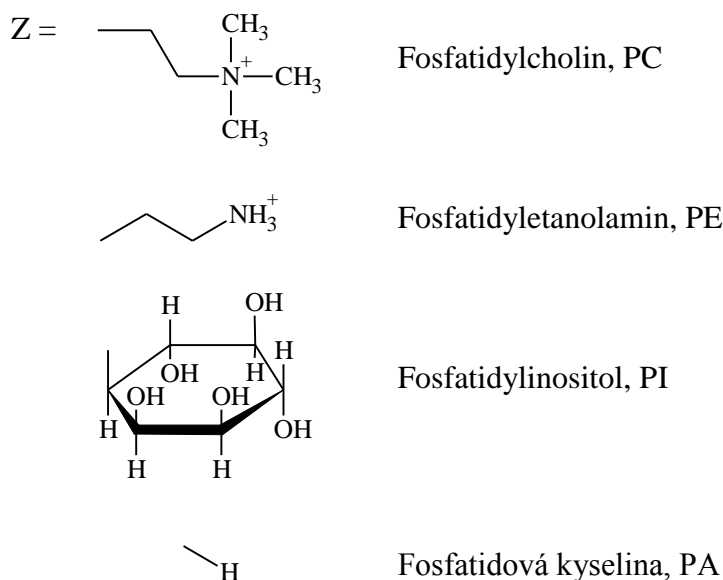
2.1.3 Fosfolipidy

Všichni přirozeně se vyskytující zástupci fosfolipidů jsou odvozeni od *sn*-glycero-3-fosfátu, tudíž mají základní strukturu uvedenou na Obr. 1.



Obr. 1 *sn*-glycero-3-fosfát [3]

Pokud jsou X a Y mastné kyseliny, mluvíme o diacyl-glycerofosfolipidech. Pokud jen jeden z nich představuje mastnou kyselinu a druhý atom vodíku, hovoříme o mono-acyl-glycerofosfolipidech neboli lyso-fosfolipidech. Acylové zbytky X a Y se mohou od sebe značně lišit (délka řetězce, saturace) v závislosti na původu (zdroji surového materiálu). Mimo to jsou X a Y v přírodních produktech stejné chemické povahy [3]. Na Obr. 2 jsou uvedeny typy fosfolipidů dle substituentu Z.



Obr. 2 Nomenklatura diacyl-*sn*-glycero-3-fosfolipidů podle substituentu Z [3]

Do skupiny fosfolipidů zařazujeme fosfatidovou kyselinu a fosfatidylglycerol, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, lysofosfolipidy, plasmalogeny a sfingomyeliny (rozdělení je uvedeno na Obr. 2). Všechny patří mezi fosfoacylglyceroly, s výjimkou sfingomyelinů, které glycerol neobsahují. Fosfoacylglyceroly můžeme považovat za deriváty kyseliny fosfatidové, ve které je kyselina fosforečná esterifikována s –OH skupinou vhodného alkoholu [3].

Fosfatidová kyselina je důležitým mezistupněm při syntéze triacylglycerolů a fosfoglycerolů, ale ve tkáních se ve větší míře nevyskytuje [1].

2.1.4 Lecitin

Lecitin byl objeven v roce 1846 francouzským chemikem M. Gobleyem. Z vaječného žloutku izoloval oranžově zbarvenou látku, kterou nazval lecitin, podle řeckého jména pro vaječný žloutek „lekithos“ („λέκιθος“). Později izoloval stejnou látku z mozku, krve, močového měchýře a jiných organických materiálů. Důležitým znakem těchto materiálů byl obsah fosforu organicky vázaného k lipidovým strukturám.

Trvalo řadu let, než bylo zjištěno, že se nejedná o jednotnou chemickou strukturu, ale o skupinu chemicky podobných, ale rozdílných složek, které jsou dnes klasifikovány jako fosfolipidy a fosfatidy. Také bylo zjištěno, že tato třída látek se vyskytuje ve všech organických tkáních a pletivech, ať už u rostlin, zvířat nebo ve tkáních lidského původu. Nejvyšší koncentrace lecitinu, kromě vaječného žloutku, byla zjištěna u oleje ze semínek sóji, slunečnice a jiných [3].

Lecitin formuje lipidovou hmotu biologických membrán a hraje klíčovou roli v buněčném metabolismu. Jako biokompatibilní tenzid je široce využíván v každodenním životě zahrnujících lidskou a živočišnou potravu, medicínu a kosmetiku [4].

2.1.4.1 Výskyt lecitinu

Lecitiny obsahují aminoalkohol cholin. Jsou to nejvíce zastoupené fosfolipidy buněčné membrány a představují velkou část tělových zásob cholinu. Cholin je důležitý pro přenos nervového vzruchu a také jako zásoba labilních metylových skupin. Dipalmitoyllecitin je povrchově velmi účinné agens, které zabraňuje adhezenci vnitřních povrchů plic způsobené povrchovým napětím. Jeho nedostatek v plicích u nezralých dětí způsobuje dechové selhání (respiratory distress syndrom, RDS) [1].

2.1.4.2 Rozpustnost lecitinu

Rozpustnost různých složek lecitinu v organických rozpouštědlech je určena primárně polární skupinou a závisí na složení mastných kyselin. Například rozpustnost fosfatidylcholinu v etanolu klesá s rostoucí délkou acylového řetězce. V acetonu jsou fosfolipidy většinou nerozpustné, ale ty s řetězcem kratším než deset uhlíků se v něm rozpouštějí. Fosfatidylcholin je rozpustný v etanolu a v hexanu, v acetonu nikoliv [5].

2.1.4.3 Izolace lecitinu

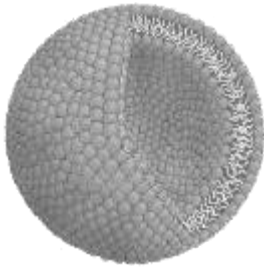
Lecitin je z vaječného žloutku extrahován během vícekrokového procesu. V počáteční extrakci je k 30 g čerstvého vaječného žloutku ve 200ml centrifugační baňce přidáno 100 ml 95% etanolu a směs je míchána, dokud nedojde k úplnému rozptýlení. Poté je směs centrifugována a supernatant obsahující vodu, polární a neutrální lipidy je přemístěn do dělicí nálevky. Z precipitátu jsou neutrální lipidy dvakrát extrahovány 50 ml hexanu. Extrakty v hexanu jsou poté přemístěny do stejné dělicí nálevky. Proteinový precipitát je dvakrát extrahován 50 ml 95% etanolu, aby byly odstraněny zbytky polárních lipidů. Tento etanolový extrakt je smíchán s prvním etanolovým a hexanovým v dělicí nálevce. Obsah dělicí nálevky je poté důkladně ale mírně promíchán a nechán ustálit, aby došlo k fázové separaci. Etanolová fáze je odstraněna a hexanová je smíchána s 50 ml 90% etanolu a ponechána, aby došlo k fázové separaci. Hexan je odstraněn na rotační odparce zanechávaje za sebou neutrální lipidy, které jsou stanoveny gravimetricky. Etanolová fáze je smíchána s předchozí etanolovou fází a rozpouštědlo je odpařeno. Zbylé polární lipidy jsou rozpuštěny v hexanu, je přidán aceton a směs je centrifugována v ledové vodní lázni. Supernatant je přemístěn a rozpouštědlo je odpařeno pomocí vakuové odparky. Tato frakce by neměla obsahovat neutrální lipidy ani cholesterol. Precipitát je přečištěný fosfatidylcholin [6].

2.2 Liposomy

Liposomy byly objeveny v roce 1961 A. D. Banghamem [7]. Ovšem první publikace byla vydána až v roce 1964, kde Bangham a Horne představili snímky multilamelárních fosfolipidových vezikul z elektronového mikroskopu [8].

Liposomy jsou sférické struktury tvořené zakřivenými lipidovými dvojrstvami, jež do svého vnitřního prostoru uzavírají část okolního rozpouštědla. Velikost liposomů se pohybuje od 20 nm do několika mikrometrů a mohou být složeny z jedné nebo několika soustředných membrán, každé s tloušťkou okolo 4 nm. Liposomy mají díky amfifilní povaze lipidů unikátní schopnosti, pročež jsou vhodné pro distribuci léčiv. Na Obr. 3 je schematicky znázorněna

struktura liposomu [9]. Lipidové dvojvrstvy jsou primární bariéry všech permeabilních buněčných membrán [10].



Obr. 3 Schematické znázornění liposomu [9]

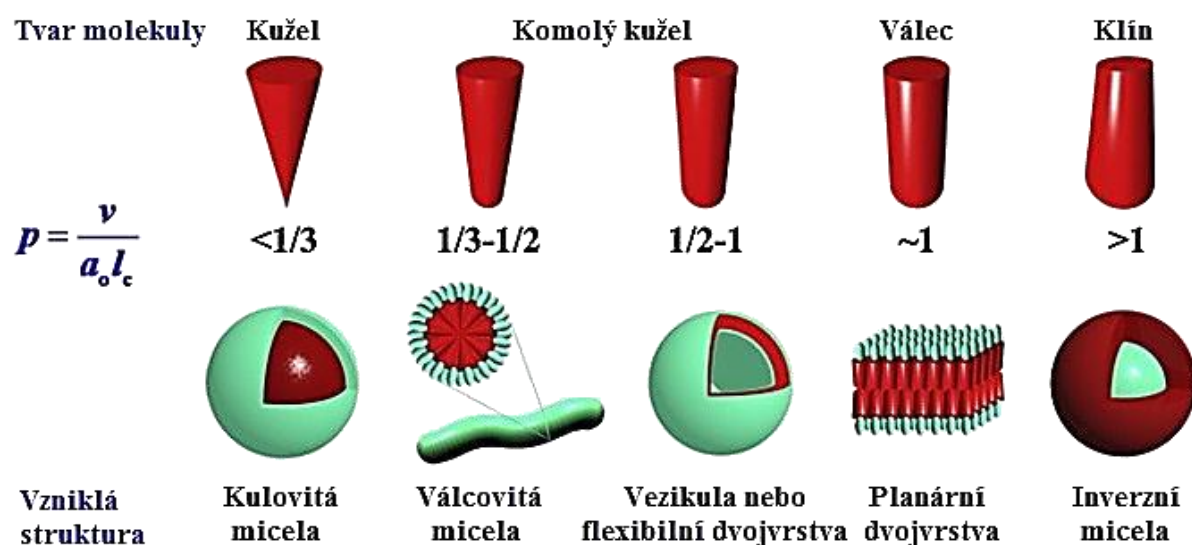
2.2.1 Agregace amfifilních molekul

Důvodem, proč amfifily spontánně agregují a tvoří různé mikrostruktury, je jejich upřednostňování dvojího druhu rozpouštědel. Všechny amfifily jsou složeny z části, která je rozpustná v nepolárním rozpouštědle a části rozpustné v rozpouštědle polárním. To znamená, že když je rozpouštědlo velmi nepolární nebo velmi polární (jako voda), je podporováno samoshlukování amfifilů. U většiny amfifilů je hydrofobní část tvořena uhlíkovými řetězci, zatímco hydrofobní část je tvořena tzv. polární hlavou.

Ve vodném roztoku se amfifily rozpouštějí na monomery, ale nad určitou koncentrací spontánně agregují, aby se minimalizovaly nevýhodné hydrofobní interakce. Toto shlukování je většinou doprovázeno nárůstem entropie systému. Vzrůstající entropie vychází z interakcí vody a uhlíku, které vytlačují molekuly vody do uspořádaných struktur okolo hydrofobních částí amfifilů v monomerní formě [9].

Ve vodném roztoku se lipidy seskupují ve dvojvrstvy, aby došlo ke snížení nepříznivých interakcí mezi uhlíkovými řetězci mastných kyselin a rozpouštědlem a bylo dosaženo stavu s nižší energií a vyšší stabilitou. Tento jev může být kvantitativně popsán pomocí kritické micelární koncentrace (CMC). CMC je definována jako koncentrace lipidu ve vodě, nad kterou molekuly formují micely nebo dvojvrstvy raději, než aby zůstaly v roztoku ve formě monomerů. CMC dipalmitoylfosfatidylcholinu a podobných amfifilů se pohybuje v řádu 10^{-10} M ve vodě. Tyto velmi nízké hodnoty indikují, že molekuly naprosto upřednostňují hydrofobní prostředí, které je uvnitř micely či dvojvrstvy [11]. Při vyšších koncentracích lipidů dochází ke změně charakteru agregátů v roztoku, tuto koncentraci nazýváme kritická agregační koncentrace (CAC).

2.2.2 Packing parametr



Obr. 4 Tvar molekuly amfifilu a vznikající struktura dle hodnoty Packing parametru [12]

Pojem molekulární „packing parametr“ je široce uplatňován v literatuře k vysvětlení, či dokonce předpovězení molekulového samoseskupení v roztoku amfifilů. Tanford [13] a Israelachvili [14] byli průkopníky při definování tohoto geometrického parametru, který je spojen s vlastností molekuly lipidu podle následující rovnice:

$$P = \frac{V}{a \cdot l} \quad (1)$$

kde V je objem hydrofobní části, v případě molekuly se dvěma řetězci je V rovno $2v$ a v je objem, který zaujímá jeden alkylový řetězec, l je maximální délka hydrofobního ocasu obsahujícího n atomů, a a je plocha polární hlavy lipidu. Vzorec může být aplikován nejen na čistý lipid, ale i na směs lipidů, kde je brán v úvahu i poměr lipidů ve směsi.

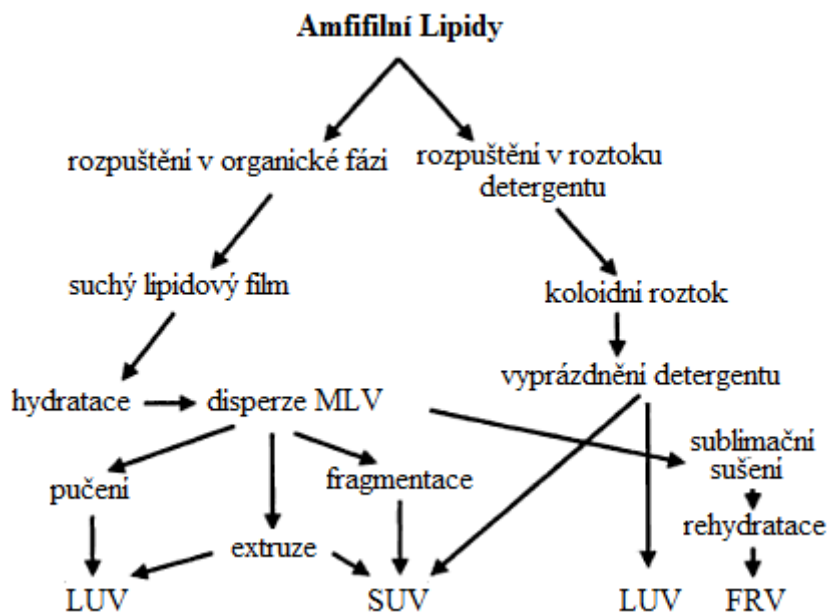
Bylo uvedeno, že hodnota P menší než jedna třetina odpovídá sférické micelle, větší než jedna třetina a zároveň menší než jedna polovina globulární micelle, váčku při hodnotě P mezi polovinou a jednou a při hodnotě blízké se jedné rovinné dvojrstvě [15]. Tvary molekul amfifilů a výsledných struktur jsou uvedeny na Obr. 4.

2.2.3 Lipidové dvojrstvy a lamelární fáze

Typický dvojrstvu tvořící lipid je složen ze dvou uhlíkových řetězců spojenými s polární skupinou, která může být nabitá (pozitivně či negativně), zwitterionická nebo neutrální. Tvar molekuly většiny lipidů se blíží válcovitému a podle konceptu „packing“ parametru preferují lipidy agregaci ve dvojrstvy. Při vyšší koncentraci lipidu tvoří tyto molekuly většinou lamelární fázi, kde se dvourozměrné rovinné lipidové vrstvy střídají s vrstvami vody [9].

2.2.4 Příprava liposomů

Různé typy liposomů (MLV – multilamellar large vesicles, SUV – small unilamellar vesicles, LUV – large unilamellar vesicles, FRV - freeze-drying rehydration vesicles) mohou být připraveny odlišnými metodami, což je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5 Obecná klasifikace různých metod přípravy liposomů, SUV – small unilamellar vesicles (malé unilamelární vezikuly), LUV – large unilamellar vesicles (rozsáhlé unilamelární vezikuly), MLV – multilamellar large vesicles (rozsáhlé multilamelární vezikuly), FRV – freeze-drying rehydration vesicles (sublimační rehydratované vezikuly) [16]

2.2.4.1 Ručně třepané vezikuly

Chceme-li připravit liposomy jakéhokoli druhu, molekuly lipidu musí být zavedeny do vodného prostředí.

Když je suchý lipidový film hydratován, lamely se zvětšují a rostou do myelinů (tenké lipidové trubičky), ale obecně platí, že se neoddělují od zbytku filmu. Jen mechanické rozrušení pomocí třesení, víření, pipetování, nebo vortexování způsobí rozrušení lipidových trubiček a uzavření exponovaných hydrofobních okrajů, čehož výsledkem je utvoření liposomů. Aby se připravily liposomy menší a méně lamelární, musí být do systému disipována energie.

V původním postupu je tenký lipidový film uložen na stěnách baňky s kulatým dnem a protřepán s nadbytkem vodné fáze.

Postup přípravy – lipid je rozpuštěn ve vhodném množství chloroformu (při rozpouštění nabitých lipidů se přidává metanol pro usnadnění či umožnění rozpouštění). Poté je rozpouštědlo odstraněno pomocí rotační odparky při teplotě vyšší, než je teplota fázového přechodu lipidu. Následuje hydratace suchého lipidu předehřátou vodnou fází a agitace suspenze protřepáváním, promícháváním či vortexováním. Takto připravené liposomy jsou převážně velké MLV (mléčná suspenze). Distribuce velikostí v této populaci vezikul je okolo několika mikrometrů.

Poznámky – nabité lipidy obecně tvoří menší a méně lamelární liposomy. Pokud není přídavek metanolu nutný, měli bychom se mu vyvarovat, protože metanol tvoří vodíkové vazby s polárními skupinami a pak je těžší jej odstranit [16].

2.2.4.2 Sonifikované vezikuly

Sonifikace různých vodných disperzí fosfolipidů je historicky první zpracování amfifilních lipidů. Díky lokálnímu zahřátí a vysoké vstupní energii nemusel být vzorek zahříván nad teplotu fázového přechodu.

Jsou dvě rozdílné techniky: buď je špička sonifikátoru ponořena do disperze liposomů nebo je vzorek ve zkumavce umístěn do sonifikátoru.

Sonifikace s ponořením do roztoku je pravděpodobně nejčastěji používaná metoda pro přípravu SUV v malém množství. Tato metoda je jednou s nejvyšší dodanou energií do lipidové disperze a může být aplikována na MLV.

Postup – vložení disperze MLV do kuželovité zkumavky, která je umístěna ve vodní lázni o teplotě 0 °C. Poté je do vzorku umístěn sonifikátor a za přístupu dusíku je spuštěn. Sonifikace probíhá do té doby, dokud se roztok nezmění z mléčného na opalescentní [16].

2.2.4.3 Sublimační rehydratované vezikuly

FRV jsou formovány z předem vytvořených vezikul. Může být dosaženo velmi vysoké efektivity enkapsulace. Sušení přivádí lipidové dvojvrstvy a materiál, který má být enkapsulován, do blízkého kontaktu.

Postup – je smícháno 1 ml koncentrovaných sonifikovaných liposomů a 1 ml radioaktivně značeného transferinu a směs je ponořena do chladicí lázně (suchý led v metanolu). Poté je baňka se vzorkem připojena k lyofilizéru, je aplikováno vakuum a voda je kompletně sublimována. Okamžitě po ukončení lyofilizace je lipidová vrstva rehydratována roztokem pufru (v malých dávkách – po 100 µl). Následuje extruze přes polykarbonátovou membránu. Neenkapsulovaný transferin je odstraněn kolonovou filtrací [16].

2.2.4.4 Odpaření z obrácené fáze

Touto metodou jsou připraveny liposomy s rozsáhlým vnitřním vodným prostorem. Tato metoda historicky poskytuje průlom v technologii liposomů, protože jako první umožňuje přípravu liposomů vyznačujících se vysokým poměrem vodná fáze/lipidy a umožňujících zachytit vysoké procento přítomné vodné fáze.

Postup přípravy je založen na formování obrácených micel – malé kapénky vody, které jsou v přítomnosti organického rozpouštědla stabilizovány fosfolipidovou vrstvou [16].

2.2.4.5 Vyprázdnění detergentu

Pro odstranění materiálu o nízké molekulové hmotnosti z liposomové disperze, který unikne enkapsulaci, stejně jako pro dokonalé a pomalé odstranění detergentu ze směsných micel detergent-lipid, které vedou ke tvorbě velice homogenních liposomů, je používána dialýza [16].

2.2.5 Liposomy v kosmetice

Liposomy jsou běžně používány v dermálních aplikacích jako ochranný systém pro aktivní látky a také díky jejich hydratačním účinkům. Do těchto vezikul mohou být inkorporovány jak hydrofilní, tak lipofilní aktivní látky. Mohou také penetrovat do kůže, nést aktivní látku na cílové místo a tam tyto molekuly uvolnit. Liposomy sloužící jako dermální nosiče by měly být malé velikosti, unilamelární a mít flexibilní membránu.

U řady aktivních látek (např. progesteronu či hydrokortizonu) byl pozorován nárůst rychlosti propustnosti kůže, když byly aplikovány v liposomální formě [17].

První kosmetický přípravek (Capture) obsahující liposomy byl uveden na trh v roce 1987 firmou Dior. Od té doby vstoupila na trh řada různých liposomálních výrobků zahrnující spreje, gely, krémy, emulze, pleťové krémy či šampóny [17].

Liposomy jsou obvykle přidávány do gelů i emulzí. Pokud jsou v emulzích, dochází k reakcím mezi liposomem a emulgátorem emulze, který má přirozeně také amfifilní charakter. Dochází tak k rozrušení struktury liposomu a můžeme předpokládat, že obvykle nabízené přípravky po zhruba 1 roce neobsahují už žádné liposomy. V gelech jsou sice liposomy stabilnější, ale gely jako takové mohou pokožku spíše vysušovat. K odbourávání liposomů dochází při oxidaci kyslíkem, hydrolýzou anebo dochází k seskupování liposomů do větších útvarů [18].

2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je uhlovodík, konkrétně mukopolysacharid, přirozeně se vyskytující ve všech živých organismech. Jeden řetězec může zahrnovat několik tisíc cukerných jednotek. Pokud není vázán k jiným molekulám, může vázat vodu, čímž vzniká tuhý viskózní systém podobající se želé. Unikátní viskoelastické vlastnosti HyA společně s jeho biokompatibilitou vedly k jeho využití v řadě klinických aplikací [19].

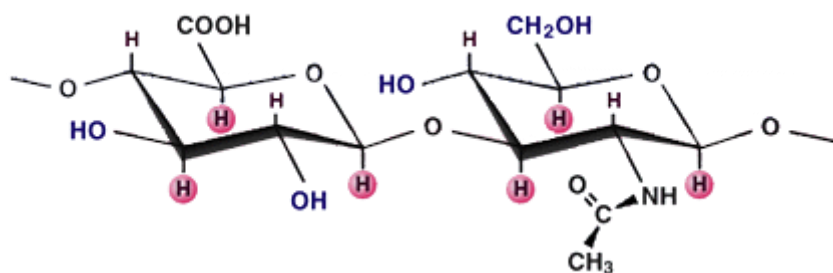
Volná kyselina je velmi hygroskopická, ale ne snadno rozpustná ve vodě. Její sůl je ve vodě rozpustná velmi, tvoří vysoce viskózní roztoky [20].

2.3.1 Historie

Izolace hyaluronanu byla poprvé popsána Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v roce 1934. Z očního sklivce dobytka získali polysacharidovou kyselinu o vysoké molekulové hmotnosti (s relativní molekulovou hmotností okolo 400). Jako její složka byla rozpoznána uronová kyselina a cukr s aminovou skupinou. Složením slov „hyaloid“ (skelný) a „uronová kyselina“ navrhli název hyaluronová kyselina [20].

2.3.2 Chemická struktura

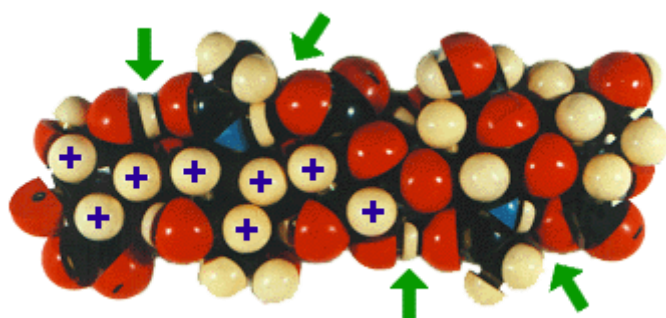
Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek. Tento disacharid se skládá z N-acetyl-d-glukosaminu a D-glukoronové kyseliny spojené β -1,4 glykosidickou vazbou. Disacharidy jsou propojeny vazbou β -1,3, čímž vzniká hyaluronový řetězec (Obr. 6) [21].



Obr. 6 Struktura kyseliny hyaluronové [22]

Obě cukerné jednotky jsou prostorově podobné glukose, která v beta konfiguraci umožňuje všem objemným skupinám (hydroxyly, karboxyláty či anomerní uhlíky na přilehlých cukerných jednotkách) zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální pozice, zatímco všechny malé vodíkové atomy obsazují méně výhodné axiální pozice (na Obr. 6 jsou znázorněny červeně). Proto je tato disacharidová struktura energeticky velmi stabilní [19].

V kyselině hyaluronové jsou přítomny velké shluky sousedících CH skupin, které tvoří tzv. „patches“ s velmi hydrofobním charakterem, jenž se opakuje v pravidelných intervalech střídavě na obou stranách molekuly (jejich znázornění je uvedeno na Obr. 7). Význam těchto „hydrophobic patches“, v rozpětí několika cukerných jednotek, hraje roli především při interakcích s membránami a hydrofobními proteiny [23].



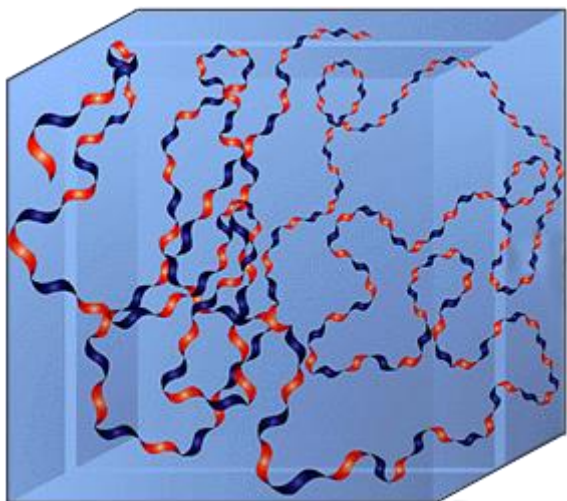
Obr. 7 Model oligosacharidu hyaluronanu. Vodíkové vazby mezi acetamidovou skupinou a glukuronovou kyselinou jsou označeny šipkami. Atomy vodíků označené křížem jsou součástí „hydrophobic patch“ sestávající se z 8 CH skupin. Hydroxymetylová skupina může být snadno pootočena, aby se skupina CH_2 mohla zúčastnit „hydrophobic patch“ [23] [24]

Na jednu disacharidovou skupinu připadá jedna karboxylová skupina, a proto je kyselina hyaluronová polyelektrolytem se záporným nábojem při neutrálním pH. Je zde téměř dokonalé opakování bez jakýchkoliv odchylek v této jednoduché disacharidové struktuře s možnou výjimkou občasné deacetylace glukosaminových zbytků [25].

2.3.3 Struktura v roztoku

Sekundární struktura je charakterizována intramolekulárními vodíkovými vazbami, které lze ve vodném roztoku stěží odlišit od vodíkových vazeb mezi molekulami vody. Terciální struktura hyaluronanu je velmi citlivá na jeho prostředí. Relativní tuhost glykosidické vazby a intramolekulární vodíkové vazby budou spíše omezovat volnou otáčivost a tím i konformační variabilitu. To však vlivem molekulárního prostředí vede k velké variabilitě terciální struktury [26].

Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní část, zatímco postranní skupiny v ekvatoriální poloze vytváří polární hydrofilní část, čímž vzniká struktura kroutícího se pásu. Roztoky hyaluronanu mají velmi neobvyklé reologické vlastnosti, jsou mimořádně lubrikační a velmi hydrofilní. Polymerní řetězec hyaluronanu přijímá v roztoku formu tzv. „random coil“, jež je znázorněna na Obr. 8. I při nízkých koncentracích hyaluronanu dochází k proplétání těchto řetězců [19].



Obr. 8 *Struktura hyaluronanu v roztoku [22]*

2.3.4 Výskyt a funkce

Hyaluronan se vyskytuje uvnitř a na povrchu buněk ale především v extracelulární hmotě mezi buňkami. Hyaluronan je v nízké koncentraci všudypřítomný, hyaluronan o vysoké koncentraci se vyskytuje při embryogenezi [25]. Je přítomen ve sklívci a oční komorové vodě, také v synoviální tekutině, kde jeho vysokomolekulární forma poskytuje lubrikaci kloubu a slouží jako tlumič nárazů, snižuje tření pohybujících se kostí a zmenšuje opotřebenání kloubu, v kůži, v níž může imobilizovat vodu ve tkáni a tím změnit kožní objem a stlačitelnost pokožky, a pupeční šňůře. Jeho role je v širším slova smyslu evidentně spíše lubrikační než strukturní [27].

U lidí a jiných obratlovců se největší množství hyaluronanu vyskytuje v extracelulární hmotě měkkých pojivových tkání [28]. Kromě obratlovců se hyaluronan nachází také u bakterií (např. u kmene streptokoků), ale není přítomen v houbách, rostlinách ani hmyzu. Zdaleka nejvyšší obsah hyaluronanu najdeme v kohoutích hřebíncích [29].

2.3.5 Metabolismus

Pro syntézu kyseliny hyaluronové je klíčový enzym HA-syntáza (HAS). Lidská HAS má 3 podtypy: HAS1, HAS2 a HAS3, což umožňuje enzymatickou syntézu HyA o různé molekulové hmotnosti a funkci [30].

K metabolismu hyaluronanu dochází prostřednictvím enzymatické hydrolýzy hyaluronidázou, která se vyskytuje v různých tkáních savců [31].

2.3.6 Izolace

Kyselina hyaluronová může být izolována z několika zdrojů, např. z bakteriálních, kohoutích hřebínců či pupeční šňůry. V závislosti na svém původu se kyselina hyaluronová může lišit v koncentraci (Tab. 1) [29], molekulové hmotnosti (Tab. 2) i přítomnosti nečistot [32].

Tab. 1. Koncentrace hyaluronanu v jednotlivých zdrojích [29]

Zdroj Hyaluronanu	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]
Kohoutí hřebínky	7500
Lidská pupeční šňůra	4100
Lidská synoviální tekutina	1400–3600
Hovězí nosní chrupavka	1200
Sklivec lidského oka	140–340
Lidská kůže (dermis)	200–500
Lidská pokožka (epidermis)	100
Mozek králíka	65
Srdeční svalstvo králíka	27
Lidská hrudní lymfa	0,2–50
Lidská moč	0,1–0,3
Lidská krev	0,01–0,1

Tab. 2. Molekulová hmotnost hyaluronanu v jednotlivých zdrojích [32]

Zdroj Hyaluronanu	Molekulová hmotnost [$\times 10^6 \text{ Da}$]
Kohoutí hřebínky	1,4
Lidská pupeční šňůra	$1,3 \pm 0,1$
Bakteriální	1,4–1,6
Hovězí sklivec	0,4

2.3.7 Využití

Hyaluronan je díky svým mukoadhezivním vlastnostem zkoumán jako možný nástroj pro cílenou distribuci léčiv. Byl využit jako cílený nosič léků na parenterálních (např. nitrožilní či podkožní podání) i neparenterálních (podání např. ústy či inhalací) trasách. Neparenterální aplikace zahrnují oční a nosní nosičové systémy, naopak parenterální systémy jsou důležité např. v případě trvalého uvolňování proteinových léčiv prostřednictvím subkutánních injekcí. Afinita hyaluronanu k receptorům CD44, který je nadměrně exprimován v různých nádorových buňkách, činí hyaluronan důležitým prostředkem pro cílenou aplikaci léčiv proti rakovině [33].

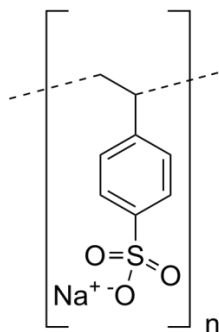
Hyaluronan může být využit jako „scaffold“ pro regeneraci chrupavkové tkáně. Protože ve tkáni chrupavky nejsou přítomny cévy, je její spontánní regenerace velmi obtížná, ale při použití „scaffoldu“ hyaluronanu například ve směsi s kolagenem může být tkáň chrupavky efektivně regenerována [34].

V kosmetických výrobcích je značně využíván díky schopnosti penetrovat kůži, unikátním hydratačním a viskoelastickým vlastnostem a vynikající biokompatibilitě. V důsledku toho jsou kosmetické výrobky obsahující hyaluronan označovány jako přípravky proti příznakům stárnutí, jako jsou vrásky. Mezi typické kosmetické přípravky obsahující hyaluronan patří séra, hydratační krémy, šampony, kondicionéry a koupelové oleje, nicméně hyaluronan může být podán také perorálně ve formě tobolek. Bylo dokázáno, že po aplikaci kosmetických výrobků obsahujících hyaluronan je kůže hydratovaná a zjemněná, také dochází k obnově elasticity a tím je dosaženo podstatného zjemnění vrásek. Kosmetické přípravky na bázi

kyseliny hyaluronové mohou být rovněž schopny chránit pokožku proti UV záření díky pohlcování volných radikálů [35].

2.4 Polystyrenulfonát sodný

Polystyrenulfonát sodný je záporně nabitý polymer, jenž bývá používán jako model flexibilního polyaniontu [36]. Je to typ polymeru založený na polystyrenu, konkrétně sodné soli polystyrenulfonové kyseliny, jeho struktura je uvedena na Obr. 9. Tento polyaniont je dobře rozpustný ve vodě a nerozpustný v nižších alkoholech. V pevném stavu má podobu bílého, nebo téměř bílého prášku.



Obr. 9 Struktura polystyrenulfonátu sodného

2.4.1 Příprava

Může být připraven polymerizací či kopolymerizací styrenulfonátu sodného nebo sulfonací polystyrenu. Tvrdé podmínky použité při této přípravě vedou k celé řadě vedlejších reakcí [37].

2.4.2 Využití

Polystyrenulfonát sodný se používá k léčbě vysoké hladiny draslíku v krvi, nazývané také hyperkalemie. Léčivo dostupné na lékařský předpis se nazývá Kionex [38]. Lék má krémovou až světle hnědou barvu a je drcený najemno. Prášková forma katexu polystyrenulfonátu sodného má in vitro výměnnou kapacitu přibližně 3,1 mM (in vivo přibližně 1 mM) draslíku na gram. Obsah sodíku je přibližně 100 mg (4,1 mM) v gramu léku. Lék může být podán orálně či ve formě klystýru [39].

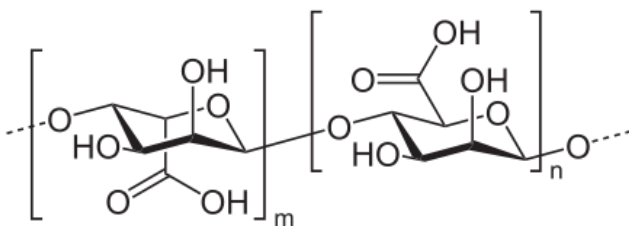
2.5 Alginát sodný

Poprvé byla popsána existence alginátu v roce 1881 britským chemikem E. C. C. Stanfordem v hnědých řasách jako sacharidu v těchto řasách nejhojnějším, tvořícím až 40 % suché hmoty. Mikrobiální alginát byl objeven o více než 80 let později Linkerem a Jonesem (1964) [40].

2.5.1 Struktura a vlastnosti

Alginát je polysacharid náležící do skupiny lineárních (nevětvených), neopakujících se kopolymerů, je složený z proměnlivého množství β -D-manurové kyseliny a jejího C5-epimeru α -L-glukoronové kyseliny (jejich sodných solí) spojených β -1,4 glykosidickou vazbou. Struktura kyseliny alginové je uvedena na Obr. 10 [41]. Poměr jednotek manurové a glukoronové kyseliny v alginátu např. z rodu *Macrocystis pyrifera* je okolo 1,6, kdežto

u *Laminaria hyperborea* okolo 0,45. Algináty mohou být připraveny v širokém rozsahu průměrných molekulových hmotností (50–100 000 jednotek) [42].



Obr. 10 Struktura kyseliny alginové

Ve vodě se alginát pomalu rozpouští za vzniku viskózního roztoku, v etanolu a éteru je nerozpustný [43].

2.5.2 Zdroje alginátu

Tradičně je komerčně dostupný alginát vyroben z hnědých mořských řas pěstovaných pro tyto účely, ale takto připravený alginát má díky změnám životního prostředí heterogenní složení i kvalitu. Dva bakteriální rody, *Pseudomonas* a *Azotobacter*, jsou také schopny produkovat alginát jako exopolysacharid. Tyto bakterie mohou poskytovat materiál k výrobě alginátu s definovaným monomerním složením a případně mohou prostřednictvím genetického a proteinového inženýrství umožnit přípravu bakteriálního alginátu „na míru“ [44].

2.5.3 Využití

Alginát je biomateriál vhodný například pro použití jako tkáňový „scaffold“ nebo pro distribuci léčiv. Průmyslové a lékařské aplikace alginátu jsou spojeny s jeho stabilizačními, viskózními a želírovacími vlastnostmi a jeho možností zadržovat vodu [45]. Používají se jako stabilizátory, zahušňovačla, želírovací látky či emulgátory [43].

2.6 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je metoda momentálně intenzivně využívaná např. v biotechnologii, lékařské diagnostice, sekvencování DNA či forenzní a genetické analýze. Fluorescenční detekce je vysoce citlivá [46].

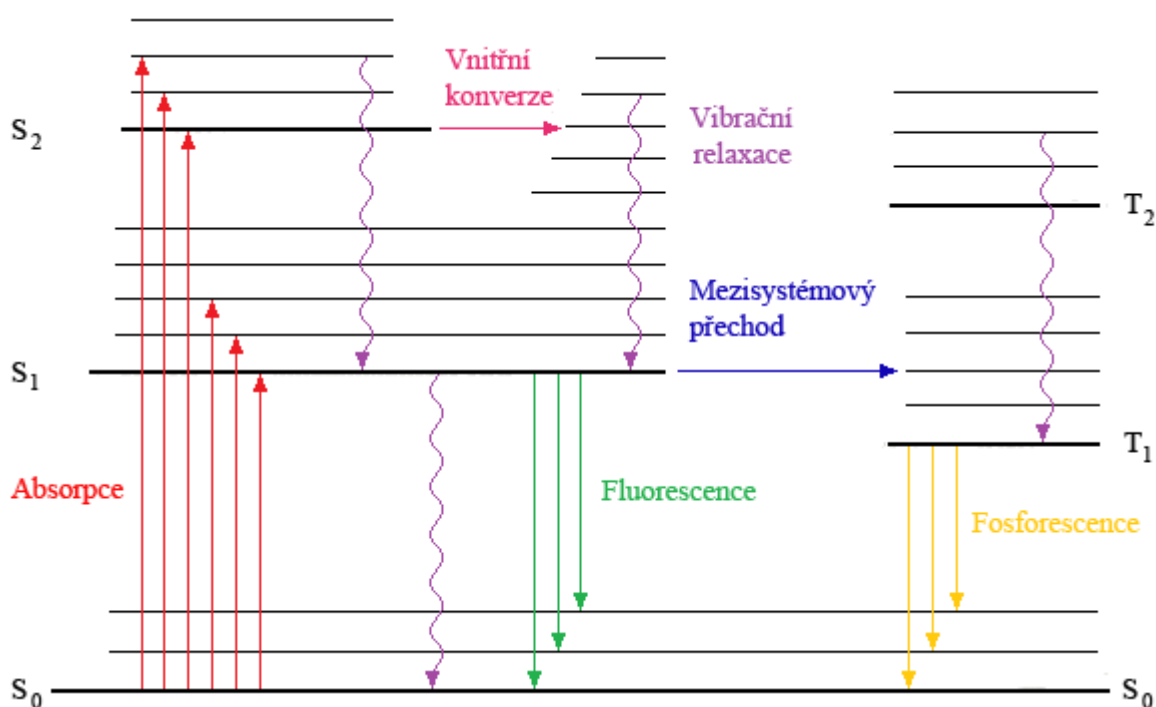
2.6.1 Jablůnskiho diagram

Jablůnskiho diagram (Obr. 11) slouží pro znázornění energetických přechodů, jako je absorpce fotonu, fluorescence, mezisystémový přechod, fosforescence či zpožděná fluorescence. Základní singletový stav je označen jako S_0 , excitované singletové stavy S_1 , S_2 , a tripletové stavy T_1 , T_2 , ... Ke každému z těchto elektronových stavů jsou přidruženy vibrační hladiny.

Protože většina molekul je při pokojové teplotě na nejnižší (0) vibrační energetické hladině stavu S_0 , dochází k absorpci fotonu právě molekulami v tomto stavu, čímž se molekuly dostávají do jedné z vibrační hladiny stavu S_1 nebo S_2 . K následné deexcitaci dochází jedním z následujících procesů:

- **Vnitřní konverze** – nezářivý isoenergetický přechod mezi dvěma elektronovými stavy se stejnou spinovou multiplicitou.

- **Vibrační relaxace** – energie excitovaného stavu je převedena na vibrační energii, která je následně disipována ve formě tepla.
- **Fluorescence** – emise fotonu doprovázející přechod $S_1 \rightarrow S_0$, je označována jako proces spontánní. Přechod 0–0 je obvykle pro absorpci a fluorescenci stejný. Nicméně fluorescenční spektrum je lokalizováno u vyšších vlnových délek (nižší energie) než spektrum absorpční, a to díky ztrátě energie při vibrační relaxaci. Podle Stokesova pravidla je vlnová délka fluorescenční emise vždy vyšší než vlnová délka absorpce. Ve většině případů však dochází k částečnému překryvu absorpčního a emisního spektra, protože zlomek světla je emitován v kratších vlnových délkách než absorbované světlo (protože část molekul je za normálních podmínek ve vyšších vibračních stavech než 0).
- **Mezisystémový přechod** – nezářivý isoenergetický přechod ze singletového stavu S_1 do stavu tripletového T_1 , který je zakázaný, protože je spojen se změnou multiplicity.
- **Fosforescence** – tento přechod z excitovaného tripletového stavu do stavu základního $T_1 \rightarrow S_0$, je zakázaný, proto převládá za normálních podmínek nezářivá deexcitace [47].



Obr. 11 Jablonskiho diagram

2.6.2 Fluorescence

Ke fluorescenci obvykle dochází z aromatických molekul. Jednou z typicky fluorescenčních látek (fluoroforů) je chinin, který je přítomen v toniku. Jestliže pozorujeme sklenici toniku, která je vystavena slunečnímu záření, je možné sledovat slabou modrou záři na povrchu. V každodenním životě se vyskytuje mnoho dalších fluoroforů. Zelená nebo červenooranžová záře pozorovatelná v nemrznoucích směsích je způsobena přítomností stopového množství fluoresceinu nebo rodaminu. Vícejaderné aromatické uhlovodíky jako antracen či perylen jsou také fluorescentní a emise z takovýchto druhů látek se využívá při monitorování ropného znečištění životního prostředí.

Fluorescenční spektrální data jsou obvykle prezentována jako emisní spektra [46]. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření, zatímco excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření [48].

2.6.3 Fluorescenční zákony

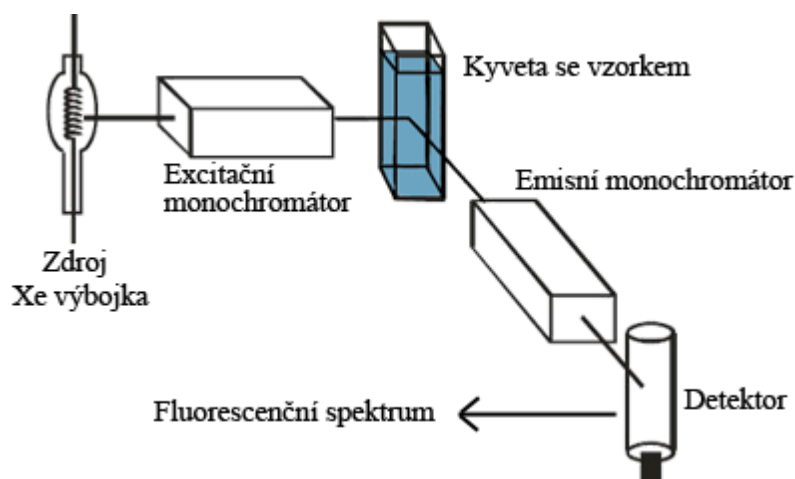
Fluorescence se řídí následujícími pravidly a zákony:

- Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla – **Stokesův zákon**.
- **Kashovo pravidlo** říká, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže ke fluorescenčnímu přechodu dochází z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 .
- Podle **Vavilova zákona** je kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávislý na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence – emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace [48].

2.6.4 Instrumentace

Každý fluorimetr obsahuje tři základní části: zdroj světla (xenonová nebo rtuťová výbojka), celu pro vzorek a detektor. Navíc, pro analytické využití, musí být volitelná vlnová délka dopadajícího záření a detektor signálu musí být schopen přesné manipulace. V jednoduchých fluorimetrech je vlnová délka excitačního i emisního záření vybrána pomocí filtrů, které umožní měření při pevně daných vlnových délkách. Jednoduché fluorescenční spektrometry mají prostředky pro analýzu spektrální distribuce světla emitovaného vzorkem, fluorescenční emisní spektrum může být získáno za použití plynulého interferenčního filtru nebo monochromátoru. Ve složitějších přístrojích je provedena selekce excitačního světla i analýza emise vzorku pomocí monochromátoru. Takové přístroje jsou schopny měřit rozdíly intenzit emisního záření při změně excitační vlnové délky, tedy fluorescenční excitační spektra.

Spektrofluorimetr bývá propojen s počítačem s vhodným softwarem pro vyhodnocení excitačních a emisních spekter. Uspořádání spektrofluorimetru bývá pravoúhlé, jak je znázorněno na Obr. 12 [49].



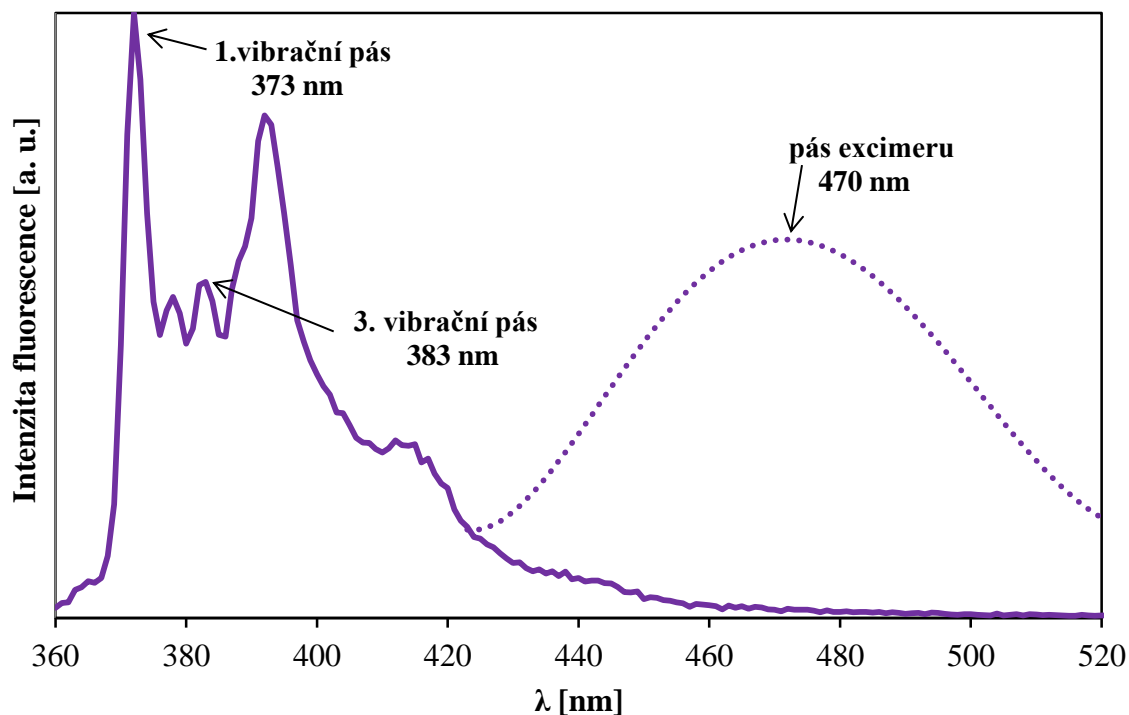
Obr. 12 Schéma spektrofluorimetru

2.6.5 Fluorescenční sondy

2.6.5.1 Pyren

Pyren je znám jako sonda pro studium hydrofobních oblastí, mimoto je velmi užitečná jeho citlivost na polaritu.

V aromatických molekulách s vysokým stupněm symetrie (benzen, trifenylen, naftalen, pyren) může být první singletová absorpce ($S_0 \rightarrow S_1$) zakázána z hlediska symetrie a odpovídající oscilace je slabá. Intenzity různých zakázaných vibračních pásů jsou vysoce citlivé na polaritu rozpouštědla (Hamův efekt). V polárním prostředí narůstá intenzita přechodu 0–0 na úkor ostatních. Relativní změny intenzit vibračních přechodů ve fluorescenčním spektru pyrenu mají původ v rozsahu vibračních překryvů slabě povolených prvních excitovaných stavů a silně povolených druhých excitovaných stavů. Hlavní roli hrají interakce dipól – indukovaný dipól mezi rozpouštědlem a pyrenem. Změny ve fluorescenčním spektru pyrenu v rozpouštědlech o různé polaritě naznačují, že změny polarity prostředí mohou být určeny měřením poměru intenzit fluorescence prvního (přechod 0–0) a třetího (přechod 0–2) vibračního pásu (Obr. 13) – je získán emisní polaritní index (EmPI) [47].



Obr. 13 Emisní spektrum pyrenu

V excitačním spektru pyrenu nalezneme obdobně podělením intenzit fluorescence při 492 nm s excitací při 333 nm a 338 nm excitační polaritní index (ExPI).

Pyren může tvořit komplexy sám se sebou. Při nízkých koncentracích je emise pyrenu vysoce strukturovaná. Při vyšších koncentracích přechází dosud neviditelná emise pyrenu z UV oblasti do oblasti viditelné, při vlnové délce 470 nm (Obr. 13), a to díky tvorbě excimeru. Excimer je zkratka pro dimer v excitovaném stavu [46].

Pyren se používá ke zkoumání míry pronikání vody do micel a k přesnému určení kritických micelárních koncentrací. Měřením EmPI v lipidových veziklech jsou získány informace o teplotě fázového přechodu a efektu přídavku cholesterolu [47].

2.6.5.2 DiA

DiA (4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-metylpyridinium jodid) patří do skupiny fluorescenčních sond s amfifilním charakterem používaných pro výzkum buněčných membrán. Tyto sondy jsou používány ke značení buněk, organel, liposomů, virů, lipoproteinů v celé řadě dlouhotrvajících sledování – buněčné transplantaci, migraci, adhezi či fúzi.

DiA je díky rychlé difúzi vhodná sonda ke značení buněk. Může být excitována mezi 400 a 500 nm a maximum emise ve veziklech DOPC má okolo 590 nm [50].

2.6.5.3 Perylen

Patří do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků. Je složený ze dvou naftalenových jednotek spojených dvěma jednoduchými vazbami [51]. Používá se jako fluorescenční sonda pro studium lipidů v cytochemii membrán. Vyskytuje se především mezi produkty nedokonalého spalování (např. v cigaretovém kouři či výfukových plynech motorů) [52]. Absorpční maximum absorpce se nachází při vlnové délce 336 nm a maximum emise okolo 440 nm [53].

2.7 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), někdy označován jako kvazielastický rozptyl světla (QELS), je neinvazivní, dobře zavedená technika pro měření velikosti a distribuce velikosti molekul a částic zpravidla v submikronových rozměrech, u nejnovějších technologií nižších než 1 nm.

Mezi hlavní aplikace dynamického rozptylu světla patří charakterizace částic, emulzí nebo molekul, které jsou rozptýlené nebo rozpuštěné v kapalině [54]. DLS měří Brownův pohyb a vztahuje jej k velikosti částic. Brownův pohyb je nahodilý pohyb částic v důsledku bombardování okolními molekulami rozpouštědla. Se zvyšující se velikostí částic dochází ke zpomalování Brownova pohybu [55].

2.7.1 Velikost

Velikost částic je vypočítána z translačního difúzního koeficientu za použití Einstein-Stokesova vztahu:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad (2)$$

$d(H)$ je hydrodynamický průměr, D je translační difúzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je teplota a η je viskozita.

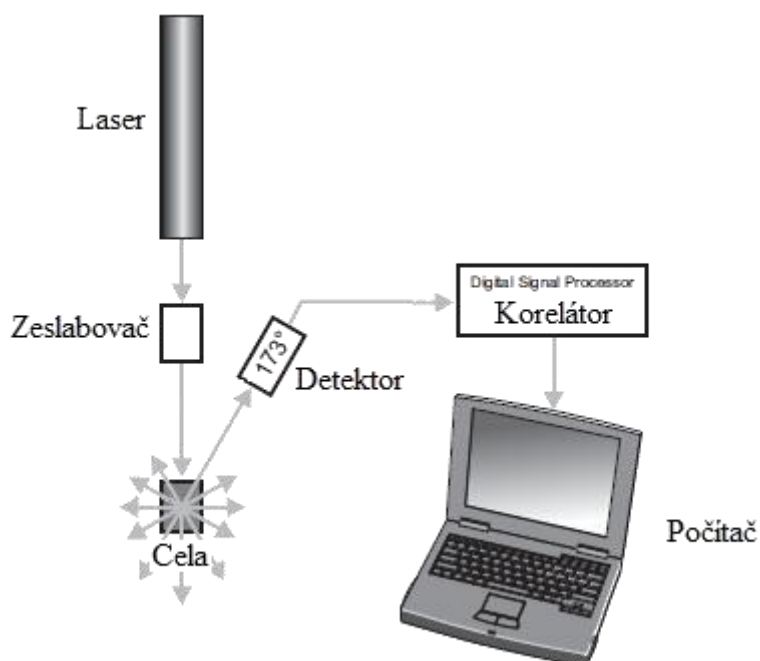
Průměr, který je naměřen metodou DLS, je hodnota, která se vztahuje k tomu, jak částice difunduje uvnitř tekutiny, proto je označován jako hydrodynamický průměr. Průměr částic získaný tímto měřením je průměr koule, která má stejný translační difúzní koeficient jako daná částice [55].

2.7.1.1 Instrumentace – měření velikosti

Typický systém DLS se skládá ze šesti hlavních komponent, schéma přístroje je zobrazeno na Obr. 14. Především se používá laser pro zajištění zdroje světla pro osvětlení částic vzorku uvnitř cely. Většina laserových paprsků prochází přímo skrz vzorek, ale některé jsou rozptýlené částicemi ve vzorku. Detektor se používá pro měření intenzity rozptýleného světla. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, proto je (teoreticky) možné umístit detektor do libovolné polohy a stále bude detekovat rozptyl.

Intenzita rozptýleného světla musí být uvnitř určitého rozsahu, aby ji detektor mohl úspěšně změřit. Pro snížení intenzity laseru se používá „zeslabovač“ (attenuator), tím se sníží i intenzita rozptylu. Zetasizer během posloupnosti měření automaticky stanoví příslušnou polohu zeslabovače.

Signál intenzity rozptylu pro detektor projde na desku digitálního zpracování signálu, nazvanou korelátor. Ten srovnává intenzitu rozptylu v po sobě jdoucích časových intervalech, aby odvodil rychlost, se kterou se mění intenzita. Tato informace korelátoru pak přejde do počítače, kde speciální software Zetasizeru bude analyzovat data a odvodí informace o velikosti [56].



Obr. 14 Schéma zařízení pro měření velikosti [57]

Velikost částic je získána z korelační funkce za použití několika algoritmů. Mohou být použity dva přístupy. V jednom z nich je korelační funkce fitována monoexponenciální funkcí, tím je získána střední velikost a je odhadnuta šířka distribuce (index polydisperzity). Tento přístup se nazývá kumulativní analýza. Druhou možností je fitovat korelační funkci vícenásobnou exponenciální funkcí, čímž je získána distribuce velikosti částic.

Distribuce velikosti částic je závislost relativní intenzity rozptýleného světla částicemi na velikosti částic, proto je nazývána intenzitní distribucí velikostí. Za použití optických parametrů může být vypočítána distribuce velikostí objemová či početní.

Přístroj detekuje intenzitu rozptýleného světla pod úhlem 173° , což je známo jako detekce zpětného rozptylu. Navíc optika není v kontaktu se vzorkem, proto se říká, že je detekční optika neinvazivní. Použití neinvazivní zpětné detekce má několik výhod:

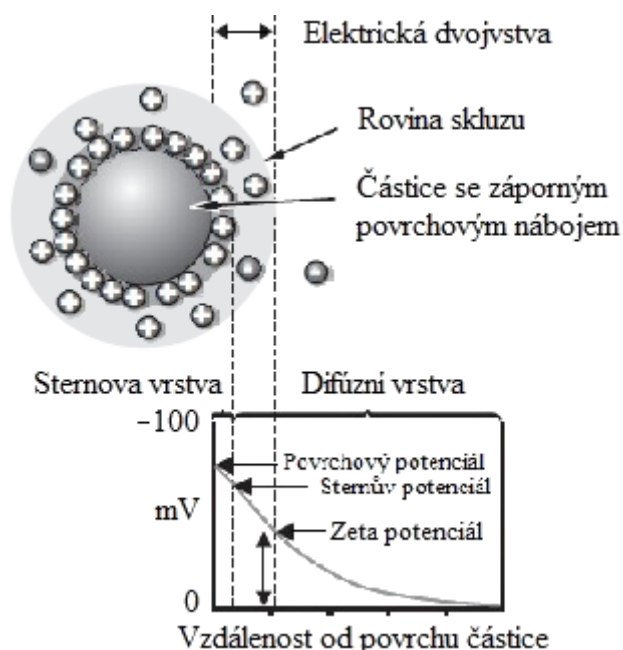
- Paprsek nemusí putovat celým vzorkem, což redukuje mnohonásobný rozptyl, při kterém je světlo rozptýlené na jedné částici dále rozptýleno částicí jinou. Navíc, když světlo prochází kratší optickou dráhou, je možné měřit vzorky o vyšší koncentraci.
- Nečistoty, např. prachové částice v rozpouštědle, jsou obvykle větší ve srovnání s velikostmi částic ve vzorku. Větší částice rozptylují především ve směru přímém, proto je při použití zpětného rozptylu vliv nečistot značně redukován [55].

2.7.2 Zeta potenciál a elektrická dvojrstva

Zeta potenciál je funkcí povrchového náboje, který vzniká v případě, že je jakýkoliv materiál umístěn v kapalině. Je velmi dobrým indexem rozsahu elektrostatických odpudivých interakcí mezi částicemi. Zeta potenciál se běžně používá k předpovězení a kontrole disperzní stability [58]. Aby systém zůstal v disperzním stavu, je obvykle nutné udržovat zeta potenciál nad 25 mV (pozitivní nebo negativní). Obecně řečeno, čím bude vyšší absolutní hodnota zeta potenciálu, tím více stabilní systém bude [59].

Utvoření síťového náboje na povrchu částice ovlivňuje distribuci iontů v okolí mezifázové oblasti, což vede ke zvýšení koncentrace opačných iontů (iontů s opačným nábojem než má částice) v těsné blízkosti povrchu. Proto elektrická dvojrstva existuje kolem každé částice.

Existují dvě části vrstvy kapaliny obklopující částici: oblast vnitřní, zvaná Sternova, ve které jsou ionty vázány silně, a vnější (difúzní) oblast, ve které jsou ionty vázány méně pevně, jak je znázorněno na Obr. 15. Uvnitř difúzní vrstvy je teoretická hranice, uvnitř které tvoří ionty a částice stabilní subjekty. Když se částice pohybuje (např. díky gravitaci), ionty uvnitř této hranice se pohybují s částicí, ale všechny ionty za touto hranicí s částicí neputují. Tuto hranici nazýváme povrch hydrodynamického smyku nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici je znám jako potenciál zeta [57].



Obr. 15 Částice s elektrickou dvojrstvou [57]

Pokud je odpor mezi částicemi dostatečně velký, aby se od sebe odrazily, budou částice udržovány ve stavu disperze. Pokud odpudivá síla nebude dost silná, budou se částice shlukovat a mohou zůstat trvale jako dublety. Poté mohou přijít další částice a být také zachyceny v rostoucím agregátu. Suspenze je pak nestabilní [59].

2.7.2.1 Instrumentace – zeta potenciál

Systém pro měření potenciálu zeta zahrnuje šest hlavních komponent, jež jsou znázorněny na Obr. 16. Jako světelný zdroj pro osvětlení částic ve vzorku se používá laser. Pro měření potenciálu zeta je tento zdroj světla rozdělený, aby poskytoval dopadající a referenční paprsek. Referenční paprsek je také „modulovaný“, aby se zajistil nezbytný dopplerův efekt. Laserový paprsek prochází středem kyvety se vzorkem, a detekuje se rozptýl v úhlu 17° .

Když je na kyvetu aplikováno elektrické pole, všechny částice pohybující se v měřeném objemu způsobí, že detekovaná intenzita světla kolísá s frekvencí úměrnou rychlosti částic. Detektor odešle tuto informaci na digitální procesor signálu. Tato informace pak přejde do počítače, kde software Zetasizer Nano vytvoří frekvenční spektrum, ze kterého se vypočítá elektroforetická pohyblivost, a tudíž i potenciál zeta.

Intenzita rozptýleného světla v kyvetě musí být uvnitř specifického rozsahu, aby ji detektor úspěšně změřil. Je-li detekováno příliš mnoho světla, stane se detektor přetížený. Aby se tomu předešlo, používá se pro snížení intenzity laseru (a tím i snížení intenzity rozptylu) zeslabovač. Pro korekci jakýchkoliv rozdílů mezi tloušťkou stěny kyvety a lomem světla dispergovadla je v dráze rozptylovaného paprsku nainstalovaná kompenzační optika, aby udržovala seřízení rozptylovaného paprsku [56].



Obr. 16 Schéma zařízení pro měření zeta potenciálu [57]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Záměrem výzkumu **Forseye a kol.** bylo na modelu poškozené lidské chrupavky určit schopnost HyA, DPPC a směsi HyA a DPPC snížit počáteční tření, protože k nejvyššímu tření dochází na začátku pohybu následujícím po dlouhodobém zatížení. Navíc byl za použití fluorescenčně značené HyA zkoumán rozsah pronikání HyA do tkáně chrupavky.

Bylo zjištěno, že aplikace HyA a DPPC na poškozenou lidskou chrupavku má za následek zlepšení lubrikace mezi povrchy chrupavky. Účinnost HyA nebyla závislá na její koncentraci, nicméně na lubrikační schopnosti DPPC koncentrace vliv měla. Dále kombinace DPPC a HyA zvyšuje schopnost lubrikovat.

Fluorescenčně značená HyA zformovala obal přes povrch chrupavky a v průběhu času její část pronikala do vrstev chrupavky a specificky se zaměřila na chondrocyty v povrchových a středních zónách. Tato penetrace dosahovala až 300 μm pod povrch chrupavky. Způsob cílení a role, kterou HyA má, není známá, ačkoli je zde návrh o přímé interakci s chondrocyty přes receptor CD44 pro podporu syntézy nových molekul HyA [60].

Crescenzi a kol. studoval interakce vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA) s dipalmitoylfosfatidylcholinem (DPPC) ve fosfátovém pufru. Směs HyA a DPPC je zjednodušený model synoviální tekutiny, který umožňuje analyzovat obě složky zvlášť a tím pochopit funkci každé z nich.

Systém studovali z makroskopického (reologie) a mikroskopického (pomocí elektronové mikroskopie) měřítka. Zjistili, že každá ze složek je stabilní až pět dní. Naopak při smíchání komponent a inkubaci 72 hodin bylo ve struktuře pozorováno dramatické přeskupování obou komponent. Při inkubaci DPPC od 6 do 72 hodin měly vezikuly tendenci agregovat a slučovat se ve větší, děravé a překrývající se membrány propojené nebo uzamčené v zákrutech HyA. V případě blanku, tedy systému HyA neobsahující, jsou vezikuly i po několika dnech inkubace neporušené, což dokazuje, že inkubace sama o sobě nezpůsobuje vznik nových struktur. Dále bylo z výsledků reologických měření zjištěno, že přítomnost liposomů u HyA způsobuje náhlý pokles viskozity, a to v rozsahu jednoho řádu u vzorku obsahujícího 1 % DPPC. Tento výsledek je možné vysvětlit tím, že membrány DPPC se váží na hyaluronan, přičemž vazby se účastní tzv. „hydrophobic patches“ podél řetězce, což způsobuje kolaps řetězce HyA, který je v nataženém stavu zodpovědný za vysokou viskozitu [61].

Quemeneur a spol. se kromě jiného zaměřili i na interakce liposomů s hyaluronanem a alkylovaným hyaluronanem. Elektrostatickým spojením polyelektrolytů a lipidových dvojvrstev vznikne materiál se specifickými vlastnostmi a zvýšenou stabilitou použitelný v různých zařízeních jako chemických senzorech či nosičích léčiv. Hyaluronan byl vybrán díky své vynikající biokompatibilitě.

Interakce liposomů s makromolekulami je důležitá pro simulaci interakcí intercelulárních, polymer-buňka a liposom-buňka.

Vliv hustoty náboje hyaluronanu na adsorpci membrán LUV byl studován při dvou různých hodnotách pH (3,5 a 6). Při pH 6 je hyaluronan vysoce negativně nabitý (90 % karboxylových skupin je ionizovaných, zatímco při pH 3,5 je hustota náboje hyaluronanu nízká (25 % karboxylových skupin je ionizovaných).

Zjistili, že při jakémkoli počátečním pH (3,5 nebo 6) a síťovém náboji liposomu může negativně nabitý polyelektrolyt (nemodifikovaný nebo alkylovaný hyaluronan) adsorbovat a tím vznikají negativně nabitě složené vezikuly [62].

Mulligan, Jakubek a Johnston připravili lipidové dvojvrstvy na polymerní podložce. Takovéto vrstvy jsou používány jako modely pro pochopení funkce buněčných membrán a jako platforma pro výzkum membránových proteinů.

Multivrstva polyelektrolytu je utvořena střídavou adsorpcí pozitivně a negativně nabitého polyelektrolytu. Zde byla biokompatibilní polymerní podložka připravena z chitosanu a hyaluronanu (hyaluronan tvořil vrchní vrstvu) metodou vrstva na vrstvu na křemenném substrátu.

Dvojvrstva lipidů byla na polymerní podložku nanášena tak, že vezikuly DOPC byly ve vodě inkubovány na tuto podložku při pH 6,5, popř. 4. Pro studium kvality utvořených lipidových dvojvrstev byla využita fluorescenční mikroskopie, AFM (atomic force microscopy) a FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Bylo zjištěno, že inkubace vezikul DOPC při pH 6,5 poskytuje díky velkému počtu defektů dvojvrstvu adsorbovanou na povrchu s velkým podílem nehybných lipidů. Dále zjistili, že pro formování povrchu z vezikul DOPC musí mít polymerní povrch optimální hustotu náboje. Při pH 4 byly získány dvojvrstvy pohyblivých lipidů. Formování těchto dvojvrstev ze zwitterionických lipidů je v rozporu s jejich předchozími studiemi, podle nich je pro formování pohyblivých dvojvrstev nutné použít směs nabitého a zwitterionického lipidu [63].

Gzyl-Malcher a spol. studovali interakce jednoduchých vrstev tvořených dvěma druhy lipidů, zwitterionu DPPC a pozitivně nabitého DPTAP, s fytohormony IAA a selenanovými ionty ve vodné subfázi. Za tímto účelem byly naměřeny izotermy povrchového napětí v závislosti na průměrném obsahu (ploše) molekuly. Utváření domén bylo studováno za použití Brewsterovy úhlové mikroskopie (BAM). Metoda GIXD (metoda plochého dopadu RTG záření) byla použita pro charakterizaci uspořádání lipidových molekul kondenzovaných jednoduchých vrstev.

Směs DPTAP a DPPC byla použita pro napodobení membránových domén s rozdílnými elektrickými náboji.

Výsledky měření izoterem závislosti povrchového napětí na průměrném povrchu molekuly a rozptylu RTG záření ukazují výrazný zhušťující efekt u jednoduchých vrstev složených z binární směsi DPPC/DPTAP než z pouhého DPPC či DPTAP. Tento efekt může souviset s reorientací dipólu P^-N^+ polárních hlav DPPC z paralelní (u membrány jen z DPPC) na více vertikální orientaci s ohledem na fázové rozhraní při přidání pozitivně nabitého DPTAP. Menší polární hlavy DPTAP mohou být vsunuty mezi negativní fosfátové skupiny DPPC, což způsobuje (usnadňuje) reorientaci. Na druhou stranu, molekuly DPPC mohou odstínit odpudivé interakce mezi pozitivně nabitými hlavami DPTAP. Selenanové ionty přispívají k neutralizaci povrchového náboje v subfázi ke zhuštění jednoduchých vrstev [64].

Junglas a kol. studovali pomocí deuteriové NMR a mikrokolorimetrie uspořádání molekul a laterální difúze v tekutých kationických dvojvrstvách tvořených deuterovanými řetězci DPTAP v přítomnosti soli. V porovnání s zwitterionickým deuterovaným DPPC, profil parametrů molekulového uspořádání palmitových řetězců DPTAP vykazují vyšší uspořádání molekul směrem k rozhraní dvojvrstvy, ačkoli byly získané podobné hodnoty v blízkosti

středu dvojvrstvy. Koeficient laterální difúze je v případě DPTAP nepatrně nižší než u DPPC (při 60 °C). Vzájemná iontová síla způsobuje další pokles difúzního koeficientu. Výsledky naznačují, že dvojvrstvy DPTAP se navzdory kladnému náboji vyznačují těsným uspořádáním molekul a tím dochází ke snížení laterální difuzivity.

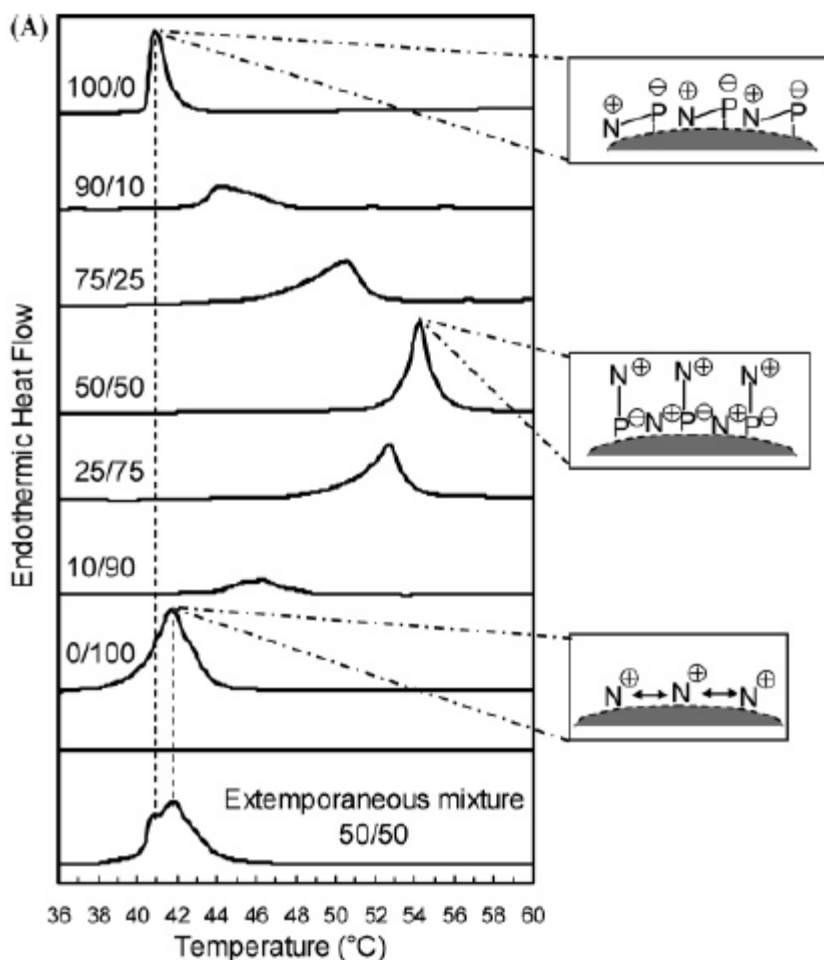
Dvojvrstvy DPTAP jsou o mnoho více uspořádány než dvojvrstvy DPPC. Oblast blízko polární hlavy vykazuje o mnoho vyšší hodnoty parametru uspořádání, což indikuje snížení pohyblivosti tohoto segmentu řetězce. V blízkosti centra dvojvrstvy (uvnitř) vykazují DPPC i DPTAP stejné hodnoty parametru uspořádání. Pokles uspořádání s nárůstem pozice na řetězci je strmější u kationického lipidu (DPTAP). To může naznačovat, že pozitivně nabitá hlava DPTAP má značný vliv na molekulové uspořádání dvojvrstvy. Nicméně přidavek soli (0,15 M) neovlivnil profil parametru uspořádání. To vede k závěru, že ne náboj, ale sterické důvody vyplývající ze struktury polární hlavy mohou mít za následek prudký pokles molekulového uspořádání. Ve skutečnosti hlava DPTAP zaplňuje prostor výrazně méně než fosfocholinová skupina DPPC, což vede k těsnějšímu uspořádání a může objasnit rozdíl v profilech parametru uspořádání [2].

Troutier a kolektiv studovali absorpci lipidů na kulovitých polymerech. Jako polymer vybrali negativně nabitě polystyrenové částice, z lipidů byl vybrán zwiterionický DPPC a kationický DPTAP. Podle teoretického výpočtu „packing“ parametru se bez ohledu na poměr DPPC/DPTAP tyto dva lipidy ve vodě seskupují a tvoří vezikuly. Výzkum fázového přechodu těchto DPPC/DPTAP vezikul odhalil zvláštní termotropické chování, obzvláště při ekvimolárním složení, kde docházelo k silným interakcím mezi DPPC a DPTAP.

Byly získány DSC termogramy různých suspenzí vezikul DPPC/DPTAP ve vodě (jsou znázorněny na Obr. 17). Jak bylo očekáváno pro čistý lipid (DPPC), závislost tepelného toku na teplotě vykazuje úzký entalpický přechod. Teplota tepelného přechodu byla nalezena při 41 °C, což souhlasí s hodnotou v literatuře (41,5 °C ve vodě). Na druhou stranu, pík pro čistý DPTAP byl široký, jedno vysvětlení může být, že se DPTAP i přes vysokou koncentraci (30 mM) seskupuje nejen do multilamelárních struktur, ale i do jednodamelárních, což by komplikovalo detekci teploty fázového přechodu. Skutečně, úzké píky byly získány pro multilamelární vezikuly, zatímco jednodamelární vezikuly poskytují přechody širší. V důsledku elektrostatického odpuzování kationických polárních hlav ve vodě může být překrývání dvojvrstev DPTAP komplikovanější. To může souviset se samovolným formováním malých vezikul DPTAP. Přidavek 10 nebo 25 molárních procent DPTAP k DPPC vedl k širším píků posunutým k vyšším teplotám. Nejvyšší teplota byla získána při poměru DPPC/DPTAP 50/50 a v tomto případě byl pík zvlášť úzký. Navíc je pozoruhodné, že tento pík odpovídá poměru DPPC/DPTAP 50/50 uvnitř lipidových struktur, zatímco nepřipravená ekvimolární směs suspenzí čistých lipidů nevede k úzkému píku při 54,2 °C. Tato směs představuje spíše překryv píků čistých lipidů (tedy bez interakcí mezi oběma suspenzemi lipidů). S nárůstem podílu DPTAP ve struktuře jsou píky opět širší a lokalizované při nižších teplotách než v případě ekvimolární směsi (ale vyšší než u čistého DPTAP).

Křivky DSC zobrazují dva znatelné znaky: (i) teplota tepelného přechodu směsi DPPC/DPTAP je vždy vyšší než u čistých složek a (ii) ostrost fázového přechodu ekvimolární směsi je stejná jako u čistého lipidu. Takové chování odráží specifické jevy v molekulovém uspořádání, související interakce mezi lipidy dle poměru DPPC/DPTAP. Navíc výška teploty přechodu pro směs naznačuje, že energie potřebná k přechodu z gelového stavu (kde jsou acylové řetězce molekuly lipidu úzké a pevně uspořádány, a interagují) do stavu fluidního

(kde jsou acylové řetězce neorganizované) je vyšší než ta pro čisté složky. Když jsou uhlovodíkové řetězce obou lipidů identické jako v tomto případě (C 16:0), závisí termotropické chování směsi jen na interakcích mezi polárními hlavami: (i) zwitterionová skupina obsahující fosfát a kvartérní amoniovou skupinu a (ii) kvartérní amoniová skupina DPTAP. Tudiž výklad (ilustrovaný na Obr. 17) a vysvětlení tohoto zvláštního termotropického chování směsi s ohledem na čistý DPPC a DPTAP je založeno na organizaci lipidových hlav. V případě shlukování DPPC jsou dipóly P-N zhruba paralelní k rovině dvojvrstvy, což optimalizuje interakce mezi oběma nabitými skupinami. Poté při vzrůstajícím podílu kationického lipidu jsou cholinové dipóly pozitivními náboji podvrstvy postupně vytlačovány do vodného prostředí, jak bylo uvedeno pro směs DPPC/kationický amfifil. Tato reorientace upřednostňuje elektrostatické přitahování kationických amoniových skupin DPTAP a přilehlých anionických fosfátových skupin DPPC. Nejvýhodnější konfigurace nastane při stechiometrickém složení 1:1 (s dokonalým střídáním DPPC/DPTAP, protože molekuly DPTAP upřednostňují interakce s DPPC než samy se sebou), což vysvětluje ostrost fázového přechodu této směsi podobající se čistému lipidu. Navíc toto silné elektrostatické přitahování mezi oběma lipidy přináší těsnější uspořádání a tedy kompaktnější organizaci DPTAP a DPPC ve vrstvách [15].



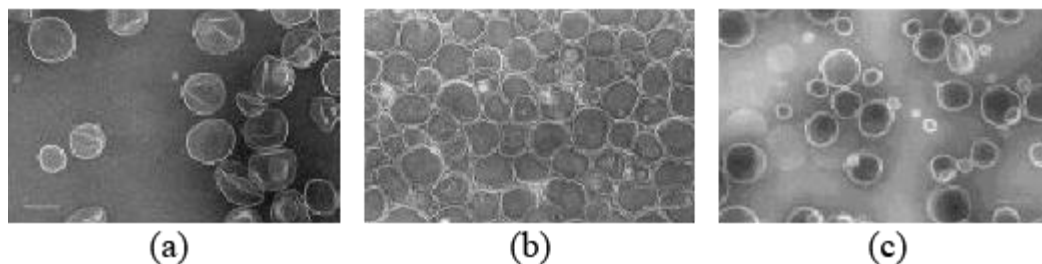
Obr. 17 DSC termogramy jednotlivých lipidů a jejich směsí [15]. Endothermic heat flow – endotermní tepelný tok, extemporaneous mixture – předem nepřipravená směs

Oba důsledky této reorientace lipidů (elektrostatická přitahování a kompaktnost) objasňují vysokou energii nutnou k dosažení fázového přechodu tohoto systému. A konečně, postupně

snížení množství zwitterionického lipidu v kationickém složení zvyšuje Coulombické odpuzování mezi sousedními kationickými hlavami. Proto se nabitě amfifily navzájem více a více odpuzují a v důsledku toho se zvyšuje plocha, již každá polární hlava zaujímá [15].

Liu a O'Brien připravili zesítené supramolekulární sestavy lipidů a demonstrovali jejich robustnost na odolnosti vůči lyofilizaci a následném rozptýlení ve vodě. Zesítené lipidové struktury byly připraveny polymerizací dvoufunkčních lipidů. Vzniklé liposomy porovnávali s původními pomocí kvazielastického rozptylu světla a transmisní elektronové mikroskopie (některé termogramy jsou znázorněny na Obr. 18). Naměřili velikosti liposomů vždy okolo 120 nm – před lyofilizací, po ní, i po přidavku Tritonu X-100.

Současný vývoj v porozumění síťové polymerizace lipidových dvojvrstev přináší zajímavou možnost, že zesítené liposomy mohou být považovány za nanometrové kulovité objekty. V tomto případě by mělo být možné připravit zesítené polymerní liposomy ve vodě, poté odstranit podpurnou vodu aniž by došlo k narušení polymerního pláště. Tento článek dokazuje, že zesítené liposomy nejsou po úplném vysušení rozrušeny a mohou být znovu rozptýleny ve vodě bez patrné změny v mikrostruktuře. Tyto prázdné polymerní nanostruktury odvozené z liposomů byly díky pevnosti a flexibilitě nazvány „nanoballoons“ [65].



Obr. 18 *Transmisní elektronové mikrografy liposomů připravených z heterobifunkčních lipidů, Acryl/DenPC (a) před polymerizací, (b) po polymerizaci a přidavku TX-100, (c) po polymerizaci, suchém sušení a rehydrataci [65]*

Regelin a kol. studovali biofyzikální parametry a transfekční vlastnosti DOTAP a jeho analogů s různými uhlíkovými řetězci, nesoucími jeden kladný náboj. Byla určena stabilita, velikost a fluidita liposomů a lipoplexů. Analogy DOTAP (včetně DPTAP) byly použity buď samostatně nebo v kombinaci s pomocným lipidem, DOPE či cholesterolem. Přídavek DOPE či cholesterolu zlepšuje stabilitu liposomů.

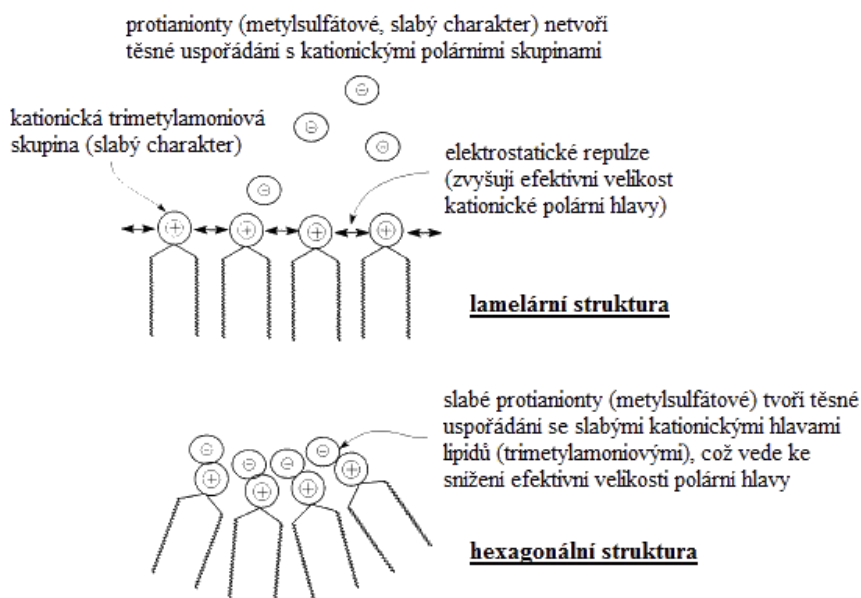
Pro měření stability byly určeny velikosti liposomů při teplotě přípravy, poté byla teplota postupně snížena (po 5 °C) a co 15 minut byla sledována distribuce velikostí. Nestabilita liposomální disperze byla definována jako rychlý nárůst velikosti během 15 minut společně s vizuální detekcí makroskopických agregátů.

Liposomy složené z rozdílných lipidů se obecně vyznačují středním průměrem menším než 100 nm. Velikosti liposomů složených jen ze samotného lipidu se pohybovaly v rozmezí 23 až 50 nm. V přítomnosti DOPE (jako pomocného lipidu) byly velikosti liposomů 20–160 nm a cholesterolu 53–95 nm. Nebyla pozorována závislost mezi délkami uhlíkových řetězců a velikostmi liposomů.

Anizotropické chování fluidity membrány bylo sledováno v případě DPTAP v rozsahu teplot 20–60 °C a v jeho případě byl pozorován zřetelný fázový přechod, v rámci malého rozsahu teplot došlo k výraznému snížení anizotropie, a to okolo 40 °C.

Žádný z analogů DOTAP netvoří za pokojové teploty stabilní liposomy, kromě něj samotného. Tato nestabilita může být připisována efektu teploty fázového přechodu kationických lipidů, která ovlivňuje teplotní chování liposomální dvojvrstvy. U DOTAP je teplota fázového přechodu nižší než 5 °C, pravděpodobně díky nenasycenosti jeho uhlíkových řetězců, zatímco u jeho analogů s nasycenými řetězci stoupá teplota fázového přechodu se vzrůstající délkou řetězce.

Ostatní lipidy formující liposomy, jako lecitin, při teplotách nižších, než je teplota fázového přechodu, nevykazují tuto nestabilitu. Jediný rozdíl mezi oběma skupinami lipidů je ve struktuře polárních hlav, amfifilní neutrální fosfocholin oproti kationické trimethylamoniové skupině. Protože s poklesem velikosti polární hlavy je upřednostňován přechod do převrácené hexagonální fáze, může být stabilita liposomů vysvětlována jako upřednostňování lamelární fáze před hexagonální. To je patrné v případě liposomů tvořených lecitem, kde nenalezneme přechod do hexagonální fáze při teplotách nižších než 85 °C. U analogů DOTAP by mohl být přechod do hexagonální fáze zodpovědný za nestabilitu liposomů. Naznačují, že to může být původně způsobeno formací úzkých iontových párů mezi kationickými polárními hlavami a slabými protianionty při a pod teplotou fázového přechodu. Poté mohou být redukovány elektrostatické repulze mezi kationickými polárními skupinami, což způsobuje pokles efektivní velikosti polární hlavy a přechod do hexagonální fáze (znázorněno na Obr. 19) [66].



Obr. 19 Model popisující interakce mezi analogy DOTAP a lipidovou dvojvrstvou [66]

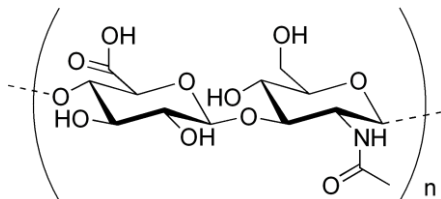
Po přidavku DOPE došlo ke snížení teploty, za které jsou liposomy stabilní, ovšem teprve s přidavkem cholesterolu došlo ke snížení této teploty až na pokojovou u všech studovaných lipidů. Zdá se, že cholesterol má pozitivní účinky na stabilitu dvojvrstvy. To může být připsáno interakcím mezi rigidními molekulami cholesterolu a hydrofobní částí flexibilnějšího kationického lipidů, což zabraňuje krystalizaci lipidové membrány, která tak zůstává flexibilní [66].

4 MATERIÁLY A METODY

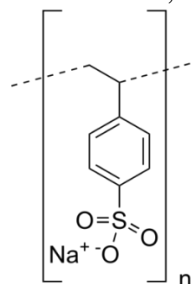
4.1 Použité chemikálie

Polyanionty

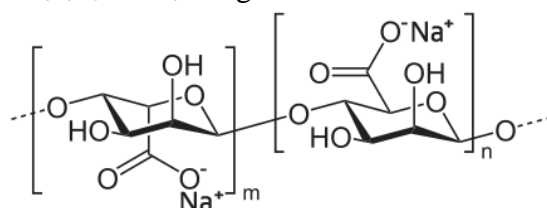
kyselina hyaluronová, 106 kDa, CPN spol. s.r.o., šarže: 160607-9-D7, $M_{\text{monomer}}: 402,31 \text{ g mol}^{-1}$, dále HyA



polystyrensulfonát sodný, 70 kDa, CAS: 25704-18-1, Aldrich, šarže: 0001446357, $M_{\text{monomer}}: 206,19 \text{ g mol}^{-1}$, dále PSSNa

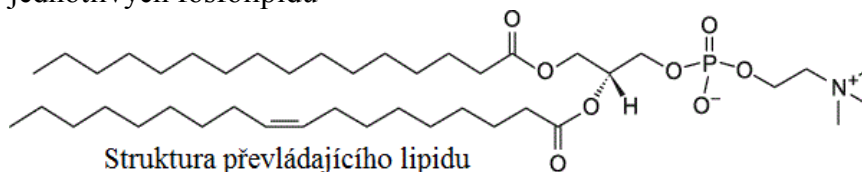


alginát sodný, CAS: 9005-38-3, Carl Roth, šarže: 351172083, $M_{\text{monomer}}: 198,107 \text{ g mol}^{-1}$

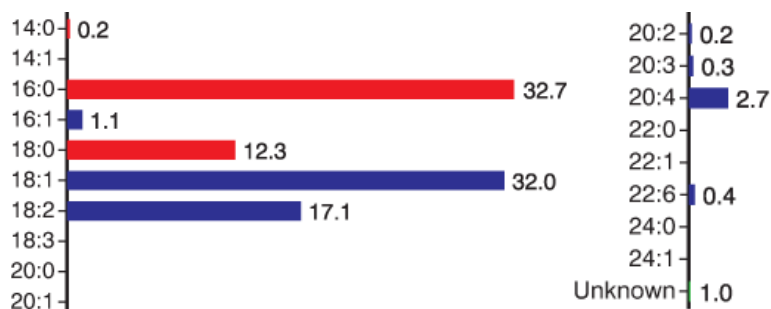


Lipidy

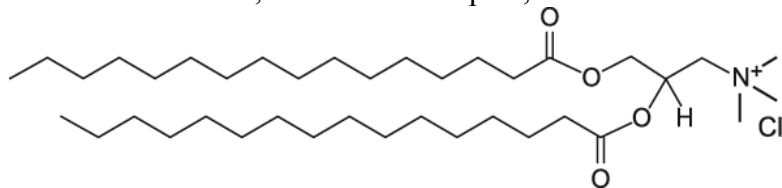
lecitin, L- α -fosfatidylcholin, hydrogenated (Egg, Chicken), CAS: 97281-44-2, Avanti Polar Lipids, > 99 %, šarže: EPC-599; zastoupení jednotlivých mastných kyselin je znázorněno níže – označení fosfolipidů X:Y, kde X je počet uhlíků v řetězci a Y je počet dvojných vazeb v tomto řetězci, číslo za úsečkou značí procentuální zastoupení jednotlivých fosfolipidů



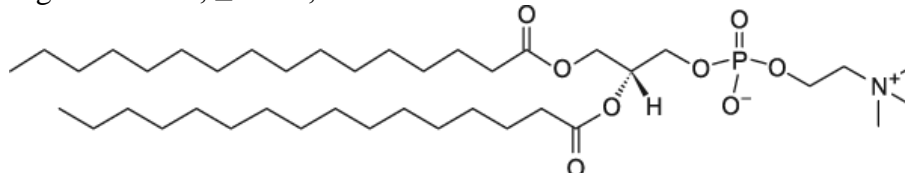
Struktura převládajícího lipidu



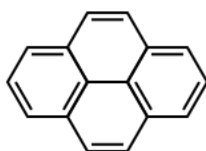
DPTAP, 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan (chloridová sůl), CAS: 139984-36-4, Avanti Polar Lipids, šarže: 160TAP-28



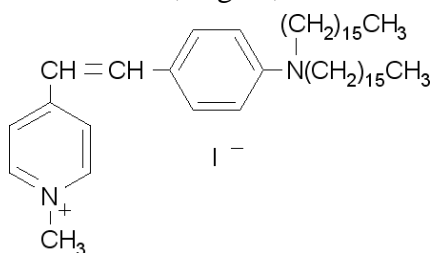
DPPC, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin, CAS: 63-89-8, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, šarže: 078K5203



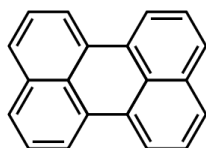
Fluorescenční sondy: pyren, CAS: 129-00-0, Fluka, puriss. p. a. for fluorescence, šarže: 430166/1



DiA, 4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-metylpýridinium jodid, CAS: 114041-00-8, Sigma, šarže: D4167



perylene, CAS: 198-55-1, Fluka, puriss for fluorescence, č. šarže: 384079/1



Rozpouštědla: superčistá voda (upravená systémem PURELAB flex)
chloroform, CAS: 67-66-3, Sigma-Aldrich, for UV-spectroscopy, šarže: PP/2008/05926/0

Ostatní dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , CAS: 777-8-77-0, Lach-Ner, $\geq 99\%$, šarže: PP/2009/00261
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, CAS: 10039-32-4, Lach-Ner, $\geq 98\%$, šarže: PP/2009/06156
chlorid sodný, NaCl , CAS: 7647-14-5, Lach-Ner, $\geq 99,5\%$, šarže: PP/2009/06278

4.2 Metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků lipidů

4.2.1.1 Metoda TLE (Thin Layer Evaporation)

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušného množství lecitinu a cholesterolu ve 40 ml chloroformu a 10 ml metanolu, následným odpařením rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky při 40 °C a rozpuštěním vzniklého lipidového filmu v 50 ml fosfátového pufru za postupného zahřívání na teplotu 40 °C a sonifikování. Část tohoto zásobního roztoku byla navíc extrudována přes 100nm membránu.

4.2.1.2 Sonifikace

Do vialky bylo naváženo požadované množství lecitinu, toto množství bylo rozpuštěno v 0,3 ml chloroformu. Po odpaření chloroformu bylo do vialky pipetováno takové množství vody či pufru, aby výsledná koncentrace lecitinu v zásobním roztoku byla 1 g dm⁻³. Poté byl roztok sonifikován při 45 °C dokud nebyl čirý, tedy 30–60 minut.

Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok DPTAP, pouze s tím rozdílem, že sonifikace probíhala, dokud nebyl roztok opalescentní.

Zásobní roztok DPPC a DPTAP byl připraven navážením obou látek v poměru jejich molekulových hmotností. Směsná navážka byla rozpuštěna v 0,3 ml chloroformu. Po odpaření chloroformu bylo k odparku pipetováno 10 ml vody či pufru, a roztok byl sonifikován při 45 °C dokud nebyl čirý. Poté byl roztok doplněn v odměrné baňce na celkový objem 25 ml, výsledná koncentrace obou lipidů v zásobním roztoku byla 0,5 mM.

4.2.1.3 Lyofilizace

Byly namíchaný dva různé roztoky lecitinu – jeden obsahující pyren a jeden bez pyrenu, které byly nakonec lyofilizovány, a to tak, že byly připraveny sonifikované zásobní roztoky lecitinu jak je popsáno výše. Do jedné ze dvou lyofilizačních baněk bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu, aby ve výsledném roztoku po lyozilizaci a rozpuštění lyofilizátu byla koncentrace pyrenu 10⁻⁵ M (při předpokladu, že veškeré množství pyrenu bude při lyofilizaci ve vzorku zachováno). Po odpaření acetonu bylo do obou nádob (jedné s odparkem pyrenu a druhé bez) pipetováno 20 ml roztoku sonifikovaných lecitinových liposomů ve vodě a vzorky byly promíchány 12 hodin na laboratorní třepačce a zamrazeny. Poté byly lyofilizační baňky připojeny k lyofilizéru, kde byly zásobní roztoky 48 hodin lyofilizovány. Nakonec byly lyofilizáty rozpuštěny ve 20 ml fosfátového pufru.

4.2.2 Příprava zásobních roztoků polyelektrolytů a pufru

Zásobní roztoky polyelektrolytů byly připraveny navážením příslušného množství dané látky a jeho rozmícháním v malém množství vody či pufru na magnetické míchačce. Po úplném rozpuštění polyelektrolytů byly roztoky doplněny vodou či pufrem na požadovaný objem v odměrných baňkách. Navážky jednotlivých polyelektrolytů byly v poměru molekulových hmotností jejich monomerů, aby při pipetování stejného množství zásobního roztoku polyelektrolytu do vzorků byla koncentrace náboje vždy stejná. V Tab. 3 jsou uvedeny molekulové hmotnosti monomerů polyelektrolytů a jejich výsledné koncentrace ve vzorcích.

Tab. 3. Molekulové hm. monomerů polyelektrolytů a jejich koncentrace ve vzorcích

Polyelektrolyt	Mol. hm. monomeru [g mol ⁻¹]	Koncentrace v roztoku [g dm ⁻³]
Hyaluronan sodný	402,31	1,00
Polystyrensulfonát sodný	206,19	0,51
Alginát sodný	198,11	0,49

Zásobní roztok pufru byl připraven navážením požadovaného množství chloridu sodného, dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného a dihydrogenfosforečnanu draselného a rozpuštěním těchto látek v 1 dm³ vody. Po promíchání bylo přeměřeno pH pufru.

4.2.3 Příprava vzorků

Pro studium vlivu přípravy zásobního roztoku (ZR) lecitinu na jeho agregační chování pomocí sond perylenu a DiA byly připraveny 3 shodné koncentrační řady obsahujících DiA a roztok připravený metodou TLE, u ostatních ZR bylo měření opakováno pouze jednou.

Pro další fluorescenční měření byly připraveny vždy tři shodné koncentrační řady obsahující 15–25 vzorků se vzrůstající koncentrací lipidů. Do vialek bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku fluorescenční sondy v acetonu, aby výsledná koncentrace fluorescenční sondy ve vzorcích byla řádově 10⁻⁶ M (kromě vzorků připravených z lyofilizovaného zásobního roztoku lecitinu již pyren obsahujícího). Po odpaření acetonu bylo do vialek pipetováno příslušné množství daného zásobního roztoku lipidů, dále 1 ml zásobního roztoku polyelektrolytu (kromě měření agregačního chování samotných lipidů) a nakonec byl objem vzorku doplněn vodou či pufrem na celkový objem 4 ml. Vzorky byly ponechány míchat na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 18–24 hodin.

Vzorky pro měření zeta potenciálu a velikosti na přístroji Zetasizer byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pro měření fluorescence, tedy s obsahem pyrenu, a to proto, aby byly vzorky stejné jako při měření fluorescence. V přístroji Zetasizer Nano je instalován laser o vlnové délce 633 nm, k excitaci pyrenu ve vzorcích by tedy docházet nemělo.

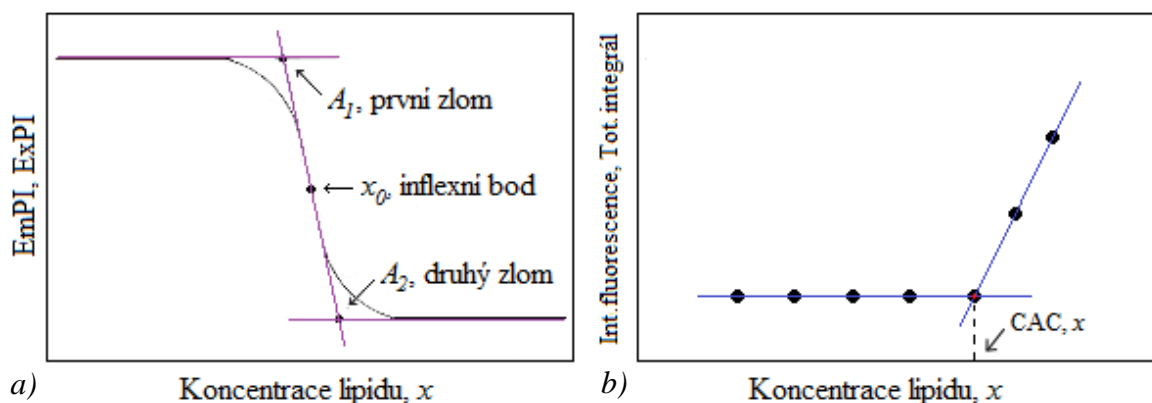
4.2.4 Měření a zpracování výsledků

Excitační a emisní fluorescenční spektra pyrenu byly proměřeny pomocí přístroje Fluorolog. Excitační sken byl měřen v rozsahu 330–340 nm s emisní vlnovou délkou 392 nm, emisní v rozsahu 360–540 nm s excitační vlnovou délkou 335 nm. Z emisního skenu byla zaznamenávána intenzita fluorescence prvního (373 nm) a třetího (383 nm) vibračního pásu a intenzita pásu excimeru (při 470 nm), podělením intenzit fluorescence prvního a třetího pásu byl získán emisní polaritní index (EmPI) a podělením intenzit fluorescence pásu excimeru a monomeru (první vibrační pás) byly získány hodnoty Ex:Mo. Z excitačního skenu byl získán excitační polaritní index (ExPI) podělením intenzit fluorescence při 333 nm a 338 nm.

Do grafu byly vyneseny závislosti EmPI a ExPI na koncentraci lipidů v logaritmickém měřítku. Získaná závislost měla charakter S-křivky, byla proložena v programu Origin Boltzmannovou závislostí (Obr. 20 a). Hodnota bodu x_0 odpovídá hodnotě kritické agregační koncentrace (CAC). Rovnice Boltzmannovy závislosti má tvar

$$EmPI, ExPI = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-\frac{x - x_0}{\Delta x}}}, \quad (3)$$

kde A_1/A_2 je „y“-ová souřadnice prvního/druhého zlomu, x je nezávisle proměnná, x_0 je hodnota nezávisle proměnné v inflexním bodu a Δx je gradient.



Obr. 20 Znárodnění a) Boltzmannovy závislosti, b) závislosti intenzity fluorescence (totálního integrálu) na koncentraci lipidu

Z Boltzmannovy závislosti byly odečteny přibližné koncentrace prvního a druhého zlomu a pro měření velikostí agregátů v roztoku a zeta potenciálů pomocí DLS byly připraveny vzorky s koncentrací před prvním zlomem, při prvním zlomu, s CAC, při druhém zlomu a popřípadě i jeden vzorek s koncentrací vyšší, než je koncentrace lipidu při druhém zlomu. Vzorky jsou dále označeny dle Tab. 4.

Tab. 4. Označení jednotlivých vzorků dle jejich koncentrací pro měření na DLS

Označení	Koncentrace
1	nižší než při prvním zlomu Boltzmannovy závislosti
2	při prvním zlomu Boltzmannovy závislosti
3	CAC (inflexní bod Boltzmannovy závislosti)
4	při druhém zlomu Boltzmannovy závislosti
5	vyšší než při druhém zlomu Boltzmannovy závislosti

Vzorky byly proměřeny na přístroji Zatesizer Nano firmy Malvern Instruments. Měření velikosti probíhalo celkem třikrát, každé zahrnovalo 20 skenů, pro určení zeta potenciálu proběhlo u každého vzorku pět měření každý s 10–100 skeny.

Fluorescenční spektra DiA byla měřena v rozsahu 500–750 nm s excitační vlnovou délkou nastavenou na 460 nm a byla sledována intenzita fluorescence v maximu (přibližně při 580 nm). V případě perylenu byla získána spektra v rozsahu 430–550 nm s excitační vlnovou délkou při 410 nm, byl zaznamenán totální integrál emisního skenu.

Závislosti intenzity fluorescence DiA či totálního integrálu emisního skenu perylenu na koncentraci lipidu (jejím logaritmu) byly zpracovány tak, že konstantní oblast dat při nízkých koncentracích byla zprůměrována, rostoucí část byla proložena lineární spojnicí trendu, jak je uvedeno na Obr. 20 b), pomocí získané rovnice regrese a hodnoty intenzity fluorescence (totálního integrálu) při nízkých koncentracích lipidu byla vypočtena hodnota CAC.

4.2.5 Statistika

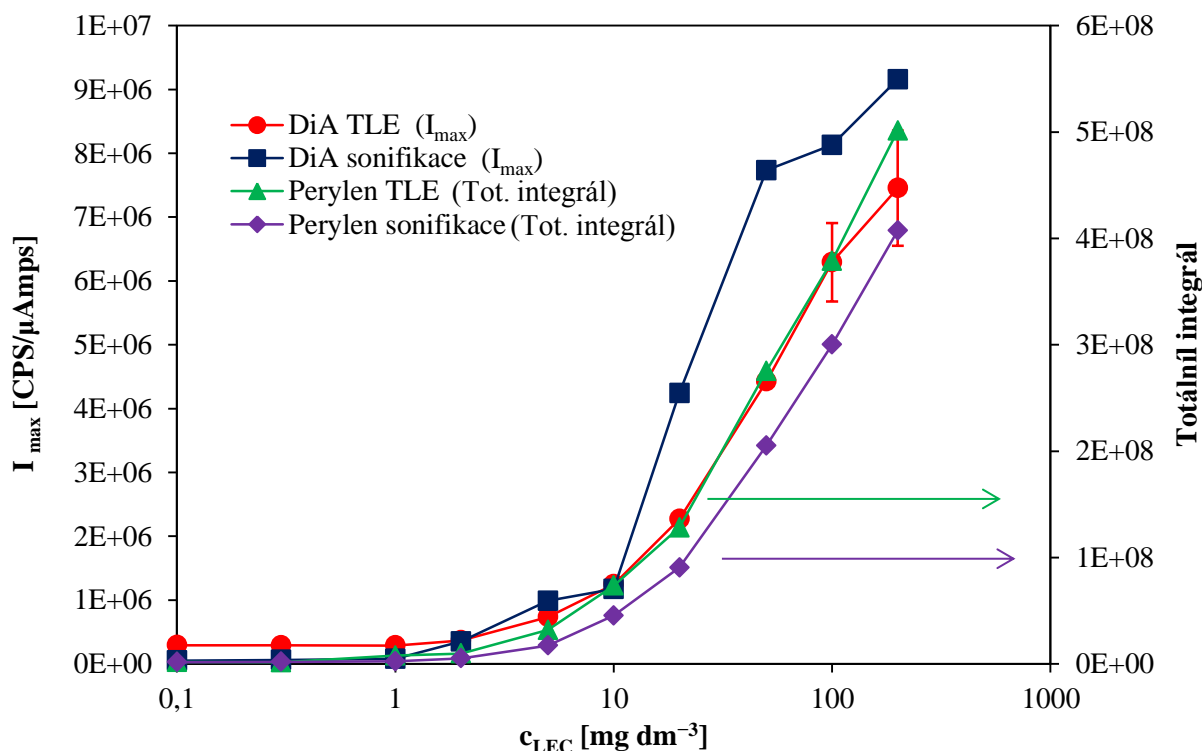
Pro měření fluorescenčních spekter byly namíchány vždy tři stejné koncentrační řady vzorků, naměřená data byla zprůměrována a byla vypočtena směrodatná odchylka těchto tří měření, jež byla do grafu vynesena v podobě chybových úseček. U měření velikosti a zeta potenciálu byla odchylka měření určena softwarem firmy Malvern při zpracování spekter.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vliv způsobu přípravy na agregační chování lecitinu

Pro nalezení vhodného způsobu přípravy lipidových liposomů byly vyzkoušeny tři metody, výsledky jsou popsány v této kapitole. Také byly vyzkoušeny tři různé fluorescenční sondy, aby byla pro další měření vybrána ta nejvhodnější. Odezva běžných fluorescenčních sond jako perylenu a pyrenu byla porovnána s odezvou sondy DiA, jež se běžně používá při výzkumu membrán.

Nejprve byly připraveny dva zásobní roztoky lecitinu, první metodou TLE, postup je uveden v kapitole 4.2.1.1, tento roztok byl extrudován přes 100nm membránu, a druhý sonifikací. Z každého zásobního roztoku byly nachystány dva druhy koncentračních řad vzorků – první obsahující fluorescenční sondu DiA, druhá perylen. Na Obr. 21 je uvedeno srovnání jednotlivých měření a v Tab. 5 nalezneme hodnoty CAC všech těchto systémů získané proložení naměřených závislostí dvěma přímkami, parametry těchto přímek jsou uvedeny v Příloze 1.



Obr. 21 Intenzita fluorescence DiA v maximu emisního skenu při přípravě ZR lecitinu metodou TLE (●), sonifikací (■); totální integrál emisního skenu perylenu při přípravě ZR lecitinu metodou TLE (▲), sonifikací (◆); vše v závislosti na koncentraci lecitinu

Dále byly připraveny další dva druhy zásobních roztoků lecitinu lyofilizací, jak je uvedeno v kapitole 4.2.1.3, a jeden zásobní roztok sonifikací (kapitola 4.2.1.2). Z těchto ZR byly připraveny vždy tři koncentrační řady, jako sonda byl využit pyren. Získané závislosti ExPI na koncentraci lecitinu jsou uvedeny na Obr. 22 a získané hodnoty CAC jednotlivých systémů jsou vypsány v Tab. 5.

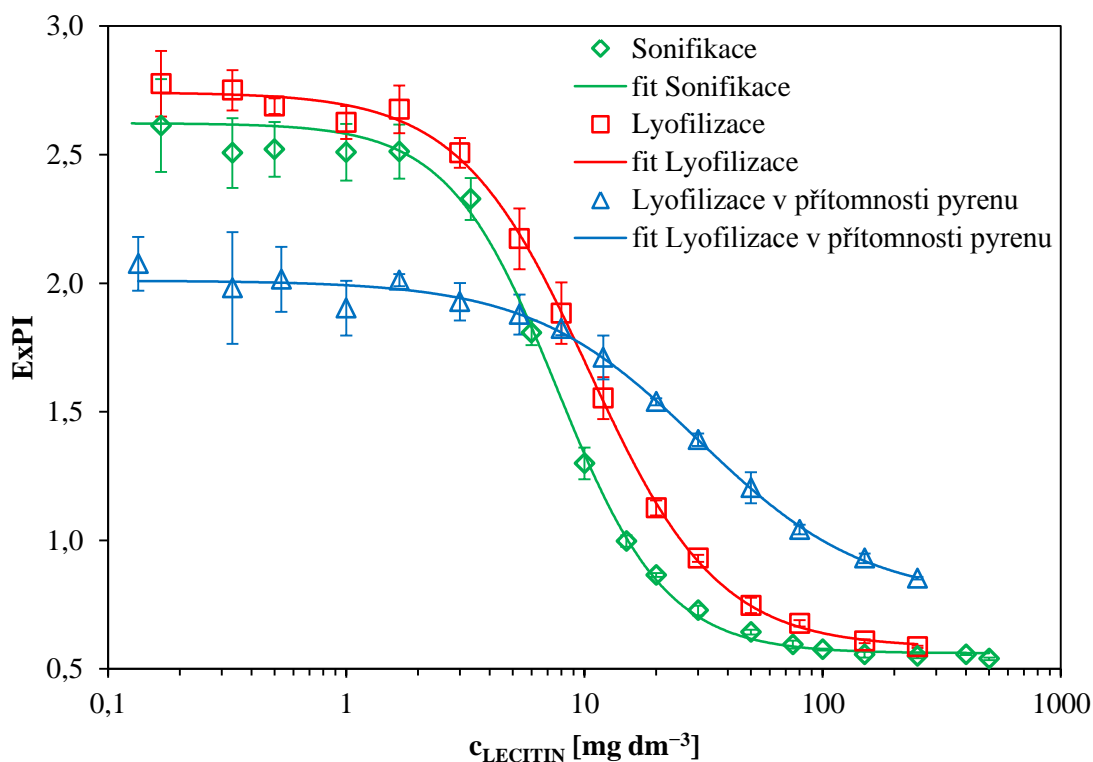
V případě vzorků lyofilizovaných s pyrenem byla emisní spektra pyrenu deformovaná a emisní polaritní indexy nebyly zaznamenány.

Porovnáním průběhů závislostí a naměřených hodnot CAC zjistíme, že chování systému je téměř nezávislé na způsobu přípravy zásobního roztoku lecitinu i na volbě sondy. Je zajímavé, že i při přípravě liposomů metodou TLE a následnou extruzí přes 100nm membránu byly zaznamenány hodnoty CAC porovnatelné s ostatními. Na membráně, přes kterou byla extruze provedena, došlo tedy pravděpodobně k zachycení minimálního množství částic.

Porovnáme-li hodnoty CAC získané při měření s DiA a perylenem zjistíme, že s DiA byly zaznamenány hodnoty nižší, avšak stále velmi dobře srovnatelné s ostatními.

Tab. 5. Naměřené hodnoty CAC systémů obsahujících lecitin při různých metodách přípravy zásobního roztoku lecitinu a při využití různých fluorescenčních sond

Sonda	Metoda	CAC [mg dm^{-3}]
DiA	TLE 100 nm	6,99
Perylen	TLE 100 nm	9,38
DiA	Sonifikace	7,44
Perylen	Sonifikace	10,88
Pyren	Sonifikace	$9,21 \pm 2,28$
Pyren	Lyofilizace	$11,71 \pm 1,83$
Pyren	Lyo. s pyrenem	30,05



Obr. 22 Excitační polaritní indexy pyrenu v závislosti na koncentraci lecitinu při různých metodách přípravy zásobního roztoku lecitinu

Pouze v jednom případě se hodnota CAC systému odchýlila od ostatních hodnot, a to při použití zásobního roztoku připraveného lyofilizací, kdy byl pyren přítomen již v zásobním

roztoku. Tato příprava je tudíž jako jediná nevhodná pro další analýzy, protože pravděpodobně dochází ke vzniku pevné vazby mezi pyrenem a přítomnými částicemi.

V Tab. 6 jsou vypsány hodnoty zeta potenciálů lyofilizovaných vzorků při charakteristických koncentracích odečtených z Boltzmannovy závislosti. Jsou zde porovnány hodnoty zeta potenciálů lyofilizovaných vzorků a vzorků připravených sonifikací. Vidíme, že se stabilita vzorků při těchto způsobech přípravy ZR výrazně nemění.

Tab. 6. Naměřené hodnoty zeta potenciálů vzorků připravených ze ZR lecitinů připravených rozdílnými metodami, v pufru

Označení koncentrace	Lecitin Sonifikace	Lecitin Lyofilizace	Lecitin Lyo. s pyrenem
1	15,0 ± 2,0	20,9 ± 1,6	5,2 ± 0,9
2	6,6 ± 1,9	8,8 ± 1,4	5,5 ± 0,8
3	9,4 ± 1,2	10,3 ± 0,8	12,2 ± 3,6
4	7,1 ± 1,4	4,6 ± 0,7	8,4 ± 0,5
5	6,7 ± 0,7	5,0 ± 0,9	4,2 ± 0,1

Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto, že další měření proběhnou za použití pyrenu jako fluorescenční sondy, protože mezi jednotlivými měřeními s různými sondami nebyl významný rozdíl a také protože zpracování takto naměřených dat je nejpřesnější a nejspolehlivější.

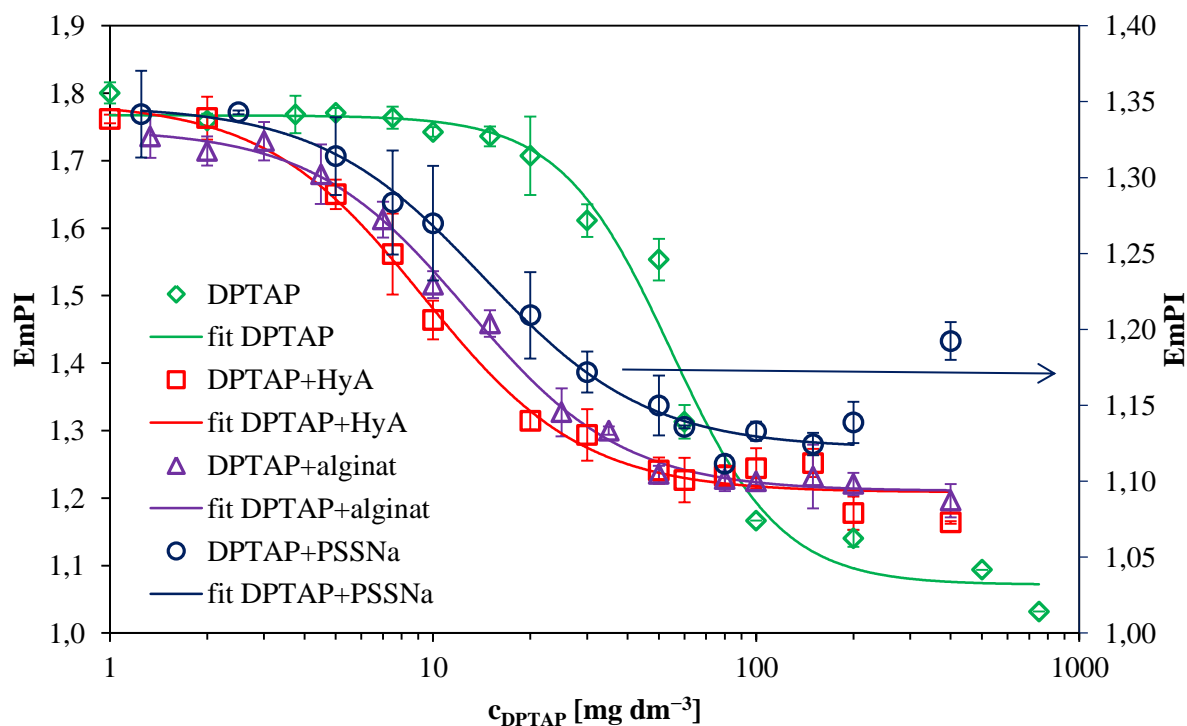
Jako metoda přípravy byla zvolena ta nejjednodušší, tedy sonifikace, protože stejně jako u výběru sondy, i zde vypadá odezva nezávislá na volbě metody přípravy ZR lecitinu. Absolutní hodnota zeta potenciálu ZR připraveného metodou TLE se sice pohybovala okolo 30 mV, ale toto nevelké zvýšení stability bylo pravděpodobně způsobené přítomností cholesterolu v membráně. Pro studium dalších systémů s přídavkem polyelektrolytů není ale žádoucí mít v systému další látku, proto jelikož při použití ZR lecitinu připraveného metodou TLE nedošlo ke změně i jiných parametrů, nebude v dalších měřeních tento systém využit.

5.2 Agregace DPTAP ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů

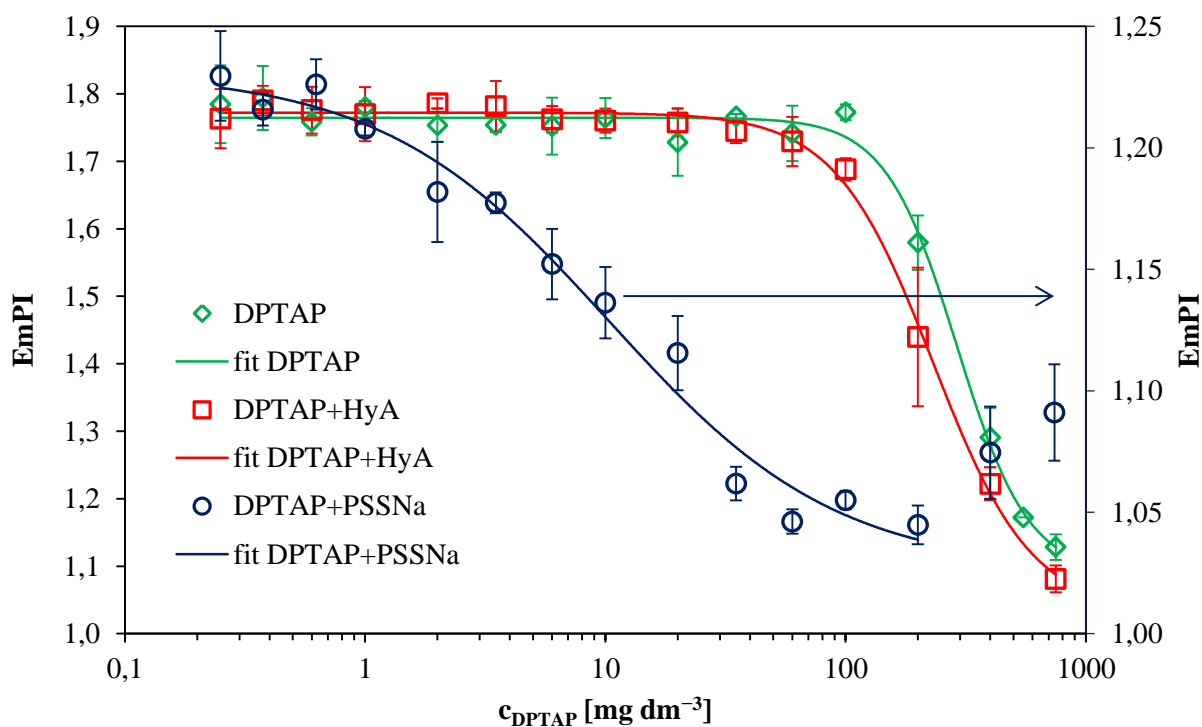
Na Obr. 23 jsou vykresleny závislosti $EmPI$ na koncentraci DPTAP pro samotný DPTAP, pro směs DPTAP s HyA, DPTAP s PSSNa a DPTAP s alginátem, vše ve vodě. Na Obr. 24 jsou závislosti $EmPI$ na koncentraci DPTAP pro stejné systémy (kromě DPTAP s alginátem) v pufru. V Tab. 7 jsou vypsány kritické agregační koncentrace (CAC) všech systémů získané proložení závislostí Boltzmannovou křivkou. Na Obr. 25 je uvedeno grafické srovnání získaných hodnot CAC.

V případě DPTAP ve směsi s PSSNa nebyly do analýzy zahrnuty dva vzorky s nejvyššími koncentracemi DPTAP, protože se odchylojí od trendu, a to proto, že ve vzorku vznikla sraženina. V případě systému DPTAP s alginátem se objevila sraženina i ve vzorcích s koncentrací DPTAP nižší, a to od koncentrace 15 mg dm^{-3} .

Zároveň s přidavkem PSSNa k DPTAP (i k jakémukoliv z dalších studovaných lipidů) ve vodě i v pufru dochází k výraznému snížení hodnot $EmPI$ i $ExPI$ (nejvyšší hodnoty $EmPI$ i $ExPI$ zde zhruba odpovídají nejnižším hodnotám těchto parametrů v systému bez polyelektrolytu nebo s HyA – Tab. 25 v Příloze 2), proto jsou hodnoty $EmPI$ (popř. $ExPI$) pro směs lipidu s PSSNa vždy na vedlejší ose. Důvodem snížení $EmPI$ a $ExPI$ může být struktura PSSNa v roztoku, kde mohou vznikat domény s nižší polaritou díky vysoké koncentraci benzenových skupin blízko u sebe. Proto byly proměřeny $EmPI$ a $ExPI$ roztoku PSSNa ve vodě. V případě $EmPI$ byla získána hodnota $(1,017 \pm 0,010)$, což odpovídá nejnižším naměřeným hodnotám $EmPI$ při měření s lipidem, a $ExPI$ $(0,951 \pm 0,001)$, což jsou hodnoty $ExPI$ z druhé části Boltzmannovy závislosti (minimální hodnoty $ExPI$).



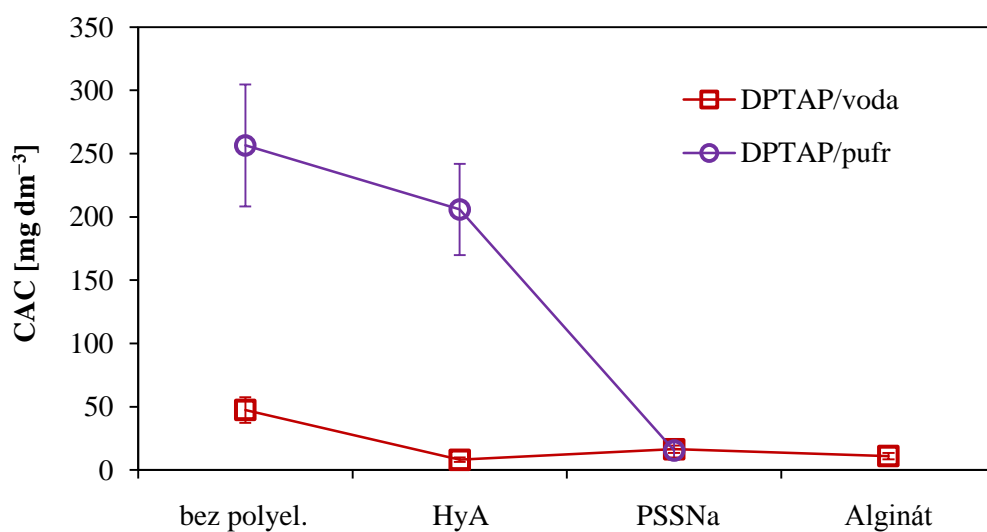
Obr. 23 Emisní polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA, s PSSNa a s alginátem, ve vodě



Obr. 24 Emisní polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, v pufru

Tab. 7. Hodnoty CAC DPTAP samotného, s HyA, s PSSNa a s alginátem ve vodě a v pufru

Lipid/prostředí	DPTAP/voda [mg dm ⁻³]				DPTAP/pufr [mg dm ⁻³]		
	bez polyel.	HyA	PSSNa	alginát	bez polyel.	HyA	PSSNa
EmPI	54,48	9,34	14,31	12,81	290,64	231,38	10,38
ExPI	40,25	6,89	18,43	9,10	222,46	180,37	20,39
Průměr	47,37	8,12	16,37	10,96	256,55	205,87	15,39
Odchylka	10,06	1,74	2,91	2,62	48,21	36,07	7,08



Obr. 25 Hodnoty CAC pro jednotlivé systémy obsahující DPTAP

S přidavkem HyA i alginátu k DPTAP ve vodě dochází ke snížení hodnoty CAC zhruba na pětinu a s přidavkem PSSNa zhruba na dvě pětiny původní hodnoty CAC DPTAP bez polyelektrolytu. V pufru bylo výraznější snížení CAC pozorováno po přidání PSSNa, kdy hodnota CAC klesla na hodnotu CAC DPTAP s PSSNa ve vodě, tedy na hodnotu zhruba 17x nižší oproti DPTAP v pufru bez polyelektrolytu.

Také byly proměřeny hydrodynamické průměry částic a zeta potenciály vybraných vzorků s charakteristickými koncentracemi lipidů (výběr koncentrací je popsán v kapitole 4.2.4). V případě směsi DPTAP s HyA, s PSSNa i s alginátem ve vodě i v pufru byla většinou získána data, která program pro zpracování kolerogramů vyhodnotil jako nedostatečné pro kumulativní analýzu, a to z důvodu polydisperzity systému nebo kvůli přítomnosti velkých částic (v Tab. 8 a Tab. 9 jsou tyto vzorky označeny podbarvením).

I když jsou hodnoty CAC systémů DPTAP s PSSNa ve vodě a v pufru téměř shodné, velikosti agregátů se liší. Zatímco u DPTAP s PSSNa ve vodě byly naměřeny velikosti při CAC okolo 100 nm, v pufru byly zaznamenány při CAC agregáty především s velikostí okolo 250 nm, ale i okolo 30 nm. Takto malé útvary byly v případě DPTAP zaznamenány pouze v přítomnosti HyA v pufru, kde dokonce i při analýze intenzitní distribuce velikosti částic převažovaly. Pufr v systému pravděpodobně odstiňuje repulze mezi souhlasně nabitými polárními hlavami, což má za následek právě zmenšení velikostí agregátů. Vznik větších i menších agregátů DPTAP s PSSNa v pufru vedle agregátů DPTAP s PSSNa ve vodě o střední velikosti poměrně dobře vysvětluje, proč si mohou být hodnoty CAC systémů DPTAP ve vodě a v pufru téměř rovny.

Přítomnost polyelektrolytu výrazněji ovlivňuje agregaci DPTAP v pufru než ve vodě, a to jak z hlediska změny CAC systému, tak i změny průměru částic.

Zajímavé je, že velikosti částic v systémech DPTAP s HyA a DPTAP s PSSNa v pufru jsou velmi podobné (liší se pouze v procentuálním zastoupení větších a menších částic), ale hodnoty CAC v těchto systémech se liší řádově. Porovnáme-li velikosti v těchto systémech se samotnými částicemi DPTAP v pufru, vidíme, že došlo k výraznému snížení velikosti částic s přidavkem polyelektrolytu. Vysvětlením může být, že přidání polyelektrolytu má za následek narušení struktury vzniklých útvarů DPTAP vedoucích ke vzniku útvarů menších, s nimiž je interakce s polyelektrolytem preferována. Vysvětlením výrazně vyšší hodnoty CAC DPTAP s HyA oproti DPTAP s PSSNa ve vodě může být vznik větších agregátů při CAC systému v případě HyA o průměru dosahujícím až 560 nm, kdežto v přítomnosti PSSNa mají větší částice průměr maximálně 300 nm.

Ve vodě naopak nedošlo s přidavkem PSSNa k výraznějším změnám ve velikostech, ale po přidání HyA i alginátu byl zaznamenán nárůst velikostí převládajících částic, pouze v některých případech vznikaly i částice srovnatelně malé s částicemi v roztoku DPTAP ve vodě. Ovšem samotné agregáty DPTAP ve vodě jsou velmi malé, takže nárůst velikosti může být způsoben jak interakcí útvarů DPTAP s polyelektrolytem tak i tím, že v roztoku k novým interakcím nedochází a jako větší částice jsou detekovány řetězce polyelektrolytu.

Hodnota CAC samotného DPTAP v pufru je zhruba 5x vyšší než CAC DPTAP ve vodě. Pravděpodobně pufrové prostředí způsobuje odstínění repulzí mezi jednotlivými kladnými polárními skupinami DPTAP a tím dochází ke vzniku těsnějšího uspořádání. Co se týče naměřených průměrů částic, u DPTAP ve vodě jsou průměry téměř nezávislé na jeho koncentraci, pohybují se v rozmezí 90–160 nm, zatímco u DPTAP v pufru jsou průměry nižší

než 400 nm pouze při velmi nízké koncentraci DPTAP a poté při koncentraci druhého zlomu v Boltzmannově závislosti, při CAC byly naměřeny průměry dokonce přes 1000 nm (mohlo se ovšem jednat pouze o nečistoty). I tím může být vysvětlen nárůst CAC DPTAP v pufru, kde pravděpodobně vznikají agregáty jiného typu.

Tab. 8. Rozsah průměrů částic v jednotlivých systémech DPTAP ve vodě

Voda	DPTAP	DPTAP + HyA		DPTAP + PSSNa		DPTAP + Alginát	
Označení koncentrace	Pík 1 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1	90–160	540–750	125–155	75–125	695–895	685–1210	185–265
2	90–180	490–860	–	90–200	–	485–835	90–110
3	95–165	520–830	80–110	85–135	–	380–870	45–65
4	95–165	700–1110	4650–5230	100–160	–	405–675	–
5	105–175	225–325	–	120–190	–	380–700	50–60

Tab. 9. Rozsah průměrů částic v jednotlivých systémech DPTAP v pufru

Pufr	DPTAP		DPTAP + HyA		DPTAP + PSSNa	
Označení koncentrace	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1	260–430	–	25–35	385–535	95–145	385–575
2	425–665	105–145	25–35	325–625	150–270	15–25
3	1015–1255	–	20–40	460–560	235–305	25–35
4	155–385	–	20–25	305–335	295–375	25–30
5	–	–	–	–	275–405	–

V Tab. 10 jsou vypsány absolutní hodnoty zeta potenciálů systémů DPTAP, DPTAP ve směsi s hyaluronanem, polystyrensulfonylátém či alginátem ve vodě a v Tab. 11 absolutní hodnoty zeta potenciálů pro analogické systémy v pufru. Za hranici stability je považována absolutní hodnota zeta potenciálu 25–30 mV, vzorky s absolutní hodnotou zeta potenciálu vyšší mohou být pokládány za stabilní. Vidíme, že tuto podmínku stability splňují všechny vzorky obsahující DPTAP ve vodě, přičemž ve směsi DPTAP s PSSNa a alginátem jsou hodnoty zeta potenciálů obecně zhruba o 20 mV vyšší než v případě čistého DPTAP či ve směsi s HyA, směsi s PSSNa či alginátem jsou tedy výrazně stabilnější. Naopak v pufru byly stabilní systémy zaznamenány pouze u směsi DPTAP s PSSNa, a to pouze při vyšších koncentracích DPTAP. V pufru jsou tedy systémy obsahující DPTAP nestabilní, s postupem času bude pravděpodobně docházet ke shlukování částic.

Tab. 10. Absolutní hodnoty zeta potenciálů [mV] pro systémy obsahující DPTAP ve vodě

Označení koncentrace	DPTAP	DPTAP + HyA	DPTAP + PSSNa	DPTAP + Alginát
1	37,0 ± 2,8	37,0 ± 2,4	34,3 ± 3,0	50,0 ± 2,6
2	40,5 ± 2,9	38,4 ± 1,5	62,3 ± 1,7	65,4 ± 1,3
3	42,9 ± 1,4	49,9 ± 2,1	68,9 ± 1,2	60,3 ± 2,6
4	44,3 ± 2,7	42,9 ± 1,9	62,0 ± 0,9	67,5 ± 0,8
5	47,8 ± 1,9	44,7 ± 1,1	55,6 ± 0,6	68,0 ± 1,2

Tab. 11. Absolutní hodnoty zeta potenciálů [mV] pro systémy obsahující DPTAP v pufru

Označení koncentrace	DPTAP	DPTAP + HyA	DPTAP + PSSNa
1	12,3 ± 1,7	13,6 ± 0,5	11,4 ± 1,6
2	11,9 ± 2,0	11,8 ± 0,6	27,5 ± 1,35
3	15,3 ± 3,7	14,9 ± 1,7	40,4 ± 2,8
4	23,6 ± 2,4	23,5 ± 2,2	45,3 ± 1,4
5	–	–	46,2 ± 3,3

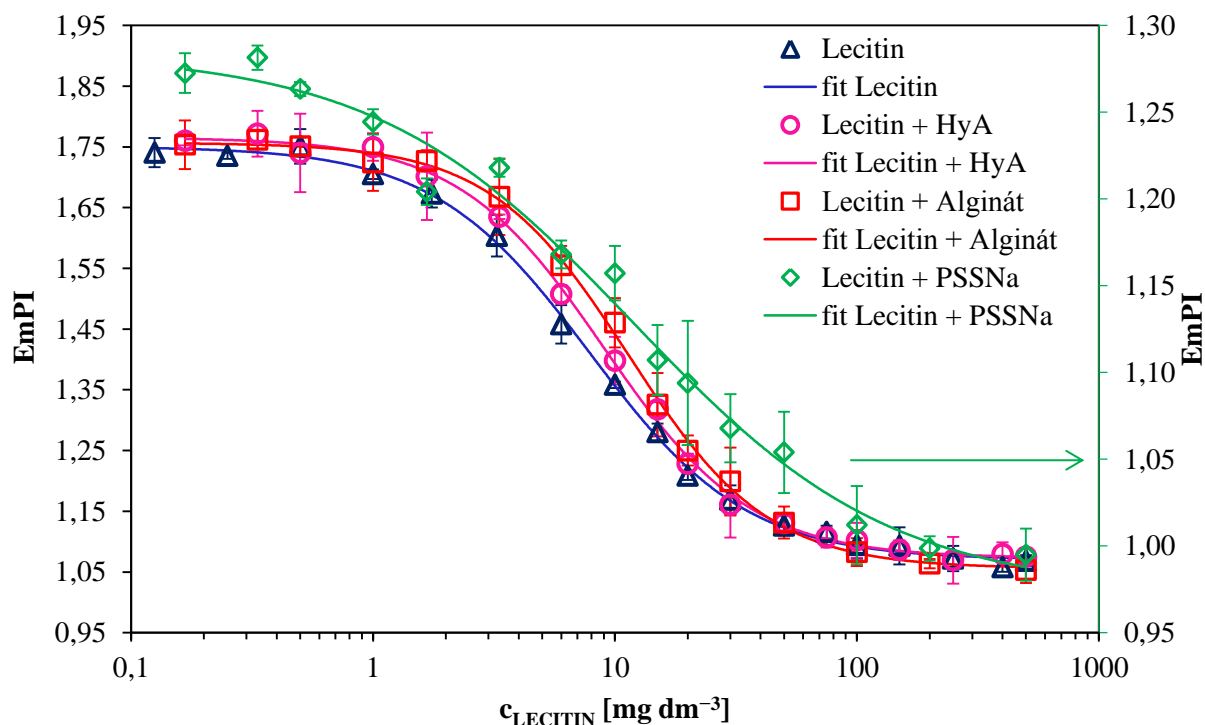
Protože v pufru byly naměřeny výrazně nižší hodnoty zeta potenciálů všech systémů než ve vodě, byly proměřeny zeta potenciály všech zásobních roztoků polyelektrolytů naředěných vodou či pufrům tak, aby koncentrace polyelektrolytu ve vzorku byla stejná jako při ostatních měřeních. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 12.

Vidíme, že zeta potenciál čisté vody i pufru je nízký, avšak ve vodě způsobuje přidavek polyelektrolytu zvýšení zeta potenciálů nad 25 mV, tedy tyto roztoky jsou stabilní. Naopak v pufru způsobuje rozpuštění polyelektrolytu pouze malou změnu v hodnotě zeta potenciálu a roztok zůstává nestabilní.

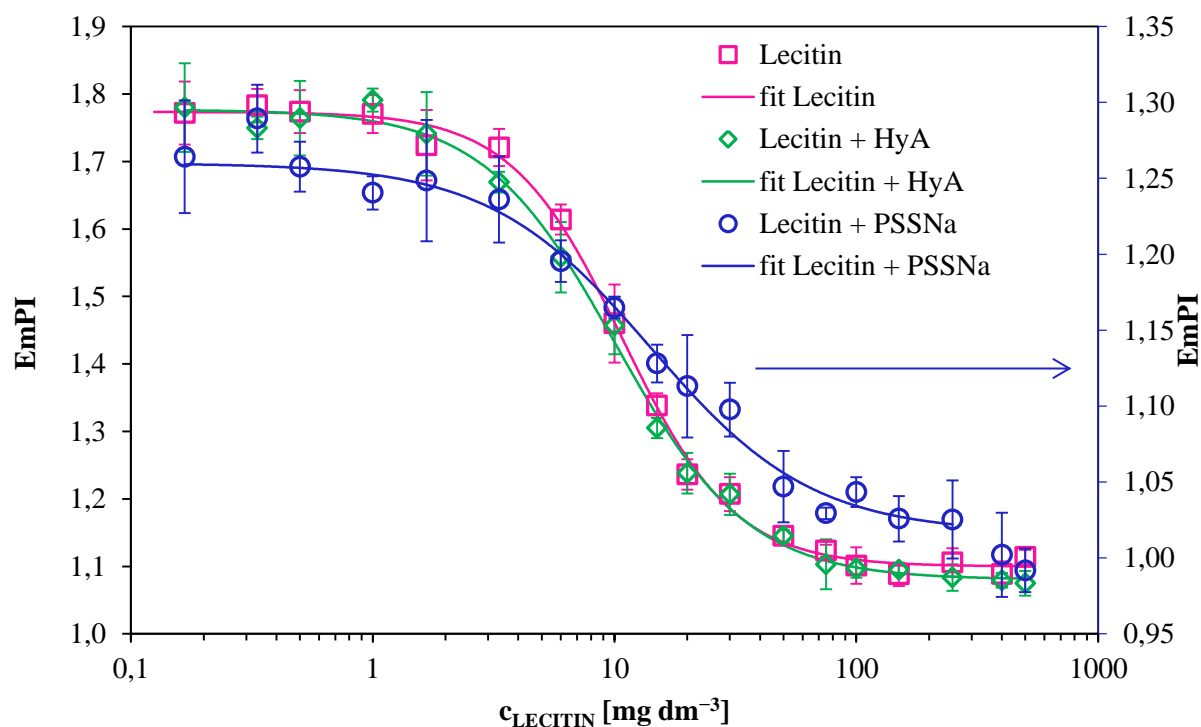
Tab. 12. Hodnoty zeta potenciálů zásobních roztoků polyelektrolytů, pufru a vody

Prostředí	Voda				Pufř		
	Voda	HyA	PSSNa	Alginát	Pufř	HyA	PSSNa
ZR							
ZP	-15,6	-28,4	-38,1	-64,6	-10,9	-15,5	-13,6
odchylka	4,6	1,5	4,1	2,7	8,7	3,1	4,1

5.3 Agregace lecitinu ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů



Obr. 26 Emisní polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci lecitinu pro systém bez polyelektrolytu, s HyA, s PSSNa a s alginátem, ve vodě

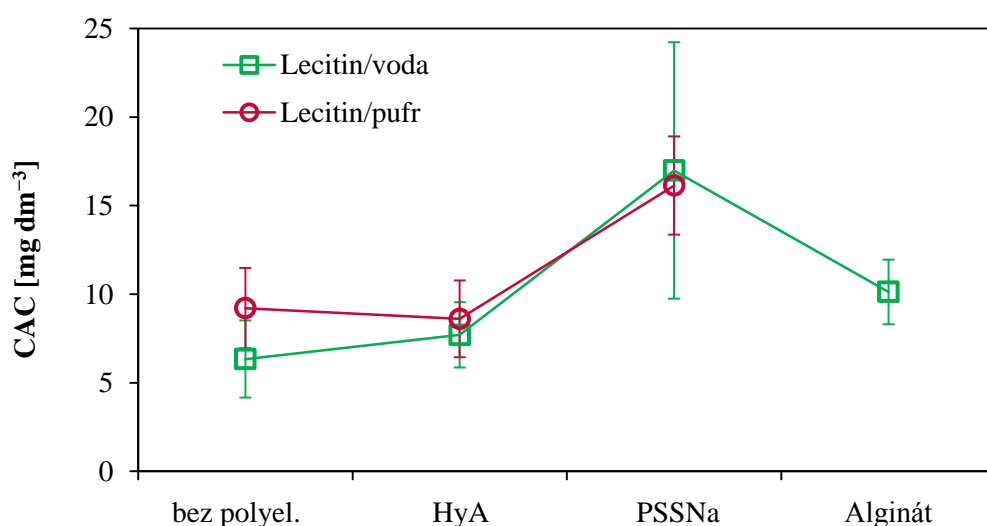


Obr. 27 Emisní polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci lecitinu pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, v pufru

Na Obr. 26 a Obr. 27 jsou znázorněny závislosti EmPI na koncentraci lecitinu ve vodě a v pufru, vždy pro samotný fosfolipid, a pro jeho směs s hyaluronanem či polystyrenulfonátem, ve vodě i s alginátem. Již z těchto závislostí je patrné, že nedochází k velkým změnám CAC, přesné hodnoty jsou vypsány v Tab. 13 níže a jejich grafické znázornění je na Obr. 28. Vidíme, že dochází pouze k mírnému zvýšení CAC po přidání PSSNa k lecitinu, a to ve vodě i v pufru.

Tab. 13. Hodnoty CAC lecitinu samotného, s HyA, s PSSNa a s alginátem ve vodě a v pufru

Lipid/prostředí	Lecitin/voda [mg dm^{-3}]				Lecitin/pufr [mg dm^{-3}]		
	bez polyel.	HyA	PSSNa	Alginát	bez polyel.	HyA	PSSNa
EmPI	7,88	9,01	11,86	11,42	10,81	10,14	14,17
ExPI	4,80	6,40	22,10	8,84	7,60	7,07	18,09
Průměr	6,34	7,70	16,98	10,13	9,21	8,60	16,13
Odchylka	2,18	1,84	7,24	1,82	2,27	2,17	2,77



Obr. 28 Hodnoty CAC pro jednotlivé systémy obsahující lecitin

Patrný rozdíl mezi měřením ve vodě a v pufru byl zaznamenán pouze v případě lecitinu bez přidaného polyelektrolytu, kdy byla naměřená hodnota CAC o něco nižší ve vodě než v pufru (avšak chybové úsečky se překrývají). Zároveň byly naměřené menší velikosti agregátů lecitinu ve vodě než v pufru (Tab. 14 a Tab. 15), průměry agregátů ve vodě nejsou menší řádově, jedná se o rozdíl v rozmezí 50–100 nm, což odpovídá mírně nižší hodnotě CAC lecitinu ve vodě, kde pravděpodobně jsou menší agregáty tvořeny i menším počtem částic. Nebyl zde tedy zaznamenán vliv pufru na agregaci lecitinu samotného ani v přítomnosti polyelektrolytu.

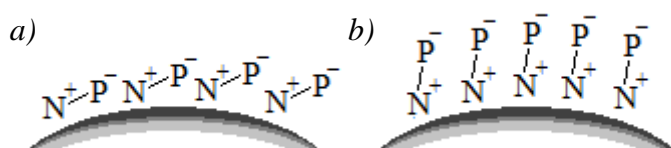
Tab. 14. Rozsah průměrů částic [nm] v jednotlivých systémech lecitinu ve vodě

Voda	Lecitin		Lecitin + HyA		Lecitin + PSSNa		Lecitin + Alginát		
	Označení koncentrace	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1		240–280	40–50	760–980	130–170	420–550	70–90	800–950	–
2		365–410	–	800–1070	175–205	540–790	50–60	670–790	–
3		435–540	60–75	550–800	130–190	360–450	–	680–560	35–45
4		670–1110	120–170	1650–2060	230–280	400–500	75–90	175–325	15–20
5		800–1420	170–225	3140–4280	260–340	70–125	–	95–145	–

Tab. 15. Rozsah průměrů částic [nm] v jednotlivých systémech lecitinu v pufru

Pufr	Lecitin		Lecitin + HyA		Lecitin + PSSNa		
	Označení koncentrace	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1		680–830	–	550–780	20–40	460–590	15–20
2		480–560	–	330–420	25–35	380–510	20–25
3		475–630	110–150	550–760	95–125	410–470	40–55
4		1260–1520	135–155	320–360	–	80–240	1390–2300
5		1500–2340	155–210	260–280	–	420–680	70–90

Vliv pufru byl zaznamenán pouze na velikost agregátů lecitinu a polyelektrolytu, kde zejména při nižších koncentracích lecitinu (do CAC) vznikají částice velmi malé, v případě směsi lecitinu a HyA v pufru do 30 nm, u směsi lecitinu a PSSNa okolo v rozmezí 15–55 nm, což jsou velikosti nižší, než velikosti částic tvořených stejnými látkami ve vodě Bereme-li v úvahu, že nedošlo ke změně CAC, mohlo v důsledku přidání pufru dojít ke smrštění vzniklých útvarů, pravděpodobně odstranění možných repulzí mezi zwiterionovými polárními hlavami vedlo k přeuspořádání těchto polárních hlav z horizontálního uspořádání, kde náboje jsou střídavě uspořádány na povrchu dvojvrstvy, do uspořádání vertikálního. Návrh, jak by mohlo toto přeuspořádání vypadat, je uveden na Obr. 29.



Obr. 29 Uspořádání nábojů lecitinu na povrchu dvojvrstvy, a) horizontální, b) vertikální

Při vyšších koncentracích lecitinu pak docházelo k vysrážení vzorku, což je pravděpodobně důvod přítomnosti větších částic. Největší sraženiny ve vzorcích byly před měřením na ZetaSizeru zachyceny na 5 μ m membráně.

Porovnáme-li v tomto případě efekt přidavku polyelektrolytu na rozměr agregátů ve vodě a v pufru pozorujeme zde podobný trend jako v předchozím případě směsi DPTAP – v systému ve vodě dochází přidavkem HyA ke zvětšení agregátů a s přidavkem PSSNa dochází jen k malým změnám v průměrech částic a po smíchání lecitinu s alginátem ve vodě vznikají vedle částic větších (okolo 500 nm) i výrazně menší (s průměrem přibližně 50 nm),

v pufru přídavek HyA i PSSNa k lecitinu způsobují obecně zmenšení agregátů obsažených v systémech (těch větších i menších) a to téměř beze změny v hodnotách CAC systémů.

V Tab. 16 a Tab. 17 jsou vypsané absolutní hodnoty zeta potenciálů směsí obsahujících lecitin ve vodě a v pufru. Vidíme, že s přidavkem jakéhokoliv polyelektrolytu k lecitinu ve vodě vzrostla hodnota zeta potenciálu nad hranici stability systému (25 mV), přičemž největší nárůst byl pozorován po přidavku alginátu k lecitinu ve vodě.

Naopak v pufru nemá přídavek polyelektrolytu žádný pozitivní vliv na stabilitu systému, hodnoty zeta potenciálu dosahují maximálně 15 mV, všechny tyto vzorky jsou tedy nestabilní a pravděpodobně bude docházet ke shlukování částic a tvorbě větších agregátů.

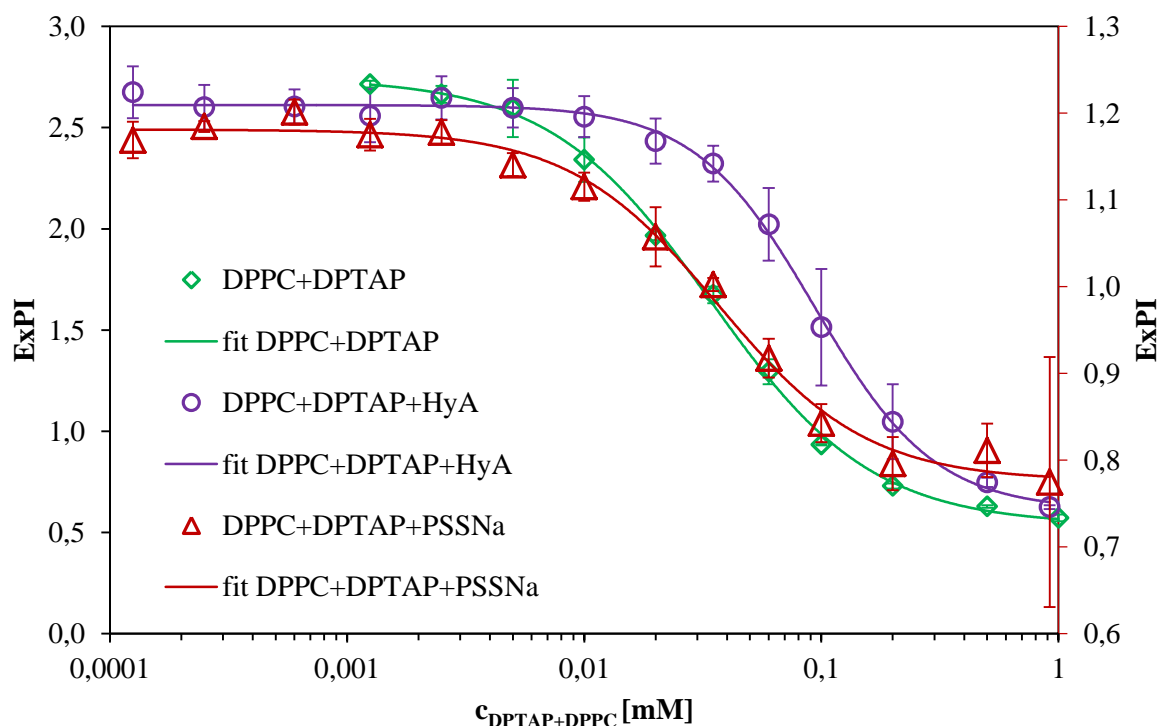
Tab. 16. Absolutní hodnoty zeta potenciálů pro systémy obsahující lecitin ve vodě

Označení koncentrace	Lecitin	Lecitin + HyA	Lecitin + PSSNa	Lecitin + Alginát
1	2,1 ± 0,7	36,3 ± 5,7	43,0 ± 5,7	60,7 ± 1,8
2	4,8 ± 1,1	25,8 ± 1,5	44,6 ± 1,9	60,2 ± 2,0
3	23,5 ± 2,9	33,4 ± 2,0	47,7 ± 2,4	48,2 ± 3,2
4	17,7 ± 2,0	37,1 ± 2,7	39,4 ± 2,6	61,5 ± 2,3
5	4,67 ± 2,2	38,1 ± 1,9	44,9 ± 2,7	58,3 ± 2,8

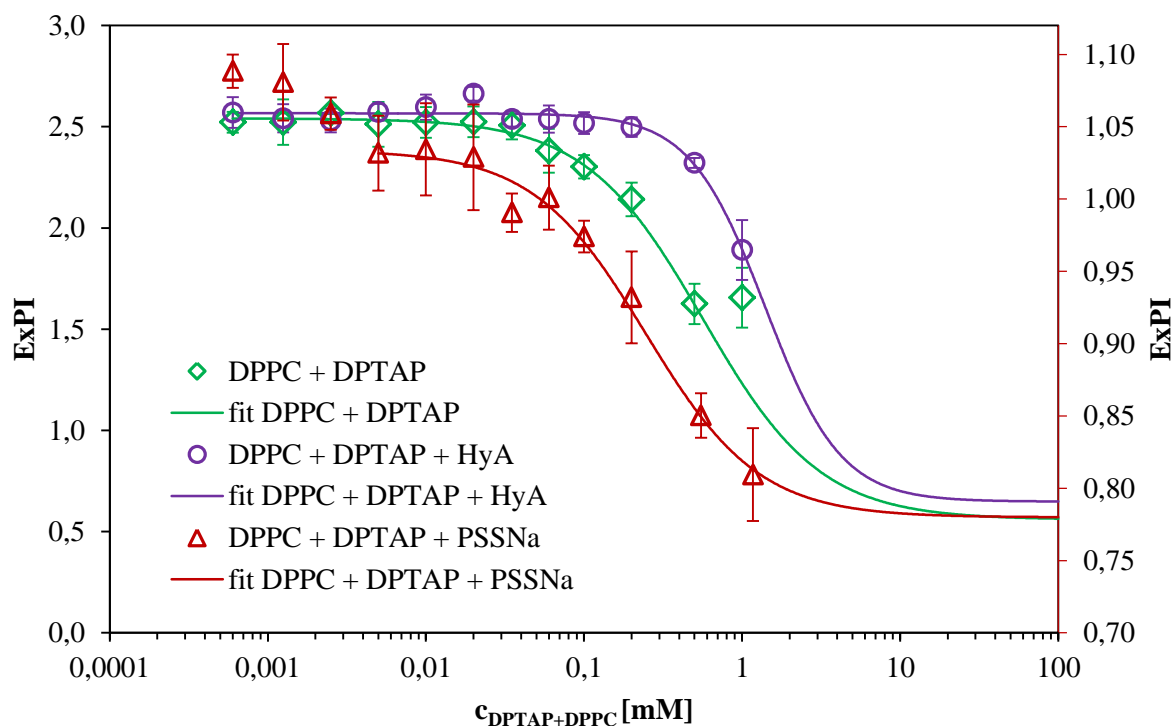
Tab. 17. Absolutní hodnoty zeta potenciálů pro systémy obsahující lecitin v pufru

Označení koncentrace	Lecitin	Lecitin + HyA	Lecitin + PSSNa
1	15,0 ± 2,0	7,9 ± 1,7	8,9 ± 3,0
2	6,6 ± 1,9	10,3 ± 4,6	6,5 ± 0,5
3	9,4 ± 1,2	10,2 ± 0,6	7,4 ± 1,0
4	7,1 ± 1,4	9,9 ± 1,7	12,0 ± 0,9
5	6,7 ± 0,7	6,5 ± 1,9	14,1 ± 1,2

5.4 Agregace směsi DPPC a DPTAP ve vodě a v pufru, v přítomnosti polyelektrolytů



Obr. 30 Excitační polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci směsi DPPC a DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, ve vodě



Obr. 31 Excitační polaritní index pyrenu v závislosti na koncentraci směsi DPPC a DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, v pufru

Na Obr. 30 jsou uvedeny závislosti EmPI na koncentraci ekvimolární směsi DPPC a DPTAP pro samotnou směs lipidů, také ve směsi s hyaluronanem a polystyrenulfonátem ve vodě a na Obr. 31 jsou znázorněny závislosti ExPI na koncentraci ekvimolární směsi DPPC a DPTAP pro analogické směsi v pufru. Naměřené hodnoty CAC jsou uvedeny v Tab. 18.

Tab. 18. Hodnoty CAC samotné směsi DPTAP a DPPC, s HyA a s PSSNa ve vodě a v pufru

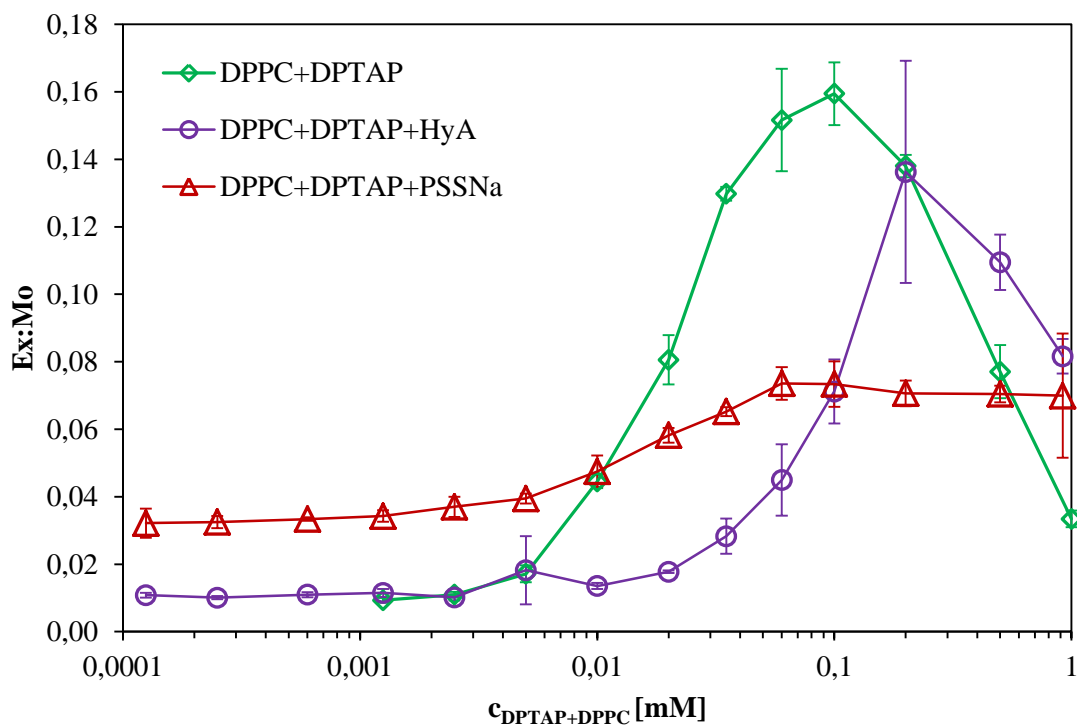
Lipid/prostředí	DPTAP + DPPC/voda [mM]			DPTAP + DPPC/pufr [mM] *		
	bez polyel.	HyA	PSSNa	bez polyel.	HyA	PSSNa
EmPI	0,0573	0,1115	0,0540	0,6599	1,3052	-
ExPI	0,0343	0,0940	0,0368	0,5658	1,4042	0,2463
Průměr	0,0458	0,1027	0,0454	0,6128	1,3547	0,2463
Odchylka	0,0163	0,0124	0,0122	0,0665	0,0700	0,0000

* Data získaná extrapolací

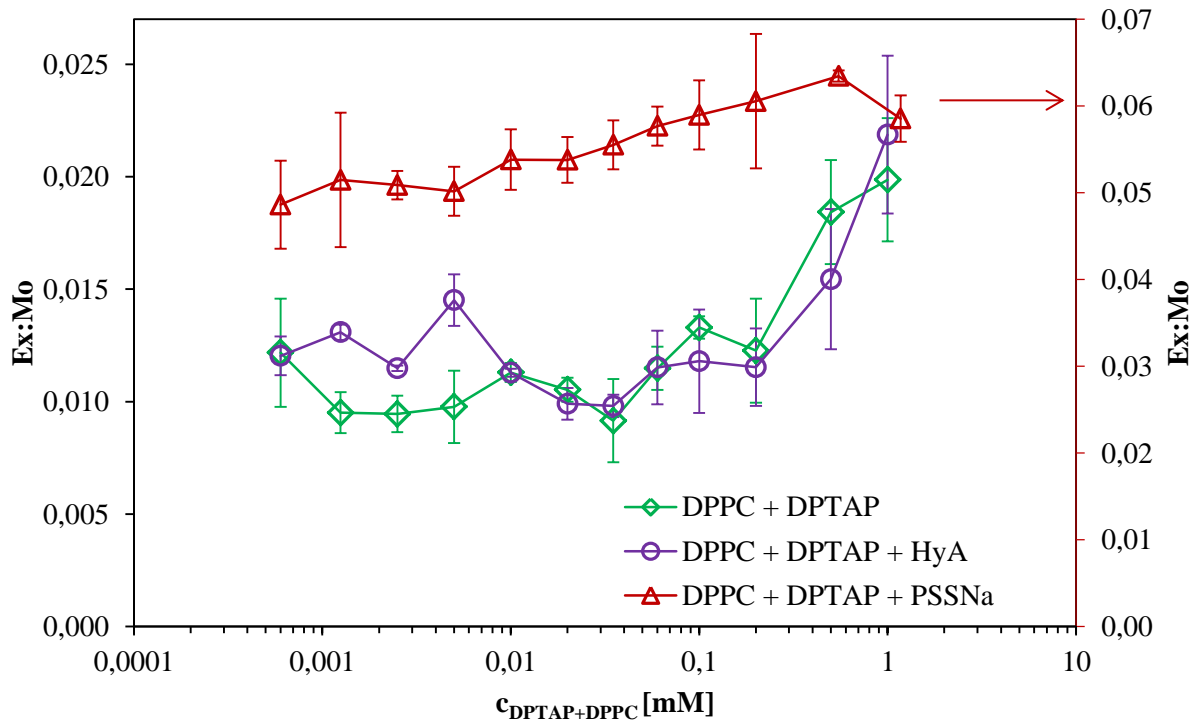
V pufru došlo k posunu CAC všech systémů k vyšším koncentracím tak, že nebyl s rostoucí koncentrací směsi lipidů naměřen celý pokles emisních/excitačních polaritních indexů (nebo konstantní část za druhým zlomem), navíc při nejvyšších měřených koncentracích byly vzorky již hodně zakalené a některé vysrážené, proto nebyly závislosti doměřeny ani dodatečně. Data byla proto extrapolována, a to tak, že byla vzata minima polaritních indexů ve vodě (například pro analýzu DPPC + DPTAP + PSSNa v pufru byly použity hodnoty DPPC + DPTAP + PSSNa ve vodě – v případě směsi s lecitinem se hodnoty polaritních indexů při druhém zlomu (A_2) analogických systémů v pufru a ve vodě téměř shodovaly) a tyto hodnoty byly přiřazeny koncentracím směsi DPPC a DPTAP o dva řády vyšším než byly poslední měřené koncentrace. Poté byla data klasicky proložena Boltzmannovou závislostí pomocí programu Origin.

Porovnáním průběhů závislostí Ex:Mo (poměr intenzity fluorescence pásu excimeru a monomeru emisního spektra pyrenu) na koncentraci ekvimolární směsi DPPC a DPTAP ve vodě a v pufru (Obr. 32 a Obr. 33) vidíme, že v pufru byl po nárůstu Ex:Mo zaznamenán i jeho pokles pouze u jediné směsi, a to u směsi DPPC, DPTAP a PSSNa, na rozdíl od směsi ve vodě, kde byl pokles Ex:Mo zaznamenán u všech směsí (pouze u směsi obsahující PSSNa ve vodě jsou hodnoty při vyšších koncentracích směsi lipidů spíše konstantní). Tento rozdíl odpovídá zvýšení CAC systémů v pufru o řád oproti směsem ve vodě a zároveň nejnižší hodnotě CAC v pufru u směsi DPPC, DPTAP a PSSNa (protože jedine u této směsi v pufru byl zaznamenán pokles Ex:Mo v rozsahu měřených koncentrací).

U závislosti ExPI na koncentraci směsi DPPC a DPTAP v přítomnosti PSSNa v pufru (Obr. 31) můžeme pozorovat dvojitou Boltzmannovou závislost, kde první S-křivka je patrná při nízkých koncentracích směsi DPPC a DPTAP, avšak v jednotlivých řadách se tento trend neprojevil, pouze po zprůměrování všech tří měření. Nicméně pro jistotu bylo toto měření opakováno, pouze při nízkých koncentracích směsi DPPC a DPTAP (do koncentrace směsi 0,02 mM), a v tomto měření nebyl charakteristický průběh S-křivky při nízkých koncentracích směsi zaznamenán. Původní průběh s dvojitou Boltzmannovou závislostí nebyl tedy potvrzen.



Obr. 32 Poměr intenzity fluorescence excimeru a monomeru pyrenu ($Ex:Mo$) v závislosti na koncentraci směsi DPPC a DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, ve vodě



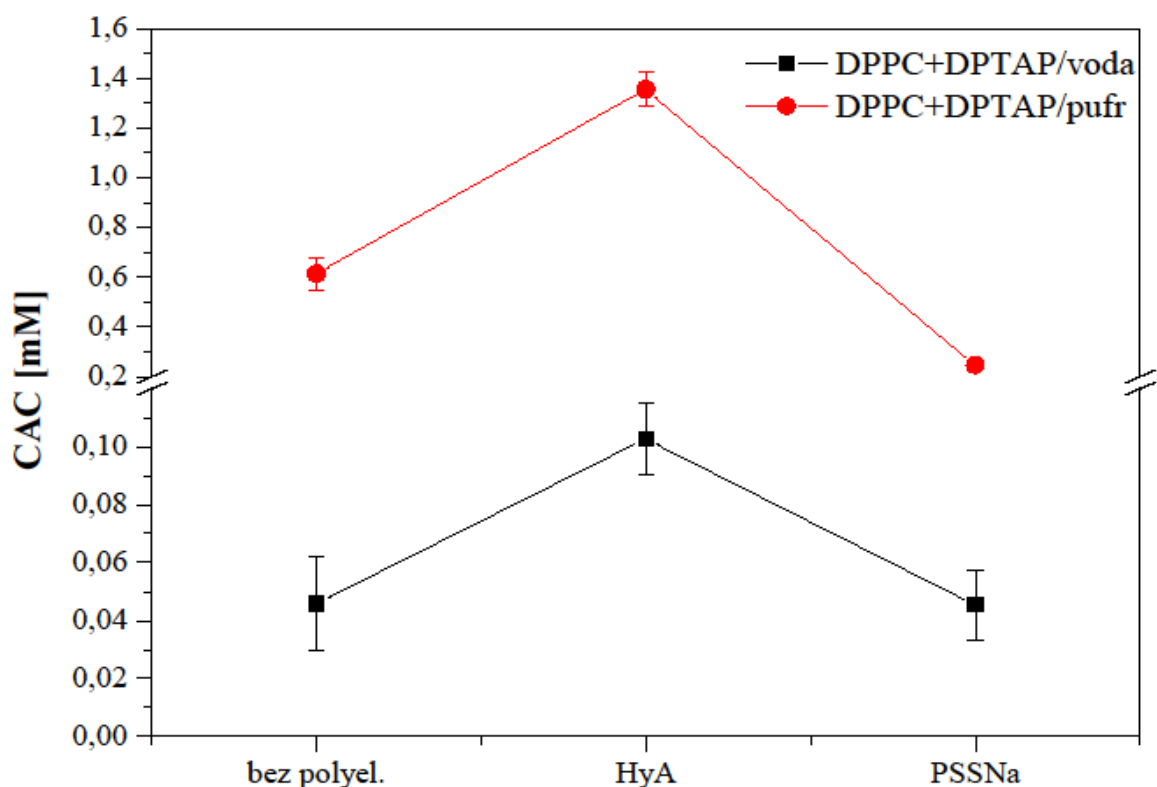
Obr. 33 Poměr intenzity fluorescence excimeru a monomeru pyrenu ($Ex:Mo$) v závislosti na koncentraci směsi DPPC a DPTAP pro systém bez polyelektrolytu, s HyA a s PSSNa, v pufru

V případě směsi DPPC s DPTAP a PSSNa v pufru nebyl vůbec zaznamenán pokles EmPI s rostoucí koncentrací směsi DPPC a DPTAP, docházelo spíše ke kolísání hodnot v rozmezí 1,12–1,20, přičemž v případě lecitinu i DPTAP ve směsi s PSSNa v pufru dochází k poklesu hodnot EmPI v rozsahu 1,02–1,26. Nicméně pokles ExPI nalezen byl. Proto jsou zde uvedeny závislosti ExPI na koncentraci směsi lipidů.

Na Obr. 34 jsou znázorněny naměřené hodnoty CAC směsi DPPC a DPTAP i v přítomnosti polyelektrolytů ve vodě i v pufru. Hodnoty CAC jsou též vypsány v Tab. 18.

Vidíme, že s přidavkem HyA nastává posun CAC k vyšším koncentracím směsi DPPC a DPTAP ve vodě i v pufru, a v pufru dochází k posunu CAC k o řád vyšším koncentracím směsi DPPC a DPTAP oproti měření ve vodě u všech tří studovaných systémů.

Je možné, že vlivem přidavku pufru dochází k odstranění odpuzivých interakcí mezi souhlasně nabitými molekulami a tedy není nutné, aby vznikaly útvary s pravidelně se střídajícími molekulami DPPC a DPTAP. To může být příčinou řádové změny v hodnotách CAC systémů ve vodě a v pufru.



Obr. 34 Hodnoty CAC pro jednotlivé systémy obsahující ekvimolární směs DPPC a DPTAP

Porovnáme-li velikosti agregátů směsi DPPC a DPTAP bez elektrolytu ve vodě a v pufru (Tab. 19 a Tab. 20) zjistíme, že v pufru jsou agregáty při každé koncentraci větší, což se shoduje i se zvýšením CAC v pufru, jinými slovy, zvýšení CAC směsi DPPC a DPTAP v pufru je pravděpodobně způsobeno tím, že v pufru vznikají agregáty výrazně větších rozměrů.

Tab. 19. Rozsah průměrů částic v jednotlivých systémech obsahujících DPPC a DPTAP ve vodě

Voda	DPPC + DPTAP		DPPC + DPTAP + HyA	DPPC + DPTAP + PSSNa	
	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1	100–190	–	350–520	380–470	10–15
2	105–165	960–1340	445–690	130–210	–
3	65–120	–	420–680	150–230	–
4	50–80	–	270–410	110–190	–
5	50–85	–	250–350	120–200	–

Přidáním HyA ke směsi DPPC a DPTAP ve vodě došlo ke zvýšení velikosti částic, což také odpovídá zvýšení CAC systému. Naopak po přidavku PSSNa došlo pouze k mírnému zvětšení průměrů a hodnoty CAC těchto dvou systémů jsou si téměř rovny.

V pufru dochází při smíchání směsi lipidů DPPC a DPTAP s polyelektrolytem obecně ke snížení průměrů částic, přičemž je výraznější u směsi obsahující hyaluronan. V obou systémech v pufru obsahujících elektrolyt navíc vznikají vedle agregátů větších, s průměrem ve stovkách nanometrů, i agregáty menší o průměrech v desítkách nanometrů. Zároveň ve směsi obsahující HyA došlo stejně jako ve vodě k nárůstu hodnoty CAC systému, kdežto u směsi s PSSNa byla zaznamenána hodnota CAC nižší vzhledem ke směsi bez polyelektrolytu.

U směsi v pufru obsahující HyA byla naměřena vyšší hodnota CAC než po přidavku PSSNa což odpovídá i mírně vyšším hodnotám naměřeným průměrů částic při CAC systému.

Tab. 20. Rozsah průměrů částic v jednotlivých systémech obsahujících DPPC a DPTAP v pufru

Pufr	DPPC + DPTAP	DPPC + DPTAP + HyA		DPPC + DPTAP + PSSNa	
	Pík 1 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
1	320–340	360–400	20–25	410–480	10–15
2	270–290	210–240	20–25	430–550	15–20
3	3920–4600	600–720	20–30	340–470	60–70
4	–	–	–	185–380	–

Obecně, se zvyšující se koncentrací směsi DPPC a DPTAP nedochází v žádném ze systémů k výrazné změně průměrů částic, pouze u směsi lipidů v pufru (DPPC + DPTAP) vznikají při CAC agregáty o průměru v řádu mikrometrů, při této koncentraci směsi může tedy docházet ke shlukování částic, ovšem tomu nenapovídá vysoká hodnota zeta potenciálu ($37,0 \pm 3,8$ v Tab. 22), pravděpodobně byly v roztoku přítomny nečistoty.

Tab. 21. Absolutní hodnoty zeta potenciálů pro systémy obsahující DPPC a DPTAP ve vodě

Označení koncentrace	DPPC + DPTAP	DPPC + DPTAP + HyA	DPPC + DPTAP + PSSNa
1	$7,5 \pm 1,4$	$42,8 \pm 2,2$	$49,2 \pm 1,4$
2	$17,1 \pm 1,3$	$33,5 \pm 0,8$	$70,5 \pm 1,0$
3	$42,6 \pm 1,0$	$37,2 \pm 0,9$	$70,6 \pm 1,9$
4	$53,7 \pm 1,7$	$20,7 \pm 0,4$	$68,2 \pm 1,0$
5	$53,9 \pm 2,0$	$13,8 \pm 0,4$	$61,0 \pm 0,9$

Tab. 22. Absolutní hodnoty zeta potenciálů pro systémy obsahující DPPC a DPTAP v pufru

Označení koncentrace	DPPC + DPTAP	DPPC + DPTAP + HyA	DPPC + DPTAP + PSSNa
1	14,1 ± 2,2	11,3 ± 0,7	11,1 ± 0,7
2	16,4 ± 1,8	16,6 ± 0,5	34,1 ± 2,1
3	37,0 ± 3,8	13,5 ± 0,6	37,5 ± 0,6
4	–	–	52,0 ± 0,8

V Tab. 21 a Tab. 22 jsou vypsány naměřené hodnoty zeta potenciálů vzorků obsahujících směs lipidů bez nebo v přítomnosti polyelektrolytu ve vodě a v pufru. U směsi DPPC a DPTAP ve vodě i v pufru dochází se vzrůstající koncentrací směsi lipidů k nárůstu hodnot zeta potenciálu, tento systém je tedy nestabilní při nízkých koncentracích a relativně stabilní při vyšších koncentracích směsi lipidů. Vysvětlením může být, že se zvyšující se koncentrací roste pravděpodobnost vzniku směsných částic, v nichž se pravidelně vedle sebe střídají molekuly kationaktivního DPTAP a zwitterionu DPPC.

U směsi DPPC s DPTAP a HyA ve vodě je tomu naopak, se vzrůstem koncentrace směsi lipidů nastává pokles hodnot zeta potenciálu. Je tedy možné, že vznikající agregáty jsou stabilní pouze při nízkých koncentracích směsi lipidů, protože právě při těchto nižších koncentracích směsné agregáty DPPC a DPTAP interagují s hyaluronanem. Tím může být vysvětlen i posun CAC k vyšším koncentracím v tomto systému, tedy že při nízkých koncentracích vznikají agregáty stabilní a ty jsou narušeny až vyšším přidavkem lipidů, což vede ke snížení zeta potenciálu a tedy i stability systému. Dokonce došlo v tomto systému i k mírnému snížení velikosti částic v roztoku (Tab. 19), což také naznačuje, že v systému došlo okolo CAC k přeuspořádání.

V případě směsi DPPC, DPTAP a PSSNa ve vodě je vzniklý systém vysoce stabilní a se změnou koncentrace lipidů nedochází k výrazným změnám zeta potenciálu, především nedochází k přechodu v systému mezi stavem stabilním a nestabilním.

V pufru vzniká po smíchání směsi lipidů s HyA nezávisle na koncentraci systém nestabilní, zatímco po přidání PSSNa se vzrůstající koncentrací směsi lipidů roste i hodnota zeta potenciálu podobně jako u systému v pufru bez přidaného polyelektrolytu.

5.5 Shrnutí naměřených průměrů částic a zeta potenciálů jednotlivých systémů

Aby byl systém lipid-polyelektrolyt stabilní a použitelný v kosmetických či farmaceutických přípravcích, musí být průměr částic určitých rozměrů, přibližně do 200 nm, a absolutní hodnota zeta potenciálu musí být vyšší než 25 mV.

V Tab. 23 je uvedeno shrnutí splnění či nesplnění výše uvedených podmínek. Byly sledovány vzorky s CAC systému nebo s koncentrací lipidu při druhém zlomu. V případě velikostí bylo zjišťováno, zda hydrodynamický průměr částic $d(H)$ je do 200 nm, respektive zda se v systému vyskytují částice s průměrem menším než 200 nm (bez nutnosti aby v systému převažovaly). V případě zeta potenciálu (ζ) bylo sledováno, zda je jeho absolutní hodnota vyšší než 25 mV. Byla-li podmínka splněna, je příslušné pole označeno symbolem „✓“, nebyla-li splněna, je označeno „✗“. V případě nejstabilnějších systémů (při překročení hodnoty zeta potenciálu 60 mV) je příslušné pole označeno „✓✓“.

Dále jsou v Tab. 23 oranžovým podbarvením označeny systémy, u kterých došlo přidáním polyelektrolytu k poklesu hodnoty CAC systému oproti samotnému lipidu, fosfolipidu či jejich směsi, a modře jsou označeny systémy, kde došlo ke vzrůstu hodnoty CAC s přidáním polyelektrolytu oproti čisté lipidové směsi.

Tab. 23. Shrnutí naměřených průměrů částic, zeta potenciálů a změny CAC v jednotlivých systémech; znaménka „✓“/„✗“ označují systémy splňující/nespĺňující podmínky pro hodnoty průměrů částic či zeta potenciálu. Oranžové/modré podbarvení označuje systémy, v nichž došlo ke zvýšení/snížení CAC systému oproti čistému lipidu

Prostředí	Voda						Pufr					
	DPTAP		Lecitin		DPPC + DPTAP		DPTAP		Lecitin		DPPC + DPTAP	
Polyelektrolyt	$d(H)$	ζ	$d(H)$	ζ	$d(H)$	ζ	$d(H)$	ζ	$d(H)$	ζ	$d(H)$	ζ
bez polyel.	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✓
HyA	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
PSSNa	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Alginát	✓	✓✓	✓	✓✓	–	–	–	–	–	–	–	–

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo navrhnout a provést experimenty agregace fosfolipidů v přítomnosti hyaluronanu. Nejprve byla provedena rešerše na téma interakce hyaluronan-fosfolipid a na téma agregace v ekvimolární směsi DPPC a DPTAP.

Poté byly připraveny zásobní roztoky lecitinu různými metodami – TLE, sonifikací a lyofilizací (bez a v přítomnosti pyrenu). Dále byly připraveny koncentrační řady vzorků s různými fluorescenčními sondami, pyrenem, perylenem a DiA, při použití různých zásobních roztoků lecitinu. Na základě naměřených výsledků byly pro další postup vybrány sonifikace jako metoda přípravy zásobního roztoku lipidu/fosfolipidu a pyren jako fluorescenční sonda.

Pomocí fluorescenční spektroskopie byly dále studovány systémy lipid, lipid-HyA a lipid-PSSNa, kde jako lipid byl použit lecitin, DPTAP a ekvimolární směs DPPC a DPTAP, ve vodě a v pufru. V případě DPTAP a lecitinu byly navíc studovány i směsi s alginátem, pouze ve vodě. Byly získány závislosti EmPI/ExPI na koncentraci lipidu a pomocí programu Origin byly získány CAC systémů. Na základě průběhu těchto závislostí jednotlivých systémů byly vybrány vzorky s charakteristickými koncentracemi lipidu a u těchto vzorků byly pomocí DLS proměřeny i velikosti a zeta potenciály.

V případě DPTAP ve vodě došlo po přidání jakéhokoli polyelektrolytu (HyA, PSSNa nebo alginátu) ke snížení CAC na třetinu až pětinu hodnoty CAC samotného DPTAP. V pufru byla naměřena hodnota CAC samotného DPTAP 5krát vyšší než ve vodě při pouze malé změně v průměrech agregátů (nebereme-li v úvahu rozměry částic při CAC DPTAP v pufru přes 1 000 nm, jež mohly být způsobeny přítomností nečistot). V pufru jsou tedy molekuly DPTAP pravděpodobně v těsnějším uspořádání nebo dochází ke změně charakteru agregátů (mohou například vznikat multilamelární útvary). Po přidavku HyA k DPTAP v pufru došlo k mírnému snížení CAC systému, ovšem v systému obsahujícím PSSNa v pufru byl zaznamenán řádový pokles CAC, a to téměř přesně na hodnotu CAC směsi DPTAP a PSSNa ve vodě.

Co se velikostí agregátů týče, obecně dochází po přidavku elektrolytu k DPTAP ve vodě i v pufru k mírnému zvýšení průměrů částic, popřípadě k současnému vzniku částic větších (v řádu stovek nanometrů) i menších (v řádu desítek nanometrů) oproti čistému DPTAP.

U lecitinu dochází pouze k velmi malým změnám v hodnotách CAC, zároveň jsou tyto hodnoty téměř stejné ve vodě i v pufru. Pouze v přítomnosti PSSNa ve vodě i v pufru byl zaznamenán malý nárůst CAC, přibližně na dvojnásobek původní hodnoty, ovšem vezmeme-li v potaz chybovou úsečku směsi lecitinu a PSSNa ve vodě, téměř k žádné změně v CAC nemuselo dojít. Zároveň i změny v naměřených průměrech částic jsou velmi malé, většinou vznikají zároveň agregáty o průměru okolo 500 nm a agregáty menší s průměrem okolo 100 nm.

Ekvimolární směs DPPC a DPTAP vykazuje zcela odlišné chování. V pufru jsou naměřené hodnoty CAC o řád vyšší než ve vodě (v pufru nebyly naměřeny celé Boltzmannovy závislosti a data byla extrapolována), a zároveň dochází ve vodě i v pufru ke znatelnému zvýšení CAC pouze po přidavku HyA. Porovnáním průměrů částic jednotlivých analogických směsí lecitinu a polyelektrolytu ve vodě a v pufru zjistíme, že v pufru vznikají agregáty větší, nikoli však řádově, jejich průměry se liší pouze ve stovkách nanometrů, a vedle nich i agregáty malé, s průměrem do 100 nm. Řádové zvýšení hodnot CAC musí mít tedy důvod

jiný. Pravděpodobně jsou přítomností pufru odstraněny odpudivé interakce mezi jednotlivými molekulami DPTAP a tudíž vznikají i agregáty, kde nedochází k pravidelnému střídání DPPC a DPTAP.

U směsi DPPC, DPTAP a HyA ve vodě dochází se vzrůstající koncentrací směsi lipidů k poklesu absolutní hodnoty zeta potenciálu a po CAC systému také ke zmenšení agregátů, v tomto systému nastává pravděpodobně změna uspořádání při překročení CAC.

Nakonec byly zhodnoceny naměřené hodnoty zeta potenciálů a průměrů agregátů z hlediska aplikace směsí v kosmetických nebo farmaceutických přípravcích. Bylo sledováno, zda se v systému (při CAC nebo koncentraci při druhém zlomu Boltzmannovy závislosti) vyskytují částice s průměrem do 200 nm a zda jsou absolutní hodnoty zeta potenciálů vyšší než 25 mV.

Bylo zjištěno, že obě tyto podmínky splňují téměř všechny studované směsi ve vodě kromě lecitinu bez přidaného polyelektrolytu a směsi DPPC, DPTAP a hyaluronanu, a skoro žádná směs v pufru, výjimkou jsou DPTAP s PSSNa a směs DPPC, DPTAP a PSSNa. V pufru nebyla většinou splněna podmínka stability, tedy absolutní hodnota zeta potenciálu byla nižší než 25 mV. Na základě měření zeta potenciálů zásobních roztoků polyelektrolytů se můžeme domnívat, že nízké absolutní hodnoty zeta potenciálů směsí v pufru jsou způsobeny tím, že samotné roztoky polyelektrolytů v pufru mají velmi nízkou stabilitu (naměřené hodnoty zeta potenciálů).

Pro použití v kosmetických či farmaceutických přípravcích by měly být vlastnosti studovaných systémů optimalizovány. Například by měla být sjednocena velikost částic, například použitím extrudéru.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Práce poskytla informace o interakci hyaluronanu s fosfolipidem, tyto interakce byly porovnány jednak záměnou fosfolipidu za kationaktivní DPTAP či směs DPTAP s fosfolipidem DPPC, tak i záměnou polyelektrolytu, kde byl využit vedle hyaluronanu i polystyrenulfonát sodný a alginát sodný.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Fysiologicky významné lipidy*. Harperova biochemie. 23. vyd. Jinočany: H+H, 2002. s. 148–160. ISBN 80-7319-013-3.
- [2] Junglas, M., Danner, B., Bayerl, T. M.: Molecular Order Parameter Profiles and Diffusion Coefficients of Cationic Lipid Bilayers on a Solid Support. *Langmuir*, 2003, č. 19, s. 1914–1917.
- [3] Whitehurst, R. J.: Introduction to lecithin and phospholipids. In *Emulsifiers in food technology*. 1. vyd. Cornwell: Blacwell Publishing, 2004. s. 1–4. ISBN 1-4051-1802-48.
- [4] Kumar, R., Katare, O. P.: Lecitin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *AAPS PharmSciTech*, 2005, č. 40, s. 298–310.
- [5] Whitehurst, R. J.: Physico-chemical aspects of lecithin. In *Emulsifiers in food technology*. 1. vyd. Cornwell: Blacwell Publishing, 2004. s. 14–17. ISBN 1-4051-1802-48.
- [6] Palacios, L. E., Wnag, T.: *Egg-yolk lecithin fractionation and characterization* [online]. Ames (Iowa): Iowa state university: Center for Crops Utilization Research: Department of Food Science and Human Nutrition, listopad 2005 [cit. 2012-12-21]. Dostupné z: <http://www.iowaegg.org/uploads/File/ResearchProjects3/160159_YolkLeciCharact.pdf>.
- [7] Soppimath, K. S.: What are liposomes?. *NanoPharmaceuticals* [online]. 2006, [cit. 2012-12-22]. Dostupné z: <<http://www.nanopharmaceuticals.org/Liposomes.html>>.
- [8] 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.
- [9] Bergstrand, N.: *Liposomes for Drug Delivery*. Uppsala University (Sweden), 2003. 71 s. ISSN 1104-232X, ISBN 91-554-5592-1.
- [10] Deamer, D. W.: From „Banghasomes“ to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010. *The FASEB Journal* [online]. 2010, poslední revize březen 2010 [cit. 2012-12-22]. Dostupné z: <<http://www.fasebj.org/content/24/5/1308.full>>.
- [11] Sharma Vijay, K., Mishra, D. N., Sharma, A. K., Srivastava, B.: Liposomes: Present Prospective and Future Challenges. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2010, č. 1, 16 s. ISSN: 0976 822X.
- [12] Zhang, J., Li, X., Li, X.: Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies. *Progress in Polymer Science*, 2012, č. 37, s. 1130–1176.
- [13] Tanford, C.: Theory of micelle formation in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 1974, č. 78, s. 2469–2479.
- [14] Israelachvili, J. N., Mitchel, D. J., Ninham, B. W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, 1976, č. 72, s. 1525–1568.
- [15] Troutier, A.-L., Véron, L., Delair, T., Pichot, Ch., Ladavière, C.: New insights into self-organization of a model lipid mixture and quantification of its adsorption on spherical polymer particles. *Langmuir*, 2005, č. 21, s. 9901–9910.
- [16] Lasch, J., Weissig V., Brandl, M.: Preparation of liposomes. In *Liposomes*. 2. vyd. New York: Oxford University Press, 2003. 3–30 s. ISBN 0-19-963655-9.
- [17] Blume, G.: Flexible Liposomes for topical applications in cosmetics. *Skin Delivery Systems*, 2008, Allured Publishing Corporation USA, s. 269–282.

- [18] Arndt, T.: *Liposomy* [online]. 2009, poslední revize 29.9.2009 [cit. 2012-12-28]. Dostupné z: <<http://www.celostnimedicina.cz/liposomy.htm>>.
- [19] Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, č. 8, s. 397–411.
- [20] Meyer, K., Palmer, J. W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 1934, č. 107, s. 629–634.
- [21] Kakehi, K., Kinoshita, M., Yasueda, S.: Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*, 2003, č. 797, s. 347–355.
- [22] Hascall, V. C., Laurent, T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 1997, poslední revize 15.12.1997 [citováno 2013-02-10]. Dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [23] Scott, J. E.: Secondary structures of hyaluronan: chemical and biological implications. *The Biology of hyaluronan*, Ciba Foundation Symposium, 1989, č. 143, s. 6–20.
- [24] Scott, J. E.: *Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences* [online]. Poslední revize 15.3.1998 [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>>.
- [25] Stern, R.: *Hyaluronan in Cancer Biology*. 1. vyd. Oxford: Elsevier, 2009. 426 s. ISBN: 978-0-12-374178-3.
- [26] Hargittai, I., Hargittai, M.: Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural chemistry*, 2008, č. 19, s. 697–717.
- [27] Andres-Santos, A. I., Velasco-Martin, A., Hernández-Velasco, E., Martín-Gil, J., Martín-Gil, F. J.: Thermal behaviour of aqueous solutions of sodium hyaluronate from different commercial sources. *Thermochimica Acta*, 1994, č. 242, s. 153–160.
- [28] Laurent, T. C.: *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. London: Portland Press, 1998. 341 s. ISBN: 1855781190 / 1-85578-119-0.
- [29] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, č. 29, s. 17–25.
- [30] Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., Kimata, K.: Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, č. 274, s. 25085–25092.
- [31] Price, R. D., Berry, MG, Navsaria, H. A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, č. 60, s. 1110–1119.
- [32] Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R. V., Wainwright, N., Childs, A., Miller, R. J.: Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidermicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules*, 2004, č. 5, s. 2122–2127.
- [33] Yu-Jin, J., Termsarasab U., Daek-Duk, K.: Hyaluronic acid in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2010, č. 40, s. 33–43.
- [34] Hyun, J. K., Kab, K. K., Il, K. P., Baek, S. Ch., Jae, H. K., Moon, S. K.: Hybrid scaffolds composed of hyaluronic acid and collagen for cartilage regeneration. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012, č. 9, s. 57–62.

- [35] Bombeli, T.: *Hyaluronic Acid: The Ultimate Skin Hydrating Agent* [online]. [citováno 2013-02-12]. Dostupné z: <<http://www.makingcosmetics.com/articles/17-hyaluronic-acid-hydrating-agent.pdf>>.
- [36] Amiel, C., Galant, C., Auvray, L.: Ternary complexes involving a β -cyclodextrin polymer, a cationic surfactant and anionic polymer. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 2004, č. 126, s. 44–46.
- [37] Surhone, L. M., Tennoe, M. T., Henssonow, S. F.: *Sodium polystyrene sulfonate*. VDM Publishing, 2010, 104 s. ISBN: 613297878X, 9786132978783.
- [38] MayoClinic.com: *Sodium Polystyrene Sulfonate (Oral Route)* [online]. 2011, poslední revize 1.11.2011 [citováno 2013-02-12]. Dostupné z: <<http://www.mayoclinic.com/health/drug-information/DR603111>>.
- [39] RxList: *Kionex* [online]. 2007, poslední revize 10.8.2007 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <<http://www.rxlist.com/kionex-drug.html>>.
- [40] Sabra, W., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D.: Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, č. 56, s. 315–325.
- [41] Remminghorst, U., Rehm, B. H. A.: Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 2006, č. 28, s. 1701–1712.
- [42] Chaplin, M.: *Alginate* [online]. 2012, poslední revize 10.5.2012 [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>>.
- [43] FAO Food and Nutrition Papers: *Sodium alginate* [online]. 1997, [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: <<http://www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e0x.htm>>.
- [44] Hay, I. D., Rehman, Z. U., Ghafoor, A., Rehm, B. H. A.: Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, č. 85, s. 752–759.
- [45] Rehm, B. H. A.: Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Applied and Industrial Microbiology*, 2010, 14 s.
- [46] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. vyd. Baltimore: Springer, 2006. 954 s. ISBN: 978-0387-31278-1.
- [47] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley–VCH Verlag GmbH, 2001. 381 s. ISBN: 3-527-60024-8.
- [48] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2003, poslední revize červenec 2009 [cit. 2013-03-09]. Dostupné z: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>>.
- [49] PerkinElmer Ltd: *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. Beaconsfield, 2000, 36 s.
- [50] Invitrogen, life technologies: *Tracers for Membrane Labeling* [online]. 2013, [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Fluorescent-Tracers-of-Cell-Morphology-and-Fluid-Flow/Tracers-for-Membrane-Labeling.html>>.
- [51] Donaldson, D. M., Robertson, J. M., White, J. G.: The crystal and molecular structure of perylene. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 1953, č. 220, s. 311–321.
- [52] NCBI: *Perylene – compound summary* [online]. [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=9142#x395>>.
- [53] Sigma-Aldrich: *Perylene* [online]. 2013 [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/394475?lang=en®ion=CZ>>.

- [54] Malvern: *Dynamic Light Scattering (DLS)* [online]. 2013, [cit. 2013-02-27]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm>.
- [55] Malvern Instruments Ltd.: *Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes*. Worcestershire, 2007, 8 s.
- [56] Malvern Instruments Ltd.: *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. Worcestershire, 2007, vyd. 3.0, 191 s.
- [57] Malvern Instruments Ltd.: *Zetasizer Nano Series: User Manual*. Worcestershire, 2004, 288 s.
- [58] Weiner, B. B., Tscharnuter, W. W., Fairhurst, D.: Zeta Potential: A New Approach. At *Canadian Mineral Analysts Meeting 1993, Winnipeg, 8. – 12. of September*.
- [59] Colloidal dynamics Ltd: *The Zeta Potential* [online]. 1999, [cit. 26. 2. 2013]. Dostupné z: <<http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>>.
- [60] Forsey, R. W., Fisher, J., Thompson, J., Stone, M. H., Bell, C., Ingham, E.: The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*, 2006, č. 27, s. 4581–4590.
- [61] Crescenzi, V., Taglienti, A., Pasquali-Ronchetti, I.: Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study. *Colloids and Surfaces A*, 2004, č. 245, s. 133–135.
- [62] Quemeneur, F., Rinaudo, M., Pépin-Donat, B.: Influence of polyelectrolyte chemical structure on their interaction with lipid membrane of zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules*, 2008, č. 9, s. 2237–2243.
- [63] Mulligan, K., Jakubek, Z. J., Johnston, L. J.: Supported lipid bilayers on biocompatible polysaccharide multilayers. *Langmuir*, 2011, č. 27, s. 14352–14359.
- [64] 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*, 2011, č. 27, s. 10886–10893.
- [65] Liu, S., O'Brien, D. F.: Stable polymeric nanoballoons: Lyophilization and rehydration of cross-linked liposomes. *Journal of American Chemical Society*, 2002, č. 124, s. 6037–6042.
- [66] Regelin, A. E., Fankhaenel, S., Gürtesch, L., Prinz, C., Kiedrowski, G., Massing, U.: Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, č. 1464, s. 151–164.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická agregační koncentrace
M	mol dm^{-3}
mM	mmol dm^{-3}
nm	nanometr
P	„packing parametr“
SUV	small unilamellar vesicles (malé unilamelární vezikuly)
LUV	large unilamellar vesicles (rozsáhlé unilamelární vezikuly)
MLV	multilamellar large vesicles (rozsáhlé multilamelární vezikuly)
FRV	freeze-drying rehydration vesicles (sublimační rehydratované vezikuly)
UV	ultrafialové
HAS	syntáza kyseliny hyaluronové
DNA	deoxyribonukleová kyselina
S_0	základní stav molekuly
S_x	excitovaný singletový stav molekuly
T_x	excitovaný tripletový stav molekuly
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
DiA	4-(4-dipentadecylaminostyryl)-N-metylpyridinium jodid
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
DLS	dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
QELS	quasi elastic light scattering (kvazi elastický rozptyl světla)
$d(H)$	hydrodynamický průměr
mV	milivolt
HyA	hyaluronan
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
AFM	atomic force microscopy (mikroskopie atomových sil)
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching (obnovení fluorescence po fotovybělení)
DPTAP	dipalmitoyl trimetylamonium propan
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamonium metylsulfát
BAM	Brewster angle microscopy (Brewsterova úhlová mikroskopie)
GIXD	grazing incidence diffraction (metoda plochého dopadu RTG záření)
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická resonance)
DSC	differential scanning calorimetry (diferenční skenovací kalorimetrie)
DOPE	1,2-di-[cis-9-octadecenoyl]- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoetanolamin
PSSNa	polystyrensulfonát sodný
TLE	thin layer evaporation

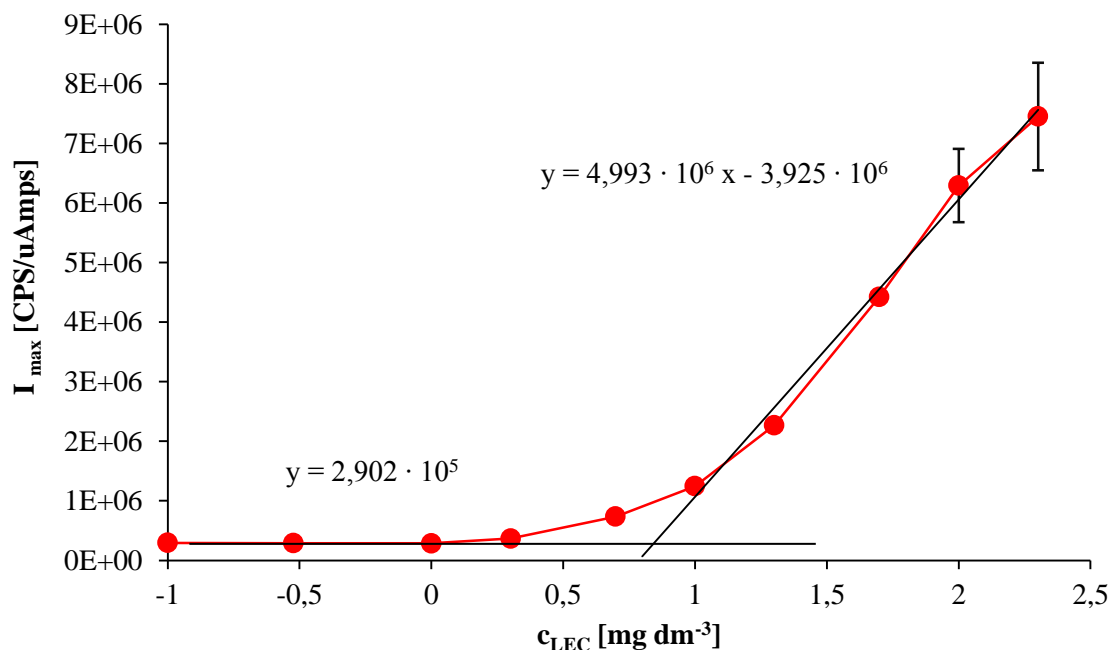
9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Ukázka proložení závislosti dvěma přímkami a parametry přímek, jimiž byly závislosti proloženy proložení

Příloha 2: Parametry Boltzmannových závislostí

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1



Obr. 35 Ukázka proložení závislosti intenzity fluorescence DiA na logaritmu koncentrace lecitinu dvěma přímkami

Tab. 24. Parametry přímek, jimiž byly proloženy závislosti intenzity fluorescence DiA (či totální integrály emisních skenů perylenu) na logaritmu koncentrace lecitinu

Sonda	Metoda	Konstantní část	Vzrůstající část	R^2	Průsečík (x)	CAC [mg dm^{-3}]
DiA	TLE 100 nm	$y = 2,902 \cdot 10^5$	$y = 4,993 \cdot 10^6 x - 3,925 \cdot 10^6$	0,9931	0,844	6,99
Perylen	TLE 100 nm	$y = 5,161 \cdot 10^6$	$y = 3,702 \cdot 10^8 x - 3,548 \cdot 10^8$	0,9991	0,972	9,38
DiA	Sonifikace	$y = 6,484 \cdot 10^4$	$y = 9,352 \cdot 10^6 x - 8,086 \cdot 10^6$	0,9982	0,872	7,44
Perylen	Sonifikace	$y = 1,965 \cdot 10^6$	$y = 3,156 \cdot 10^8 x - 3,252 \cdot 10^8$	0,9975	1,037	10,88

10.2 Příloha 2

Tab. 25. Parametry fitů pyrenových dat

Lipid/prostředí		DPTAP/voda [g dm ⁻³]				DPTAP/pufr [g dm ⁻³]		
PI	Parametr fitu	bez polyelekt.	HyA	PSSNa	Alginát	bez polyelekt.	HyA	PSSNa
EmPI	x_0	54,48	9,34	14,31	12,81	290,64	231,38	10,38
	Δx	1,48	1,77	1,80	1,75	1,41	1,60	2,98
	A_1	1,77 ± 0,02	1,79 ± 0,03	1,35 ± 0,01	1,75 ± 0,01	1,76 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,23 ± 0,01
	A_2	1,07 ± 0,03	1,21 ± 0,01	1,12 ± 0,01	1,21 ± 0,01	1,09 ± 0,04	1,03 ± 0,03	1,03 ± 0,02
	R^2	0,9780	0,9851	0,9876	0,9953	0,9916	0,9957	0,9754
ExPI	x_0	40,25	6,89	18,43	9,10	222,46	180,37	20,39
	Δx	1,71	1,87	2,38	1,90	1,48	1,55	2,24
	A_1	2,75 ± 0,08	2,65 ± 0,06	1,20 ± 0,01	3,51 ± 0,09	2,68 ± 0,01	2,60 ± 0,02	1,09 ± 0,01
	A_2	0,61 ± 0,10	0,65 ± 0,02	0,55 ± 0,01	0,83 ± 0,12	0,59 ± 0,05	0,58 ± 0,07	0,65 ± 0,01
	R^2	0,9724	0,9957	0,9983	0,9974	0,9979	0,9946	0,9946
Lipid/prostředí		Lecitin/voda [mg dm ⁻³]				Lecitin/pufr [mg dm ⁻³]		
PI	Parametr fitu	bez polyelekt.	HyA	PSSNa	Alginát	bez polyelekt.	HyA	PSSNa
EmPI	x_0	7,88	9,01	11,86	11,42	10,81	10,14	14,17
	Δx	2,11	2,00	3,42	1,94	1,70	1,88	2,16
	A_1	1,75 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,28 ± 0,01	1,76 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,78 ± 0,01	1,26 ± 0,01
	A_2	1,07 ± 0,01	1,07 ± 0,05	0,97 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,08 ± 0,01	1,02 ± 0,01
	R^2	0,9985	0,9985	0,9848	0,9985	0,9976	0,9969	0,9914
ExPI	x_0	4,80	6,40	22,10	8,84	7,60	7,07	18,09
	Δx	2,22	2,02	2,23	2,02	1,69	1,93	2,19
	A_1	2,68 ± 0,01	2,53 ± 0,01	1,21 ± 0,01	3,64 ± 0,03	2,62 ± 0,02	2,48 ± 0,01	1,09 ± 0,01
	A_2	0,54 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,56 ± 0,02	0,55 ± 0,01	0,70 ± 0,01
	R^2	0,9997	0,9994	0,9946	0,9979	0,9982	0,9997	0,9955
Lipid/prostředí		DPTAP + DPPC/voda [mM]				DPTAP + DPPC/pufr [mM] *		
PI	Parametr fitu	bez polyelekt.	HyA	PSSNa	–	bez polyelekt.	HyA	PSSNa
EmPI	x_0	0,06	0,11	0,05	–	0,66	1,31	–
	Δx	2,19	1,64	1,86	–	2,66	1,73	–
	A_1	1,79 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,35 ± 0,01	–	1,78 ± 0,01	1,78 ± 0,01	–
	A_2	1,09 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,06 ± 0,03	–	1,10 ± 0,02	1,19 ± 0,01	–
	R^2	0,9971	0,9927	0,9831	–	0,9905	0,9926	–
ExPI	x_0	0,0343	0,0940	0,0368	–	0,5658	1,4042	0,2463
	Δx	2,19	1,79	2,06	–	2,35	1,73	2,28
	A_1	2,74 ± 0,03	2,61 ± 0,02	1,18 ± 0,01	–	2,54 ± 0,01	2,57 ± 0,01	1,03 ± 0,01
	A_2	0,54 ± 0,03	0,61 ± 0,04	0,78 ± 0,01	–	0,56 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,78 ± 0,01
	R^2	0,9981	0,9971	0,9911	–	0,9990	0,9968	0,9915