



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM INTERAKCE ZÁPORNĚ NABITÝCH
VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ S POLYKATIONTY**

STUDY OF INTERACTION OF NEGATIVELY CHARGED VESICULAR SYSTEMS WITH POLYCATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Romana Repová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1410/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Romana Repová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium interakce záporně nabitých vezikulárních systémů s polykationty

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na stabilizaci kataniontových vezikulárních systémů pomocí přídatku záporných amfifilních látek a jejich možnou interakci s polykationty.
2. Na základě rešerše zvolit vhodné záporné amfifilní látky pro stabilizaci kataniontových systémů. Zvolit dostupné polykationty vhodné pro interakci s takto stabilizovanými systémy.
3. Příprava a charakterizace záporně nabitých kataniontových vezikul a studium jejich interakce s vybranými polykationty pomocí vhodné instrumentální techniky.
4. Na základě experimentů a rešerše zhodnotit potenciální využitelnost daného systému pro farmaceutické aplikace.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Romana Repová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá prípravou a charakterizáciou záporne nabitých kataniónových vezikulárnych systémov a ich následnou interakciou s vybranými polykatiónmi. Kataniónový vezikulárny systém bol pripravený z opačne nabitých povrchovo aktívnych látok SDS a CTAB. Záporný náboj a zároveň aj stabilita vezikúl bola zabezpečená pomocou zakomponovania kyseliny fosfatidovej. Polykatióny DEAE a TMC boli vybrané za účelom uplatnenia vo farmaceutických aplikáciách. Charakterizácia pripravených systémov bola uskutočnená pomocou merania DLS a ELS. Výsledky poukazujú na to, že sa nám podarilo pripraviť stabilné záporne nabité vezikuly, ktoré dokázali nekovalentne interagovať s vybranými polykatiónmi.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the preparation and characterization of negatively charged cationic vesicular systems and their combination with selected polycations. The cationic vesicular system was prepared by mixing of two oppositely charged surfactants SDS and CTAB. The negative charge as well as the stability of the vesicular system was provided by the incorporation of phosphatidic acid. Polycations, DEAE and TMC, have been selected for use in a pharmaceutical applications. Characterization of the prepared systems was performed by measuring DLS and ELS. The results indicate that we were able to prepare stable negatively charged vesicles that were eligible to non-covalently interact with selected polycations.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Cetyltrimetylamónium bromid (CTAB), dodecylsírán sodný (SDS), cholesterol, kyselina fosfatidová (PA), kataniónový vezikulárny systém, dextrán hydrochlorid (DEAE), trimetylchitosan (TMC), dynamický rozptyl svetla, elektroforetický rozptyl svetla

KEYWORDS

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulphate (SDS), cholesterol, phosphatidic acid (PA), cationic vesicular system, dextran hydrochloride (DEAE), trimethylchitosan (TMC), dynamic light scattering, electrophoretic light scattering

REPOVÁ, Romana. *Studium interakce záporně nabitých vezikulárních systémů s polykationty* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123798>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Chcela by som sa veľmi pekne poďakovať všetkým ľuďom, ktorí mi svojou odbornou pomocou alebo podporou pomohli pri tvorbe tejto diplomovej práce. Doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. by som chcela vyjadriť vďaku za možnosť pracovať v jeho tíme, za jeho cenný čas a odborné rady venované pri riešení tejto práce. Veľké ďakujem patrí Ing. Jane Szabovej, ktorá bola počas merania a písania diplomovej práce mojou podporou, pomocnou rukou s veľkou dávkou trpezlivosti a v neposlednom rade aj za jej čas a nadobudnuté skúsenosti, ktoré mi ochotne venovala. Obrovské ďakujem patrí mojej rodine, partnerovi a priateľom za ich veľkú podporu a povzbudenie nielen počas písania tejto diplomovej práce, ale aj počas celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Tenzidy	8
2.1.1	Dodecylsírán sodný (SDS)	9
2.1.2	Cetyltrimetylamónium bromid (CTAB)	9
2.2	Asociatívne koloidy	10
2.2.1	Krafftova teplota	11
2.2.2	Kritická micelárna koncentrácia	11
2.2.3	Kritický zbaľovací parameter	13
2.3	Vezikulárne systémy	14
2.3.1	Kataniónové vezikulárne systémy	15
2.4	Polyelektrolyty	19
2.4.1	Dextrán	20
2.4.2	N, N, N – Trimetylchitosan (TMC)	21
2.5	Interakcia záporne nabitých kataniónových vezikulárnych systémov s polykatiónmi	22
2.6	Dynamický rozptyl svetla	23
2.6.1	Veľkosť častíc.....	23
2.6.2	Zeta potenciál.....	24
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	26
3.1	Zvýšenie stability kataniónových vezikulárnych systémov pomocou prídavku cholesterolu	26
3.2	Zvýšenie stability vezikúl pridaním záporne nabitých látok	27
3.3	Vezikulárne systémy v interakcii s polymérmi	28
3.3.1	Kataniónové vezikulárne systémy v interakcii s polykatiónmi	28
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	36
4.1	Chemikálie	36
4.2	Príprava vzoriek	37
4.2.1	Príprava IPA	37
4.2.2	Príprava kataniónového vezikulárneho systému	38
4.2.3	Interakcia záporne nabitého kataniónového vezikulárneho systému s polykatiónmi.....	39
4.3	Meranie pripravených vzoriek a spracovanie výsledkov	39

5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	40
5.1	Kataniónový vezikulárny systém CTA-DS s 43 mol. % prídavkom cholesterolu	40
5.1.1	Kataniónový vezikulárny systém CTA-DS s 43 mol. % prídavkom cholesterolu a rôznymi molárnymi prídavkami kyseliny fosfatidovej	40
5.2	Interakcia záporného kataniónového vezikulárneho systému s DEAE/TMC ...	42
5.2.1	Interakcia s DEAE	42
5.2.2	Interakcia s TMC	48
6	ZÁVER.....	56
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	58
8	ZOZNAM SKRATIEK A POUŽITÝCH SYMBOLOV	68
8.1	Skratky	68
8.2	Symboly	68
9	PRÍLOHY	69

1 ÚVOD

V oblasti medicíny sa stále viac a viac upriamuje pozornosť na oblasť nanotechnológie, a tým rastie záujem o výskum v tejto oblasti. Nanotechnológie zahŕňajú výskum štruktúr s novými vlastnosťami, nástrojov a systémov schopných kontrolovať a pôsobiť na úrovni atómov. Táto oblasť výskumu spája chémiu, biológiu, fyzikálne inžinierstvo a taktiež aj klinickú medicínu. Jedným z dôležitých systémov sú nosiče liečiv. Tento systém dokáže distribuovať liečivo v tele pacienta so zacielením na požadovanú oblasť. Veľkou výhodou týchto systémov je aj postupné uvoľňovanie enkapsulovaných liečiv. Tento štýl dodávania liečiv je veľmi dôležitý pri vážnejších ochoreniach, kedy dokáže zamedziť mnohým negatívnym účinkom. Za najznámejšie a prvé objavené nanočastice sa považujú lipozómy. V súčasnosti sa výskum upriamuje na ich možné alternatívy, ktoré sú lacnejšie, stabilnejšie a menej náchylné na degradáciu. A tak sa výskum zameriava na vezikulárne systémy pripravované z bežne dostupných a lacných povrchovo aktívnych látok.

Štúdiou takýchto vezikulárnych systémov pripravených z opačne nabitých povrchovo aktívnych látok sa zaoberajú na Taiwanskej National Cheng Kung univerzite. Skúmajú kladne nabitú katiónovú vezikulárnu systém. K tejto štúdii sa neskôr pridala aj naša fakulta vďaka znalostiam a výskumom kyseliny hyaluronovej. Cieľom je vytvoriť stabilný a biokompatibilný systém pomocou interakcie kladne nabitého vezikulárneho systému a záporne nabitých kyseliny hyaluronovej. Táto spoločná štúdia prebieha pod grantom č.14-14024J.

Základný systém tejto diplomovej práce bol inšpirovaný prebiehajúcim projektom. Avšak na stabilizáciu systému bola použitá záporne nabitá amfifilná látka, kyselina fosfatidová, ktorá dodáva celkovému vezikulárnemu systému záporný náboj. Kyselina fosfatidová bežne nachádzajúca sa v membránach nášho tela vykazuje veľmi dobré vlastnosti. Po jej začlenení do vezikulárneho systému môže zlepšiť stabilitu systému. Ďalšou stabilizačnou zložkou je cholesterol, ktorý taktiež v kladnej miere ovplyvňuje fluiditu membrány a stabilitu systému.

Na zlepšenie vlastností vezikulárneho systému môže byť použitá povrchová úprava. Pripravený záporne nabitý katiónový vezikulárny systém dokáže interagovať s polykatiómi. Na modifikáciu systému boli použité polykatióny dextran hydrochlorid a trimetylchitosan. Tieto polykatióny majú pozitívne vlastnosti využiteľné pre nosiče liečiv a dokážu kladne ovplyvniť ich následnú cieľnú distribúciu.

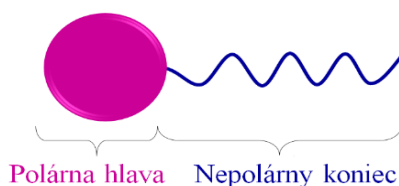
Takto modifikované vezikulárne systémy ponúkajú možnosť enkapsulácie širokej škály látok s odlišnými vlastnosťami a taktiež aj ich adsorpciou na povrch vezikuly. Tieto všetky výhodné vlastnosti vezikulárnych systémov ponúkajú široké uplatnenie v oblasti farmácie a medicíny.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Tenzidy

Tenzidy, inak nazývané povrchovo aktívne látky (PAL), tvoria veľmi významnú časť v priemyselných odvetviach [1]. Ich využitie je veľmi univerzálne, od chemického priemyslu (čistiace a dezinfekčné prostriedky), cez potravinársky priemysel (aditíva zlepšujúce textúru potravín) až po farmaceutickú výrobu (povrchové antiseptikum) [2].

Tenzid je typický svojou amfifilnou štruktúrou pozostávajúcou z dvoch častí, ktorú môžeme vidieť na *obr. 1*. Jedna časť PAL je polárna hlava, ktorá interaguje s polárnym rozpúšťadlom a vytvára silné interakcie. Ak je týmto rozpúšťadlom voda, táto časť sa nazýva hydrofilná (obecne lyofilná) a dokáže vytvárať silné interakcie. Druhá nepolárna časť pozostáva z uhlíkovodíkového reťazca. Označuje sa taktiež ako hydrofóbna (v prípade, že je rozpúšťadlom voda, obecne lyofóbna) alebo lipofilná časť, kedy dokáže vytvárať interakcie s nepolárnymi rozpúšťadlami (olej) [3]. Medzi hlavné vlastnosti PAL patrí znižovanie povrchového napätia a medzifázovej energie na fázovom rozhraní systému, čo dokáže vďaka svojej štruktúre, a na povrchu sa hromadí už pri nízkych koncentráciách. Následne pri prekročení určitej koncentrácie (kritická micelárna koncentrácia, ktorá bude ďalej vysvetlená v kapitole 2.2.2) dochádza k asociácii molekúl a tvorbe koloidných častíc. Je to spôsobené tým, že jedna časť molekuly zabezpečí značnú rozpustnosť vďaka svojej afinite k rozpúšťadlu a druhá časť tenzidu je v tomto rozpúšťadle nerozpustná [4].



Obr. 1 *Obecná schéma štruktúry tenzidu*

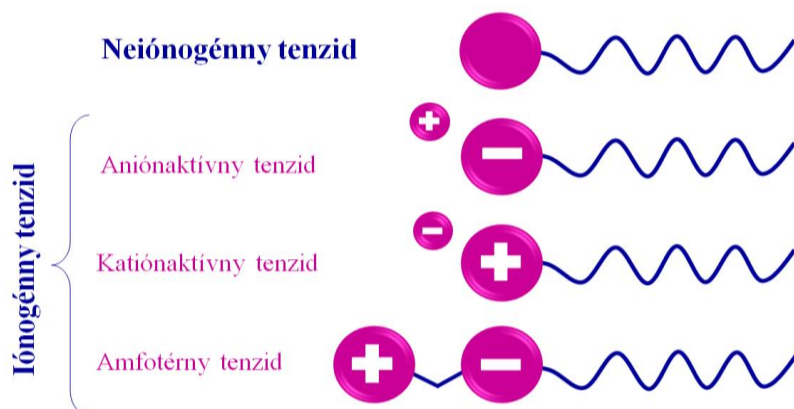
Tenzidy rozdeľujeme podľa charakteru polárnej časti na ionogénne a neionogénne (viď *obr. 2*). Do skupiny ionogénnych tenzidov, ktoré podliehajú disociácii patria kationaktívne, aniónaktívne a amfoterné PAL. Neionogénne tenzidy v rozpúšťadle nevytvárajú ióny [5].

Aniónaktívne tenzidy po disociácii vytvárajú povrchovo aktívne anióny. Ich aktivita je výraznejšia v mierne alkalickom prostredí, v kyslom prostredí sú nestále [6]. Hlavným predstaviteľom sú alkalické soli vyšších mastných kyselín (mydlá), alkylsulfáty (dodecylsulfát sodný) a alkylbenzénsulfonáty (tetrapropylénbenzén sulfonát) [7].

Kationaktívne tenzidy vytvárajú v rozpúšťadle kladne nabité ióny. Sú to väčšinou kvartérne amóniové zlúčeniny. Kationaktívne tenzidy majú antistatické, antibakteriálne, germicídne a niektoré z nich aj antiseptické vlastnosti (Ajatin, Septonex) [8].

Amfotérne tenzidy majú ako kladný, tak aj záporný náboj. Výsledný náboj asociatívneho koloidu v tomto prípade závisí na pH rozpúšťadla. Patria sem prírodné látky ako napríklad fosfatidylcholíny, fosfatidylseríny a sfingomyelíny [8].

Neionogénne tenzidy nenesú náboj. Nepodliehajú elektrolytickej disociácii, pretože nemajú výrazne lokalizovaný náboj v porovnaní s ionogénnymi PAL. Skladajú sa z dlhého uhl'ovodíkového reťazca s polárnymi ale neionogénnymi skupinami na jeho konci. Tieto skupiny zabezpečujú rozpustnosť týchto PAL v rozpúšťadle. Jedná sa o estery alebo étery polyetylénglykolu, vyššie alkoholy a monoacylglyceroly [8; 7].

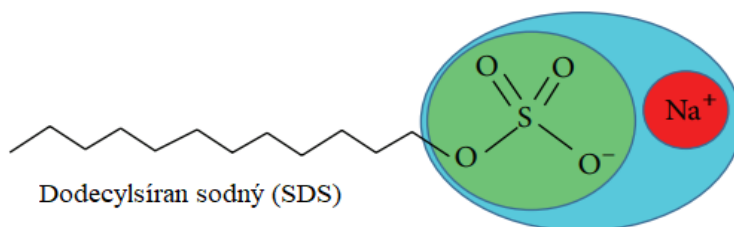


Obr. 2 Rozdelenie tenzidov

2.1.1 Dodecylsírán sodný (SDS)

Dodecylsírán sodný je aniónaktívny tenzid, chemicky sodná soľ organosulfátu. Jeho vzorec je $(C_{12}H_{25})SO_4Na$ a jeho molekulová hmotnosť $288,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Polárna hlava sa skladá zo záporne nabitej sulfátovej skupiny, ktorá vykazuje silné hydrofilné vlastnosti a nepolárny reťazec obsahuje 12 uhlíkov (viď obr. 3) [5]. Kritická micelárna koncentrácia je pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ $0,0081\text{--}0,0084 \text{ mol}\cdot\text{dm}^3$ [9].

Komerčne sa nachádza vo forme bieleho prášku alebo peliet so slabým zápachom. SDS sa najčastejšie používa ako detergent v čistiacich prostriedkoch, šampónoch, kozmetike, zubných pastách. Taktiež sa využíva na rozrušovanie bunkovej membrány pri extrakcii DNA a na denaturáciu bielkovín pri elektroforéze (SDS-PAGE technika) [10]. Ako negatívum sa považuje možnosť spôsobovať podráždenie kože, dýchacích ciest, očí a pokožky. Akútna orálna letálna dávka bola podľa výskumov stanovená na 1 až 2 g na kilogram ľudskej váhy [11].

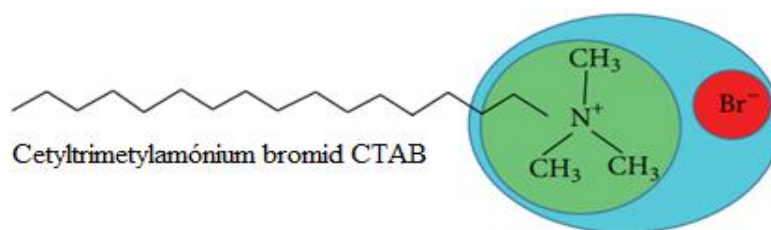


Obr. 3 Štruktúrny vzorec dodecylsíránu sodného [12]

2.1.2 Cetyltrimetylamónium bromid (CTAB)

Cetyltrimetylamónium bromid, inak nazývaný aj hexadecyltrimetylamónium bromid je kationaktívny tenzid. Chemickou štruktúrou patrí do kvartérnych amóniových zlúčenín. Jeho vzorec je $(C_{16}H_{33})N((CH_3)_3Br)$ s molekulovou hmotnosťou $364,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Polárna časť sa

skladá z kladne nabitého dusíka s tromi metylovými skupinami a nepolárny koniec je zložený zo 16 uhlíkov, čo môžeme vidieť na *obr. 4*. Kritická micelárna koncentrácia je pri 25 °C vo vodnom roztoku 0,90–0,98 mmol·dm³ [9].

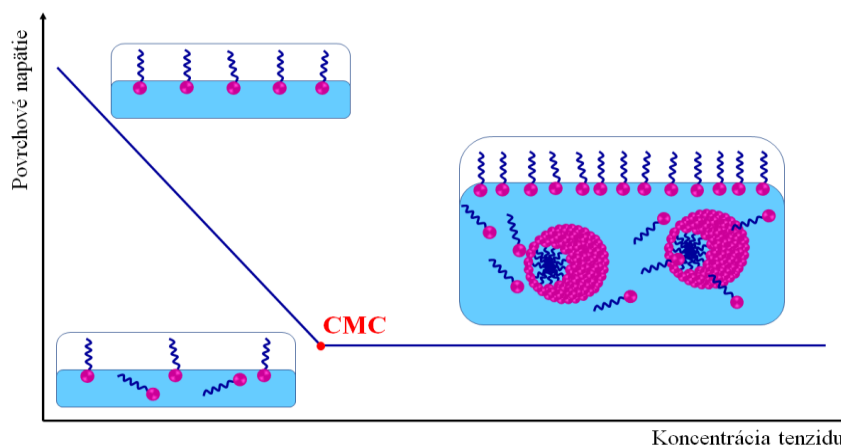


Obr. 4 Štruktúrny vzorec cetyltrimetylamónium bromidu [12]

Nachádza sa vo forme bieleho prášku alebo kryštálov. Vyznačuje sa antiseptickými účinkami proti baktériám a hubám. Jeho uplatnenie nájdeme v kozmetike, pri extrakcii DNA a pri syntéze zlatých nanočastíc. CTAB môže však viesť k podráždeniam. V kozmetickom priemysle sa pri oplachovacích prostriedkoch používa v koncentrácii do 10 % a pri ostatných prostriedkoch sa za bezpečné množstvo považuje koncentrácia do 0,25 %. [13; 14]. Pri extrakcii DNA sa využíva jeho amfifilná štruktúra. Dokáže zachovať celistvosť precipitovanej DNA počas jej izolácie z bunky. Taktiež zabraňuje interakcii DNA s glykoproteínami a polysacharidmi, ktoré sa nachádzajú v bunke, a tak uchováva DNA vo vyššej čistote [15].

2.2 Asociatívne koloidy

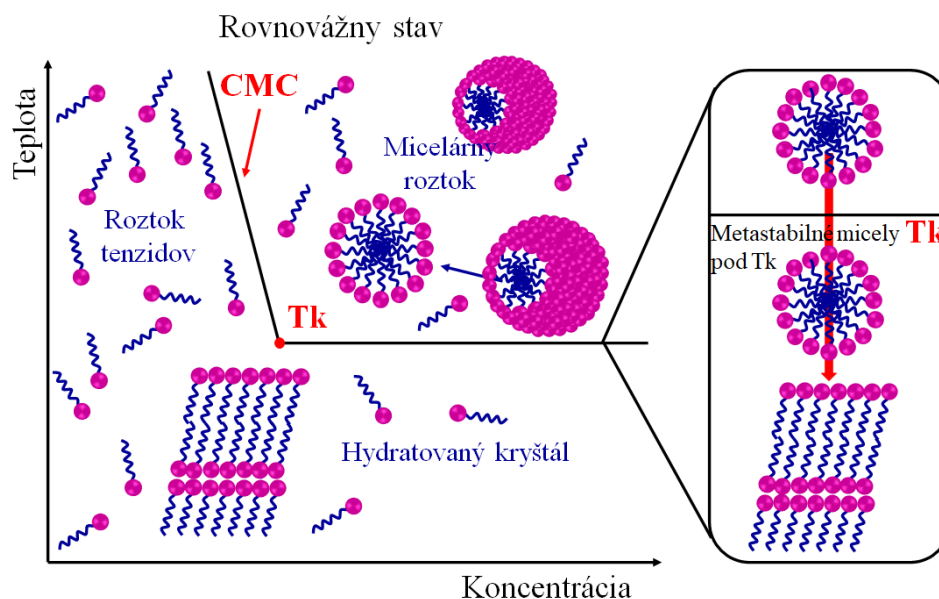
Povrchovo aktívne látky sa vďaka svojej amfifilnej štruktúre dokážu adsorbovať na fázovom rozhraní systému už pri nízkych koncentráciách, kde získajú výhodnejšie energetické podmienky, a tak znižujú medzifázovú energiu a povrchové napätie systému. Čím viac povrchovo aktívnych látok sa nachádza na rozhraní, tým viac je znížené napätie a energia systému. Na tomto rozhraní vytvárajú PAL monomolekulárnu vrstvu. Pri vyššej koncentrácii a nasýtení fázového rozhrania (celý povrch je saturovaný molekulami PAL) už nebude ďalší prídavok PAL znižovať medzifázovú energiu a napätie systému a bude sa zvyšovať koncentrácia voľných molekúl vo vnútri fázy. V tomto bode (bod CMC na *obr. 5*) bude dochádzať k samoorganizácii molekúl PAL do guľovitých agregátov koloidných rozmerov [4].



Obr. 5 Graf znázorňujúci bod zlomu koncentrácie tenzidu [4]

2.2.1 Krafftova teplota

Pri teplote rovnej Krafftovej teplote je koncentrácia nasýteného roztoku rovná CMC. Pod touto teplotou koncentrácia nasýteného roztoku tenzidu je často nižšia ako CMC. Nedokážu sa tvoriť agregáty a v roztoku sa nachádzajú len ióny alebo molekuly, ktoré sú málo rozpustné vo vode vzhľadom k hydrofóbnej väčšine tenzidu. Následne pri tvorbe miciel už T_K rýchlo stúpa. Micely sú rozpustnejšie, pretože sú voči rozpúšťadlu vystavené len hydrofilné skupiny. T_K je ovplyvňovaná dĺžkou hydrofóbneho reťazca [3; 5]. Nad touto teplotou sa hydratované kryštály PAL rozpustia ako micely vo vode [1].



Obr. 6 Fázový diagram roztoku PAL [1]

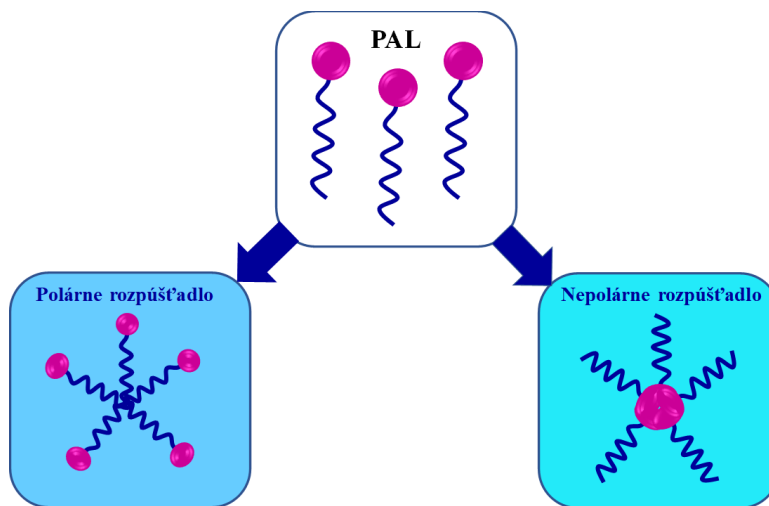
2.2.2 Kritická micelárna koncentrácia

Parameter, ktorý nám určuje správanie tenzidov vo vodnom roztoku sa nazýva kritická micelárna koncentrácia (CMC). Táto koncentrácia sa nachádza v rozmedzí od 10^{-5} do 10^{-3} mol·dm⁻³. Nad touto koncentráciou sa tenzidy spontánne organizujú a vytvárajú agregáty. Významný parameter, ktorý taktiež ovplyvňuje chovanie tenzidov v rozpúšťadle je aj Krafftova teplota T_K (preberané v kapitole 2.2.1) [1].

Podľa toho v akom type rozpúšťadla sa tenzid nachádza, dochádza k rôznym interakciám medzi molekulami PAL a daným rozpúšťadlom (viď obr. 7). V prípade nepolárneho rozpúšťadla povrchovo aktívne látky orientujú svoje nepolárne reťazce smerom k obklopujúcej nepolárnej fáze a polárne časti vytvárajú jadro agregátu. V tomto prípade tak vznikajú reverzné micely.

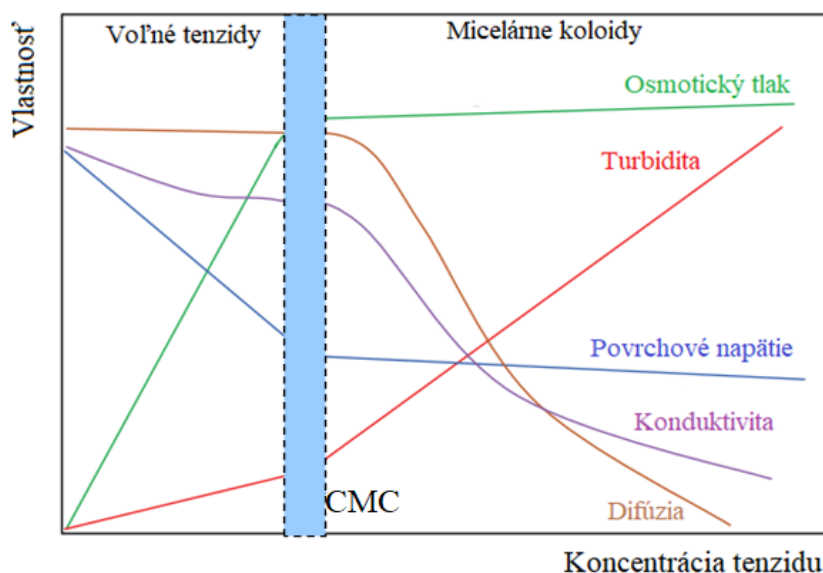
U polárnych rozpúšťadiel sa vytvárajú micely vďaka hydrofóbnemu efektu, kedy chránia svoje nepolárne reťazce pred obklopujúcou vodnou fázou a snažia sa o čo najväčšie obmedzenie kontaktu s rozpúšťadlom. Hydrofóbný účinok je teda termodynamickou hnacou silou. Pri tomto procese je kontakt s vodnou fázou eliminovaný, znižuje sa jej stupeň štruktúrovania a dochádza k zvýšeniu entropie. Nemení sa teda len stav molekúl PAL ale aj stav organizovaného polárneho rozpúšťadla (vody). Zvýšenie entropie spôsobí zmenu

Gibbsovej energie, ktorá je negatívna $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S < 0$. To znamená, že tvorba agregátov je samovoľný dej. V tomto prípade významnejšie prispieva entropická ako entalpická zložka. Čím je dlhší nepolárny chvost, tým je väčší zisk energie a je potrebná nižšia koncentrácia tenzidov na ich spojenie [16].



Obr. 7 Štruktúra micel závislá na rozpúšťadle

Zmena z pravého roztoku tenzidu na koloidné roztoky ovplyvňuje mnohé fyzikálno-chemické vlastnosti povrchovo aktívnych látok, čo môžeme vidieť na obr. 8. Napríklad povrchové napätie sa so zvyšujúcou koncentráciou PAL v roztoku znižuje. Po dosiahnutí bodu CMC sa následne takmer vôbec nemení. Je to spôsobené tým, že pridané PAL sa po prekročení CMC spotrebovávajú na tvorbu micel, ktoré nie sú povrchovo aktívne. Tieto zmeny spôsobuje vznik novej fázy vďaka vytvoreniu micel v systéme rozpúšťadlo – povrchovo aktívna látka [17].



Obr. 8 Fyzikálno-chemické vlastnosti roztokov povrchovo aktívnych látok [12]

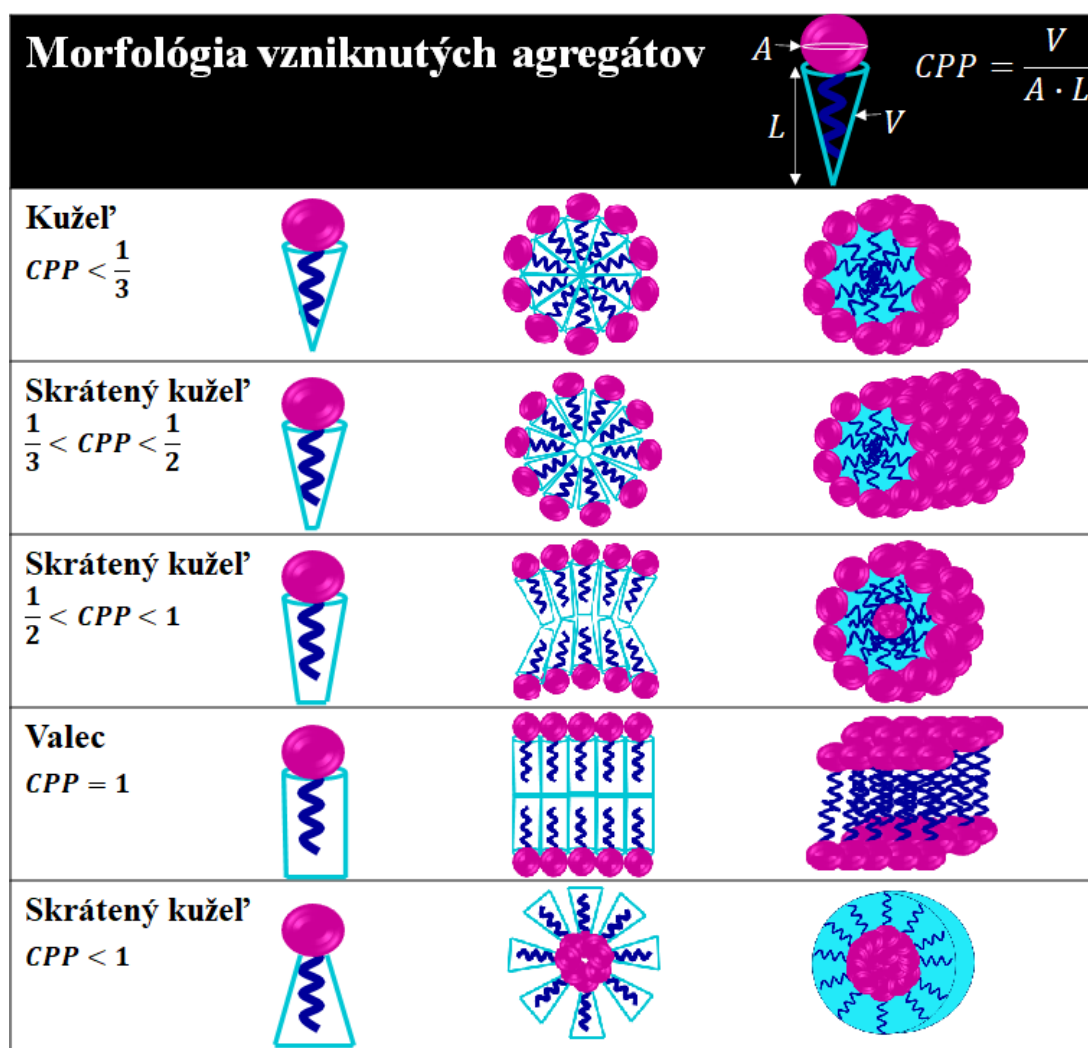
2.2.3 Kritický zbaľovací parameter

Výsledný tvar a veľkosť vzniknutých asociatívnych koloidov závisí na mnohých faktoroch. Veľkú rolu zohráva rozpúšťadlo a jeho vlastnosti ako je teplota, pH, iónová sila. Ďalej záleží aj od samotnej povrchovo aktívnej látky, jej koncentrácie v roztoku a molekulárnej geometrie.

Kritický zbaľovací parameter, ktorý sa odvíja od molekulárnej geometrie daného tenzidu, predpovedá predbežnú štruktúru a výsledný tvar agregátu. Kritický zbaľovací parameter je vyjadrený ako pomer efektívneho objemu hydrofóbnej časti agregátu k dĺžke uhl'ovodíkového reťazca a ploche polárnej časti tenzidu:

$$CPP \equiv \frac{V}{A \cdot L}, \quad (2.1)$$

kde V je efektívny objem, ktorý zaberajú hydrofóbne reťazce v jadre agregátu, L je maximálna účinná dĺžka reťazca a A je účinná plocha povrchu hydrofilnej časti na rozhraní agregát – roztok. S rastúcou hodnotou CPP môže byť štruktúra agregátov sférická, valcovitá až lamelárna, čo môžete vidieť na obr. 9. Pre CPP medzi $\frac{1}{2}$ a 1 sa vytvárajú vezikuly, ktoré zodpovedajú sférickým uzavretým amfifílnym dvojvrstvovým štruktúram s vnútornou dutinou obsahujúcou disperzný roztok [12].

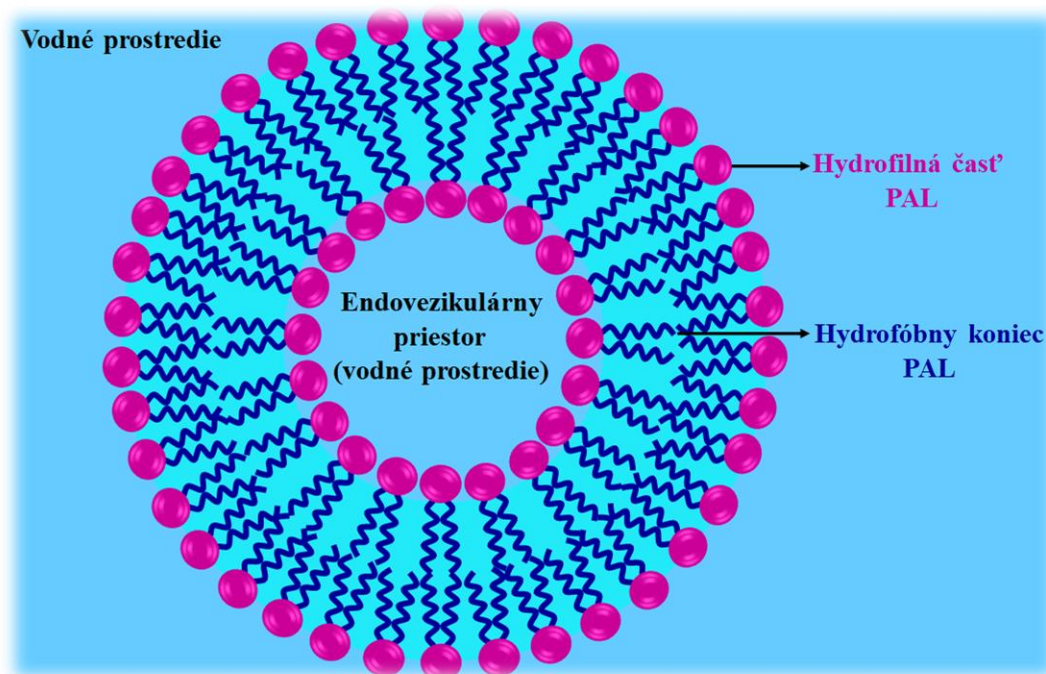


Obr. 9 Morfológia vzniknutých agregátov v závislosti na kritickom zbaľovacom parametri [12]

2.3 Vezikulárne systémy

Vezikuly sú vo všeobecnosti duté sférické koloidné častice. Ich štruktúra sa skladá z dvojvrstvovej membrány tvorenej amfifílnymi povrchovo aktívnymi látkami, lipidmi (kedy hovoríme o lipozómoch) alebo blokovými kopolymérmi (polyetylénglykol, polystyrén). Dvojvrstvová membrána je zakrivená a vytvára obal (vid' obr. 10). Vo vnútri obalu sa nachádza endovezikulárna vodná fáza, ktorú dvojvrstvová membrána oddeľuje od vonkajšieho prostredia. Membrána je situovaná tak, že hydrofilné hlavy sú v styku s vonkajším a endovezikulárnym prostredím. Hydrofóbne konce minimalizujú styk s prostredím a tvoria vnútornú časť membrány [3].

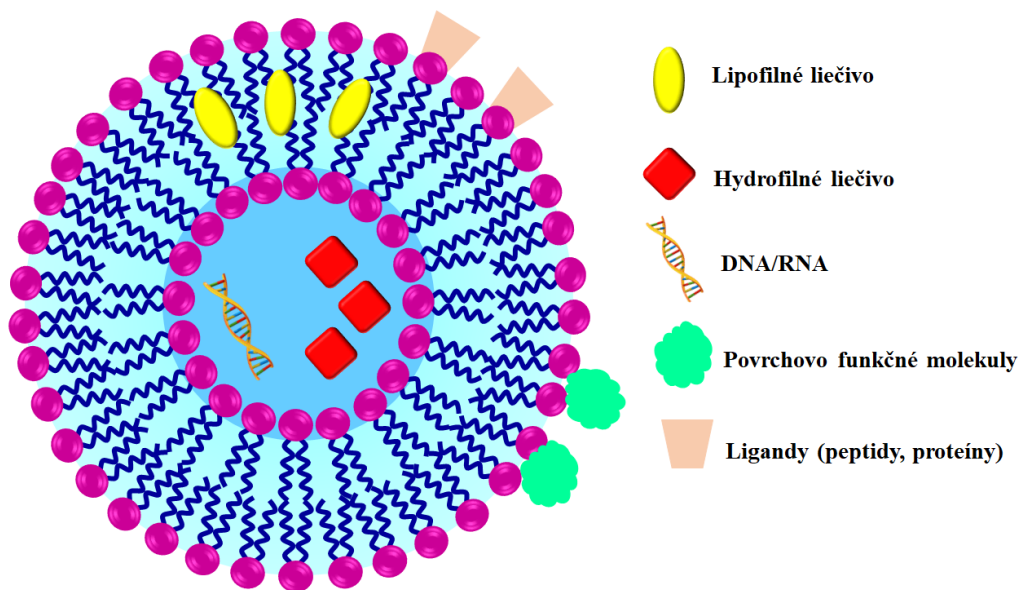
Veľkosť vezikúl sa môže pohybovať od desiatok nanometrov až po stovky mikrometrov. Môžu byť unilamelárne tvorené jednou dvojvrstvovou membránou alebo multilamelárne, s viacerými navrstvenými membránami [3].



Obr. 10 Štruktúra vezikuly [18]

Dizajn vezikuly umožňuje jej rôzne modifikácie. Endovezikulárny priestor ponúka možnosť enkapsulácie hydrofilných látok a taktiež DNA/RNA. Hydrofóbna časť dvojvrstvovej membrány dokáže inkorporovať lipofilné látky. Povrch vezikuly môžeme taktiež funkcionalizovať rôznymi naviazanými molekulami (peptidy, proteíny) [19; 20].

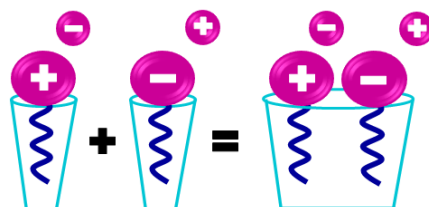
Vezikulárne systémy sú zaujímavé v oblasti výskumu vďaka ich štruktúrálnej podobnosti s bunkami. Ich ďalšie dôležité uplatnenie je ako nástroj pre ciele distribúciu liečiv a riadeného uvoľňovania. Je to vďaka ich schopnosti enkapsulovať požadovanú zlúčeninu s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami (obr. 11). Ďalšou ich veľkou výhodou je, že dokážu danú enkapsulovanú látku chrániť pred okolitými vplyvmi (proteíny) a môžu znižovať toxicitu enkapsulovaných látok (hlavne u cytostatík) [19; 20].



Obr. 11 Vezikulárny systém s možnými funkčnými modifikáciami [21]

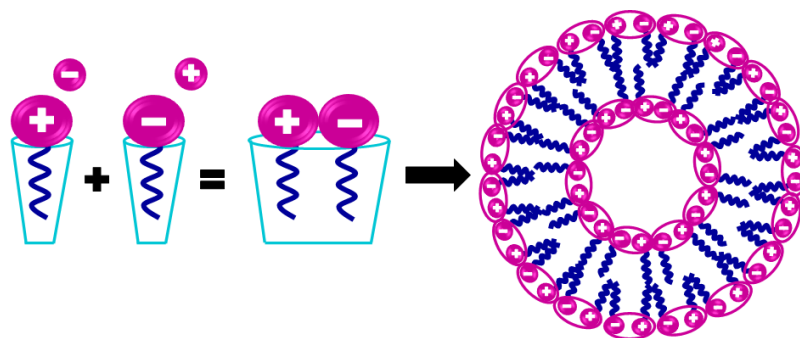
2.3.1 Katiónové vezikulárne systémy

Katiónové vezikulárne systémy patria medzi asociatívne koloidy. Môžu byť unilamelárne alebo multilamelárne. Výsledná vezikula závisí na molárnom pomere a koncentrácii PAL, dĺžky alkylových reťazcov a teploty. Sú tvorené zmesou katiónových a aniónových povrchovo aktívnych látok, čo môžeme vidieť na obr. 12. Tieto PAL asociujú vďaka interakciám ich polárnych častí.



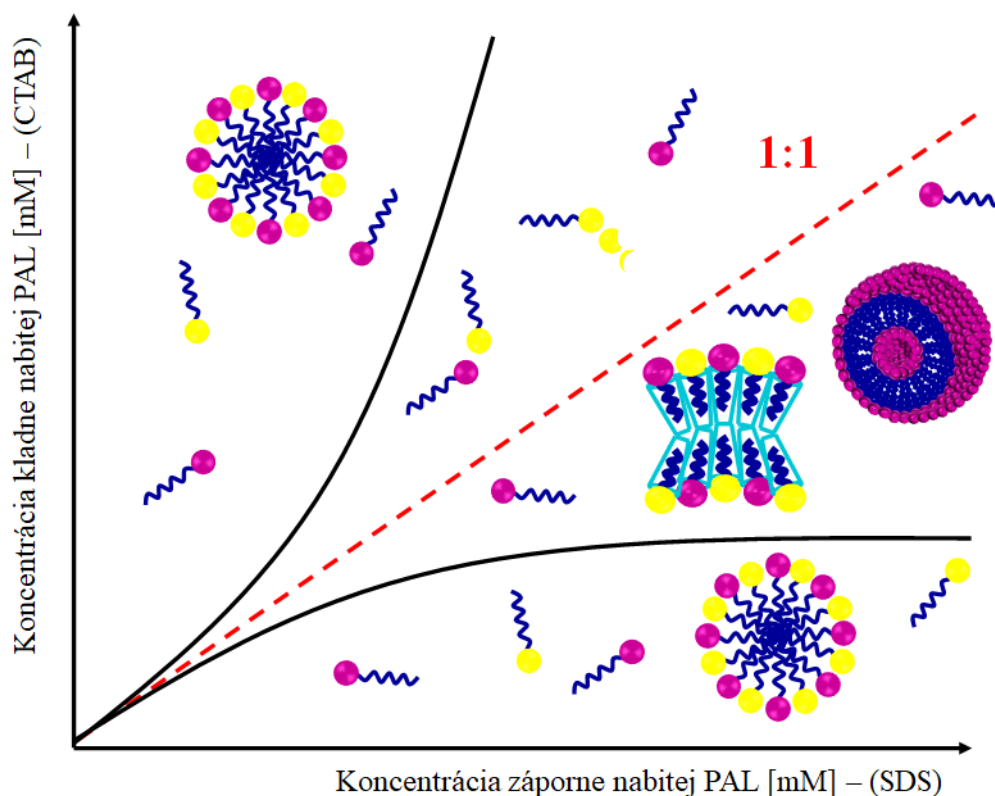
Obr. 12 Zmes povrchovo aktívnych látok tvoriacich katiónové vezikulárne systémy

Existuje rozdiel medzi zmesami aniónových a katiónových PAL, ktoré ich rozdeľujú na dve skupiny. Prvá skupina sú zmesi PAL, ktoré sú sprevádzané svojimi protiionmi a sú prítomné v konečnom systéme a IPA tzv. ion pair amphiphile, kde boli protiióny zo systému odstránené (znázornené na obr. 13).



Obr. 13 Vezikula so základnou stavebnou jednotou IPA [22]

IPA sú tvorené skombinovaním dvoch jednoreťazcových opačne nabitých amfifilných látok v ekvimolárnom pomere 1 : 1, ktorému odpovedá prerušovaná čiara v závislosti koncentrácií na obr. 14. Výsledná kombinácia týchto dvoch PAL je iónovo neutrálna a vytvára dvojité reťazce, avšak ktorého reťazce nie sú kovalentne viazané k tej istej hlavnej skupine. Vezikuly z IPA vykazujú nižšiu stabilitu. Túto stabilitu je však možné zvýšiť pridaním požadovaných zlúčenín (prídavok cholesterolu, kladne/záporne nabitých amfifilnej látky). Táto zmes PAL vykazuje lepšie synergické účinky ako PAL samostatne [23; 24].



Obr. 14 Typy agregátov závisiacich na koncentrácii PAL. Dvojvrstvá katiónovej vezikuly vzniká pri pomere PAL 1 : 1 [25]

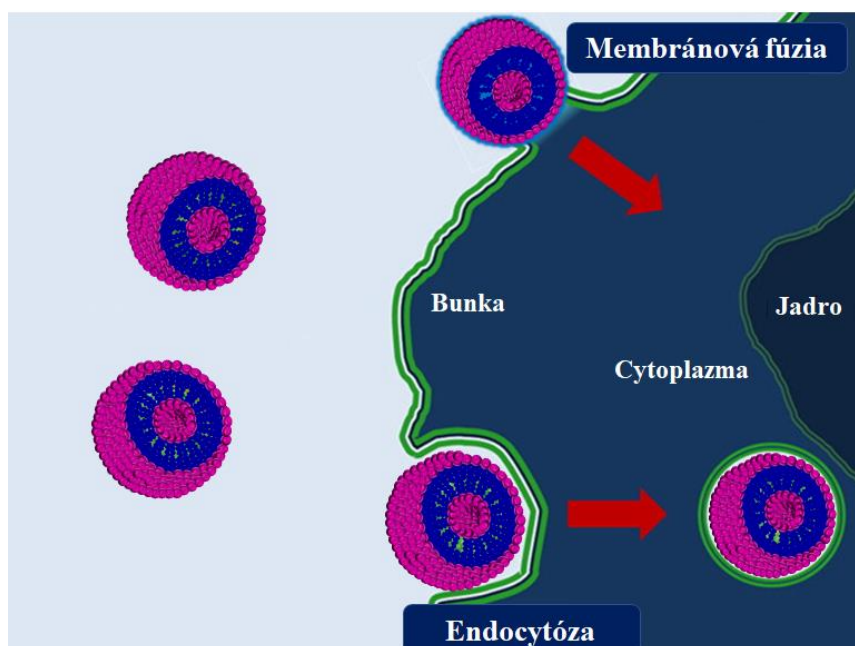
V posledných rokoch sa upriamuje pozornosť na katiónové vezikulárne systémy a ich využiteľnosť vo farmaceutických aplikáciách. Oproti doteraz známym lipozómom ich môžeme pripraviť oveľa jednoduchšie a lacnejšie. Vezikulárna štruktúra je veľmi podobná lipozómu, a tak je rovnako účinná pri enkapsulácii liečiv a následnej distribúcii. Oproti syntetickým vezikulám taktiež disponujú viacerými výhodami, ako je dlhšia trvanlivosť, nižšia toxicita a takisto lacnejšia výroba [26].

Hlavná aplikácia katiónových vezikulárnych systémov sa teda upriamuje na ich využitie ako nosičov liečiv a ich cieľenú distribúciu a transfekcia/transformácia DNA. Veľkosť a náboj vezikúl vieme regulovať pomocou pomeru PAL a prídavných látok. Je to jedna z najdôležitejších vlastností, vďaka ktorým vieme obsiahnuť široké spektrum možných enkapsulovaných liečiv. Boli skúmané rôzne typy liečiv ako je napríklad tetrakaín (hydrochloridová soľ) [27], difénhydramín [28] a orfenadrín [29].

Aktuálne štúdie zaoberajúce sa vezikulárnymi systémami poukazujú na ich využitie pri liečbe diabetu. Diabetes je choroba, ktorá postihuje milióny ľudí a predstavuje globálny problém. Vezikuly dokážu dodať liečivo priamo na efektívne miesto pôsobenia a ochrániť ho pred nepriaznivými vplyvmi. Enkapsulovaný inzulín dokázal významne znížiť glykémiu, čo bolo dokázané testami *in vivo*, vrátane orálnej cesty. Tieto študované systémy majú veľký potenciál ako alternatívna stratégia ku konvenčnej terapii [30].

Ďalšími skúmanými látkami sú liečivá na liečbu rakoviny. Vedci sa zaoberali skúmaním doxorubicínu, cytarabínu a chlorambucilu v spojení s kataniónovými vezikulami. Vezikuly dokážu po enkapsulácii liečiva znížiť jeho toxicitu a zlepšiť jeho terapeutické účinky, čo je pri tomto type liečby veľmi priaznivé. Doxorubicín enkapsulovaný do kataniónového systému po prestupe do nádorovej bunky dokázal urýchliť akumuláciu liečiva v bunke. Tento systém má potenciál v aplikácii v oblasti riadeného uvoľňovania a dodávania liečiva v chemoterapii [31]. Cytarabín sa využíva pri liečbe akútnej leukémie. Pri bežnej liečbe cytarabínom môže dôjsť k niekoľko nepriaznivým účinkom (anémia, nevoľnosť, alopecia, poškodenie pečene). Toxicita a teda aj nepriaznivé účinky môžu byť znížené pomocou udržania terapeutickej hladiny po dlhšiu dobu. Toto udržanie hladiny môžeme doceliť pomocou enkapsulácie cytarabínu do kataniónového vezikulárneho systému s riadeným uvoľňovaním [32]. Chlorambucil je ďalšou alternatívou pri liečbe leukémie. Zapúzdrený chlorambucil do kataniónovej vezikuly vykazuje zlepšenú protinádorovú aktivitu a požadované riadené uvoľňovanie [33].

Kataniónové vezikuly, vďaka svojej podobnej štruktúre ako vezikuly nachádzajúce sa v našom tele dokážu interagovať s bunkami. Existujú 2 typy interakcií, ktoré môžu prebehnúť: endocytóza a fúzia (viď obr. 15). Po prestupe do bunky pomocou interakcií dokážu vezikuly ovplyvniť fagocytózne a taktiež aj nefagocytózne bunky, ľudské bunkové línie a primárne bunky [34].

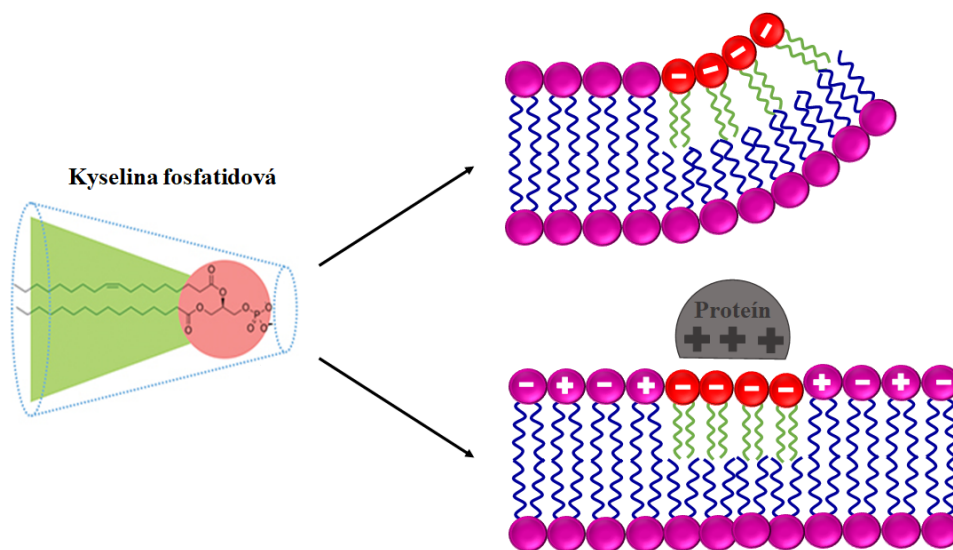


Obr. 15 Interakcie medzi kataniónovými vezikulami a bunkovou membránou [34]

2.3.1.1 Stabilizácia kataniónových vezikulárnych systémov pomocou cholesterolu a kyseliny fosfatidovej

Kataniónové vezikuly majú v porovnaní s lipozómami výhodu vysokej stability proti hydrolýze. Avšak kataniónové vezikuly majú nižšiu fyzikálnu a koloidnú stabilitu. Zlepšenie koloidnej stability vezikúl zahŕňa inter a intra-vezikulárne modifikácie. Zavedením ďalšej nabitaj amfifilnej molekuly s dvojitým reťazcom môžeme prispieť k zlepšeniu dlhodobej koloidnej stability. Pridaná amfifilná látka spôsobí inter-vezikulárne odpudzovanie medzi vezikulami, a tak nedochádza ku kolízii vezikúl. Na intra-vezikulárne modifikácie môžeme využiť stabilizačné látky, ako je napríklad cholesterol. Ten posilňuje stabilitu a mechanické vlastnosti dvojvrstvy [35].

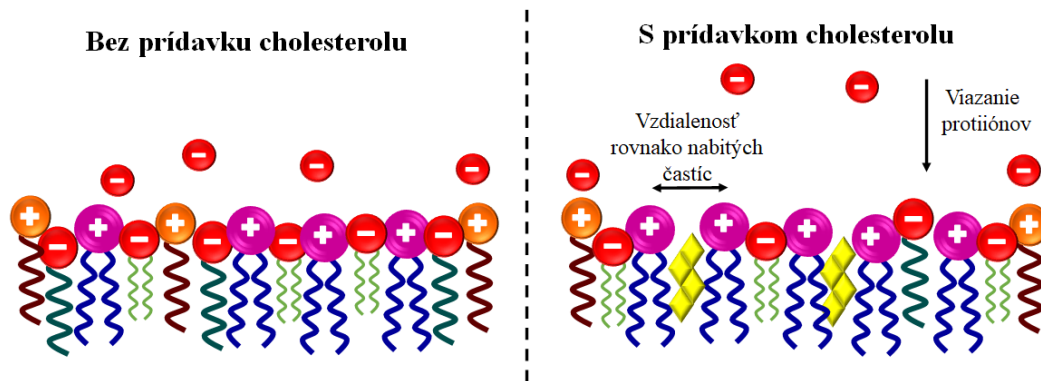
Kyselina fosfatidová (PA) patrí medzi najmenšie a najjednoduchšie fosfolipidy. PA tvorí časť lipidovej dvojvrstvy a svojimi vlastnosťami prispieva k zlepšeniu fyzikálnych vlastností membrány. PA má jedinečný tvar, kedy jej malá vysoko nabitá hlavová skupina leží blízko k základnému glycerolovému reťazcu. Tvar PA umožňuje vyvolať vysoké napätie v zakrivení membrány a má významnú úlohu pri štiepení a fúzii membránových vezikúl. Po začlenení do membrány jej dodá záporný náboj, a tak ponúka možnosť interakcie s proteínmi, čo je znázornené na obr. 16 [36].



Obr. 16 Kyselina fosfatidová a jej začlenenie do membrány [37]

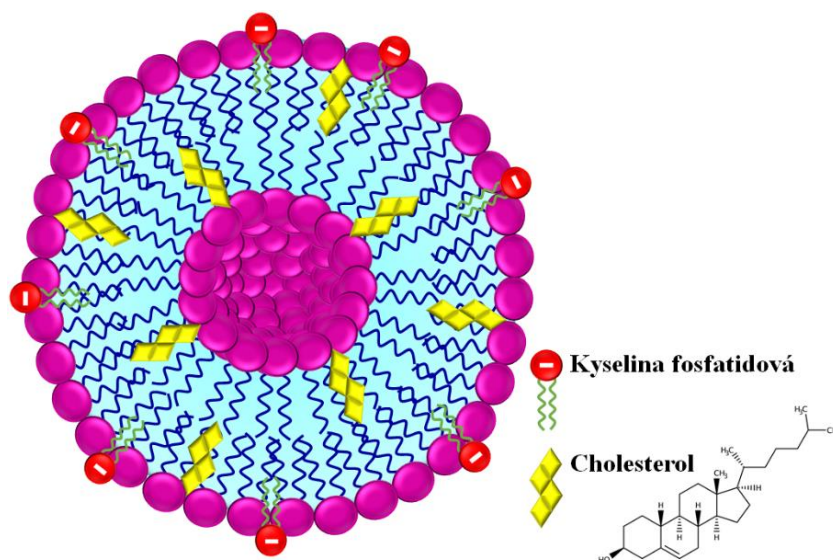
Cholesterol, lipid patriaci do skupiny steroidov, je životne dôležitá látka, ktorá sa nachádza v bunkových membránach, nervových obaloch a žľazových kyselinách. Cholesterol sa využíva na zlepšenie fluidity membrány a na riadenie jej priepustnosti. Cholesterol má amfifilnú povahu a vďaka jeho hydrofilnej časti $-OH$ sa dokáže zaradiť medzi polárne hlavy dvojvrstvy [38].

Vo vezikulárnych systémoch cholesterol mimo iného zvyšuje fyzikálnu stabilitu. Zahrnutie cholesterolu zväčší vzdialenosť medzi hlavnými nabitými skupinami (viď obr. 17) a zníži tak tendenciu väzby protiiónu na nabitý povrch vezikuly, čo by viedlo k výraznejšiemu zníženiu náboja. Taktiež sa po jeho začlenení zlepši mechanická pevnosť dvojvrstvy [39].



Obr. 17 Vplyv začlenení cholesterolu na vznikajúcu dvojvrstvu [39]

Po zakomponovaní cholesterolu do vezikulárneho systému zvýšime jeho fyzikálnu stabilitu. Kyselina fosfatidová umožní modifikáciu povrchu vezikulárneho systému záporným nábojom a jeho možnú interakciu s opačne nabitými zlúčeninami (polymérmi, proteínmi, ...).



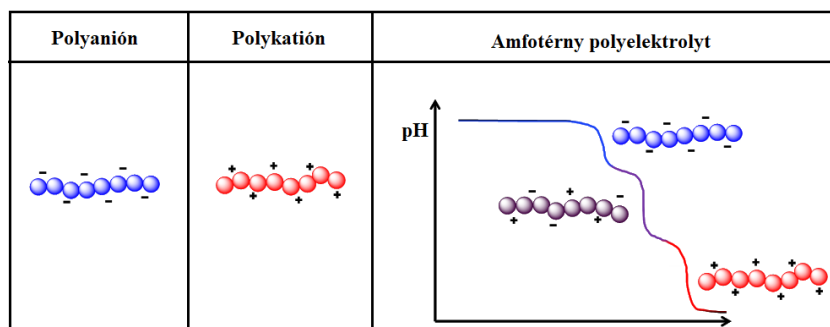
Obr. 18 Začlenenie cholesterolu a kyseliny fosfatidovej do membrány vezikulárneho systému

2.4 Polyelektrolyty

Polyelektrolyt je vysokomolekulárna látka obsahujúca postranné skupiny, ktoré dokážu podliehať elektrolytickej disociácii. Po disociácii polyelektrolytu vznikajú makroióny s veľkým počtom elementárnych nábojov a príslušným počtom protiiónov, teda malých opačne nabitých iónov. Tieto interakcie sú však citlivé na podmienky roztoku, ako je pH, iónová sila, hustota náboja, atď.

Polyelektrolyty môžeme rozdeliť podľa povahy disociovatelných skupín na polyanióny obsahujúce kyslé skupiny ($-\text{COO}^-$, $-\text{OSO}_3^-$), polykatióny so zásaditými skupinami ($-\text{NH}_3^+$) a polyelektrolyty, ktoré obsahujú aj zásadité aj kyslé skupiny a nazývajú sa amfotérne. Silné kyseliny dokážu disociovať úplne, avšak slabé kyslé a slabé zásadité skupiny dokážu disociovať len do určitého stupňa. Disociácia amfotérnych polyelektrolytov závisí na pH prostredia. Pri vysokej hodnote pH disociujú kyslé skupiny, pri nízkej hodnote zásadité skupiny a pri strednej hodnote pH vznikajú amfiióny (kladný aj záporný náboj v jednej

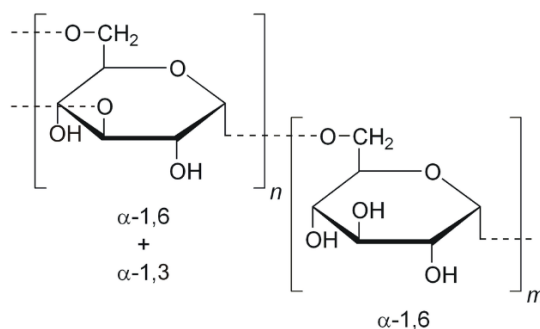
makromolekule). V takomto prípade môže nastať bod nazývaný izoelektrický bod, kedy má makromolekula celkový nulový náboj (pri špecifickom pH). Nastáva to pri rovnakom počte kladných a záporných nábojov [40; 41].



Obr. 19 Rozdelenie polyelektrolytov podľa náboja [42]

2.4.1 Dextrán

Dextrán je prírodný polysacharid, ktorého štruktúru môžeme vidieť na obr. 20. Skladá sa z glukózových jednotiek prepojeným pomocou α -(1 \rightarrow 6) glykozidickej väzby. Postranné vetvenie je najčastejšie pomocou α -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 4). α -(1 \rightarrow 2) sú charakteristické pre dextrín. Reťazce dextránu majú rôzne dĺžky a molekulové hmotnosti, čo ovplyvňuje jeho výsledné vlastnosti.



Obr. 20 Štruktúra dextránu [43]

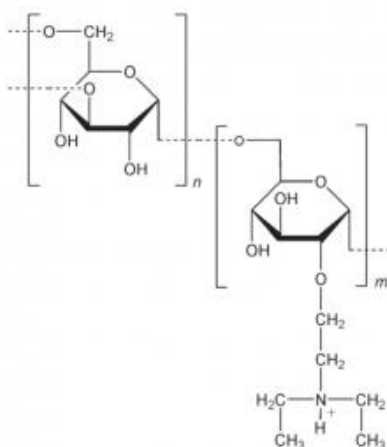
Prvýkrát bol dextrán objavený ako nežiaduca zložka v cukrovarníctve, kde upchával potrubia privádzajúce roztok sacharózy. Louis Pasteur v roku 1861 tento jav pripísal baktériám. Následne sa dextrán objavil aj ako mikrobiálny produkt vo víne. Teraz sa jeho výroba uskutočňuje pomocou baktérií rodu *Lactobacillus* enzymatickým pôsobením na sacharózu. Do tohto rodu patria *Leuconostoc mesenteroides* a *Streptococcus mutants*. Po jeho vytvorení sa obvykle izoluje pomocou prídavku etanolu k filtrátu kultúry. Dextrán je možné rozpustiť v rozpúšťadlách ako je voda, metylsulfoxid, formamid, glycerol. Molekulová hmotnosť je závislá na type producenta.

Jeho použitie je významné hlavne v oblasti medicíny vďaka jeho antitrombotickému účinku. Dextrán vo veľkosti väčšej ako je 60 kDa sa ťažko vylučuje z tela, a tak zostáva v tele dlhšie po dobu niekoľkých hodín/dní pokiaľ nie je metabolizovaný. Vďaka tomuto faktoru má predĺžené antikoagulačné účinky. Taktiež sa využíva ako prídavná lubrikačná látka do očných

kvapiiek, na náhradu stratenej krvnej plazmy v núdzových situáciách vďaka jeho obdobnej viskozite a pH podobnému krvnej plazme a dokáže zvyšovať hladinu cukru v krvi [44; 45; 46].

2.4.1.1 Dextrán hydrochlorid DEAE

Dextrán hydrochlorid je modifikácia dextransu. Je to pozitívne nabitý biokompatibilný polyelektrolyt. Získava sa syntetickou reakciou 2-chlór-N,N-dietylamoetánu s dextránom. Vďaka svojmu pozitívnemu náboju má farmaceutické využitie v interakcii s proteínmi a DNA. Touto iónovou interakciou dokáže zvyšovať absorpciu bunkami a následným vytvorením polyelektrolytových komplexov distribuovať liečivá. Využíva sa taktiež pri vývoji dodávania proteínov s predĺženým uvoľňovaním a transfekčných systémov nukleových kyselín [47; 48].



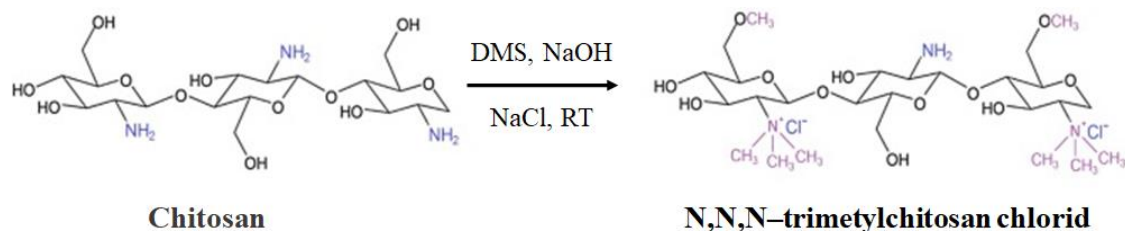
Obr. 21 Štruktúra dextrán hydrochloridu [48]

2.4.2 N, N, N – Trimetylchitosan (TMC)

Chitosan je prírodný polysacharid pozostávajúci z D-glukozamínu prepojeného pomocou $\beta(1\rightarrow4)$ glykozidickej väzby. Chitosan je možné získať pomocou N-deacetylácie chitínu. Chitosan je biologicky odbúrateľný a biokompatibilný. Má mukoadhezívne, antibakteriálne, protizápalové a protirakovinové účinky. Vykazuje dobré absorpčné vlastnosti, avšak je rozpustný v roztokoch s pH nižším ako 5,6. Táto skutočnosť obmedzuje jeho využitie v medicínskych aplikáciách. Pri prestupe kompartmentov do tela, kde je pH vyššie ako 5,6 (fyziologické pH=7,4) sa môžu vytvárať zrazeniny. Z tohto hľadiska sú potrebné deriváty chitosanu so zvýšenou rozpustnosťou v neutrálnych a mierne zásaditých hodnotách pH. Chitosan je možné derivatizovať vďaka prítomnosti voľných amínových a hydroxylových skupín. Kvartenizácia a metylácia chitosanu zvyšuje jeho mukoadhezívne vlastnosti. Mukoadhezívne vlastnosti sú vďaka vzniknutej elektrostatickej interakcie s negatívne nabitými materiálmi, ako je napríklad hlien, ktorý obsahuje slinný mucín. Slinný mucín obsahuje vyššie percento kyseliny sialovej, ktorá má pri fyziologickom pH negatívny náboj, a tak dokáže mucín a chitosan interagovať. Chitosan a jeho deriváty sú využívané v medicínskych aplikáciách (hojenie rán, regeneratívna medicína, kostné tkaninové inžinierstvo), farmaceutických aplikáciách (nosič liečiv).

N, N, N – Trimetylchitosan (TMC) je kationový kvartenizovaný hydrofilný derivát chitosanu. Vďaka modifikácii je rozpustný v širokom rozmedzí pH. TMC môžeme získať metyláciou chitosanu s metyljodidom alebo dimetylsulfátom a zásadou (hydroxid sodný)

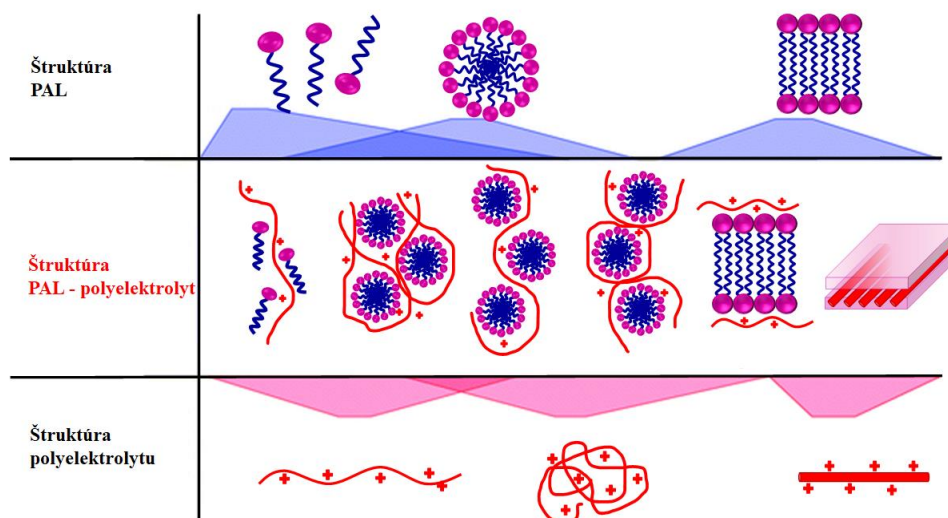
v prostredí organických rozpúšťadiel (ukážka syntézy na obr. 22). Jeho mukoadhezívne vlastnosti sú lepšie v porovnaní s chitosanom. Tiež sa vďaka metylácii zlepšili prestupné a antimikrobiálne vlastnosti. Využíva sa ako látka zvyšujúca absorpciu liečiv, prostriedkov na prenos génov (génový vektor) a antibakteriálne činidlo. TMC účinne zosilňuje prenikanie hydrofilných molekúl a makromolekúl cez bunkový epitel. Prostredníctvom interakcie polykationového polyméru s negatívne nabitými miestami na bunkovej membráne, dokáže TMC otvárať tesné spojenia medzi bunkami [49; 50; 51; 52].



Obr. 22 Syntéza trimetylchitosan chloridu [53]

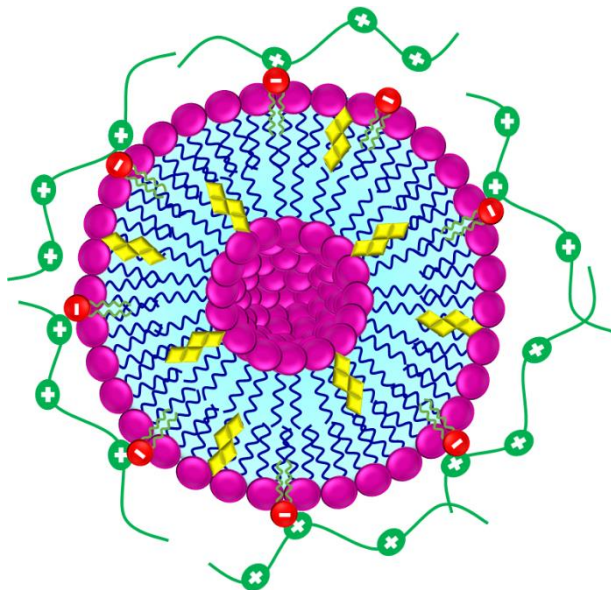
2.5 Interakcia záporne nabitých kationových vezikulárných systémov s polykationmi

Polyelektrolyty patria do dôležitej triedy polymérov a vzrastá ich využitie v komplexoch prípravkov priemyselnej výroby. Využívajú sa v kombinácii s povrchovo aktívnymi látkami. Vďaka kombinácii hydrofóbnych a elektrostatických interakcií vznikajú rôzne štruktúry v roztoku. Ak je polyelektrolyt silne nabitý, dominujú elektrostatické interakcie a hlava PAL priťahuje opačne nabité miesta na polyméry. Ak je polyelektrolyt neutrálny alebo má nízky náboj, prevládajú hydrofóbne interakcie a koniec PAL priťahuje hlavný reťazec polyméru. V tomto prípade sa ponúka široká možnosť modifikácie, či už pomocou PAL alebo pomocou zmeny polyelektrolytov a ich hustoty náboja, molekulovej hmotnosti a funkčných skupín. Vďaka tomuto môžeme rozširovať škálu aplikácií, kde môžeme pomocou rôznych atribútov namodelovať nové kombinácie látok s pokročilou funkčnosťou [41].



Obr. 23 Možné typy vznikajúcich štruktúr povrchovo aktívna látka – polyelektrolyt [42]

Nabité vezikulárne systémy dokážu vďaka hydrofóbnym a elektrostatickým interakciám asociovať s polymérmi. Po interakcii vezikuly s polykatiómom môže dochádzať k výraznému zvýšeniu viskozity (gélovatenie). Hydrofilné polykatióny s väčšou hustotou náboja vytvárajú s vezikulami väzby s dlhšou životnosťou. Z guľovitého tvaru výsledného agregátu môžu prejsť až na rovinný diskový agregát, ktorý vedie cez narušenie vezikuly. Polykatión, ktorý je hydrofóbne modifikovaný zachováva guľovitý tvar vezikuly. Hydrofóbne modifikovaný polykatión s relatívne nízkou hustotou náboja dokáže lepšie stabilizovať vezikuly a hydrofilný polymér s vysokou hustotou náboja asociuje s PAL tak silno vďaka elektrostatickým interakciám, že sú nakoniec vezikuly rozrušené [54].



Obr. 24 Interakcia záporne nabitého vezikulárneho systému s polykatiómom

2.6 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS) patrí medzi optické techniky analyzujúce dynamické vlastnosti a distribúciu veľkosti častíc rôznych systémov zložených z viacerých suspendovaných látok (koloidné častice, makromolekuly, ...).

2.6.1 Veľkosť častíc

Ak sa monochromatický lúč (laser) stretne s roztokom, ktorý obsahuje častice, rozptýli svetlo vo všetkých smeroch v závislosti od veľkosti a tvaru makromolekúl. Pri rozptyle statického svetla sa intenzita rozptýleného svetla analyzuje ako časová spriemerovaná intenzita, ktorá odpovedá molekulovej hmotnosti a polomeru gyrácie molekúl. Ak sa však analyzujú výkyvy intenzity spôsobené Brownovým pohybom častíc, získavame difúzny koeficient, ktorý súvisí s hydrodynamickým priemerom makromolekúl.

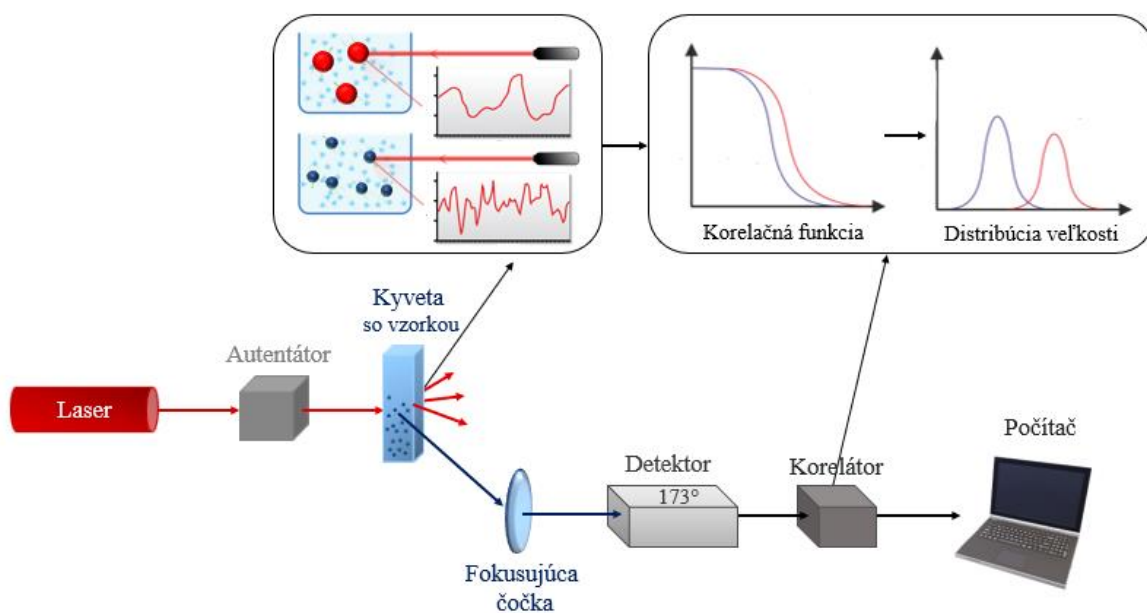
Brownov pohyb je teda základný princíp merania DLS. Vzniká bombardovaním častíc v roztoku molekulami rozpúšťadla. Vzniká neustálený neusporiadaný pohyb častíc. Tento pohyb závisí od veľkosti makromolekúl, teploty T a viskozity η_0 rozpúšťadla. Menšie častice sa pohybujú s väčšou rýchlosťou a naopak väčšie častice pomalšie. Od toho závisí aj sledovaný rozptyl svetla. Ak sledujeme Brownov pohyb v určitom časovom rozmedzí, dochádza k zmenám vzdialeností medzi časticami. Z toho následne získame informácie o veľkosti častíc.

Veľké častice v tomto prípade difundujú pomalšie, čo vedie k podobným pozíciám v rôznych časových bodoch, v porovnaní s malými časticami, ktoré sa pohybujú rýchlejšie a zmena pozície je výraznejšia.

Vzťah medzi týmito dvoma veličinami (veľkosť a difúzny koeficient) je daný Stokes-Einsteinovou rovnicou, z ktorej získame hydrodynamický priemer d_H .

$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D} \quad (2.2)$$

Inštrumentácia prístroja na meranie DLS je znázornená na obr. 25. Najdôležitejšou časťou inštrumentácie je laser (najčastejšie používaný He-Ne o vlnovej dĺžke 633 nm). Je to zdroj svetla, ktorý narazí na makromolekuly nachádzajúce sa vo vzorke a následne dochádza k rozptylu svetla vo všetkých smeroch. Intenzita tohto rozptylu je ďalej zaznamenávaná na detektore. Detektor býva umiestnený pod uhlom 173° (v niektorých prípadoch aj pod uhlom 90°) pre detekciu spätného rozptylu svetla, kedy sa vyhýbame detekcii priameho rozptylu svetla, vďaka čomu sme schopní zmerať aj veľmi malú veľkosť častíc. Pred dopadom rozptýleného svetla na detektor je ešte jedna dôležitá časť a to autentátor, ktorý zoslabuje intenzitu lasera len na určitý rozsah. Poslednou časťou inštrumentácie je korelátor. Korelátor koreluje fluktuácie intenzity rozptýleného svetla v čase, aby určil ako rýchlo sa intenzita mení. Následne sú dáta z korelátoru spracované softwarom Zetasizer a presunuté do počítača, kde sa získané dáta vyhodnotia [55; 56; 57].

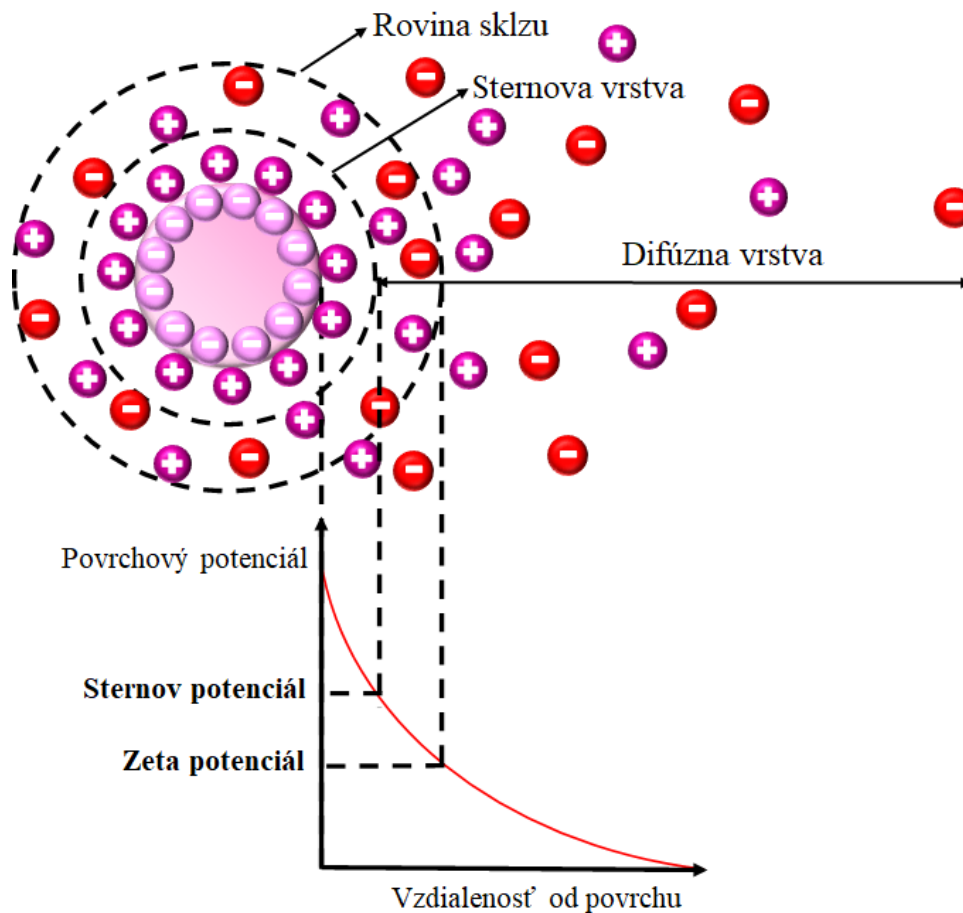


Obr. 25 Inštrumentácia DLS [58; 59]

2.6.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál, ktorý pôsobí na rovine sklzu koloidnej častice, ktorá sa pohybuje vďaka vplyvu pôsobenia elektrického poľa. Ak je nabitá častica v rozpúšťadle v styku s inými iónmi, vzniká elektrická dvojrivrstva, ktorú môžeme vidieť na obr. 26. Opačne nabité ióny sa začnú zoskupovať okolo povrchu častice a vytvoria dve

vrstvy. Tieto dve vrstvy sú navzájom opačne nabité a vytvárajú elektrickú dvojvrstvu. Vnútorňa časť dvojvrstvy sa nazýva Sternova vrstva. V tejto vrstve sa nachádzajú ióny s opačným nábojom ako má povrch častice a sú viazané pevne. Vonkajšia časť dvojvrstvy je tvorená iónami, ktoré sú priťahované k Sternovej vrstve pomocou elektrických a absorpčných síl, avšak už menej pevne. V tejto časti sa primárne nachádzajú častice s takým istým nábojom ako má dispergovaná častica a v menšom počte častice s opačným nábojom. Tieto ióny sú vzdialenejšie od povrchu častice a vytvárajú difúznú vrstvu. Difúzna vrstva sa vyznačuje určitou hranicou, rovinou sklzu. Táto hranica nám určuje, ktoré ióny sa po aplikácii elektrického poľa budú pohybovať s časticou a ktoré s rozpúšťadlom. Následný potenciál, ktorý vznikne na tomto rozhraní sa nazýva zeta potenciál. Ak má systém dostatočne kladný alebo záporný náboj, odpudivé sily sú značne veľké a nedochádza k agregácii molekúl. Tieto systémy sa považujú za stabilné. Nestabilná časť sa pohybuje v rozmedzí od -30 mV do +30 mV a v tejto oblasti dochádza k agregácii molekúl [57; 60].



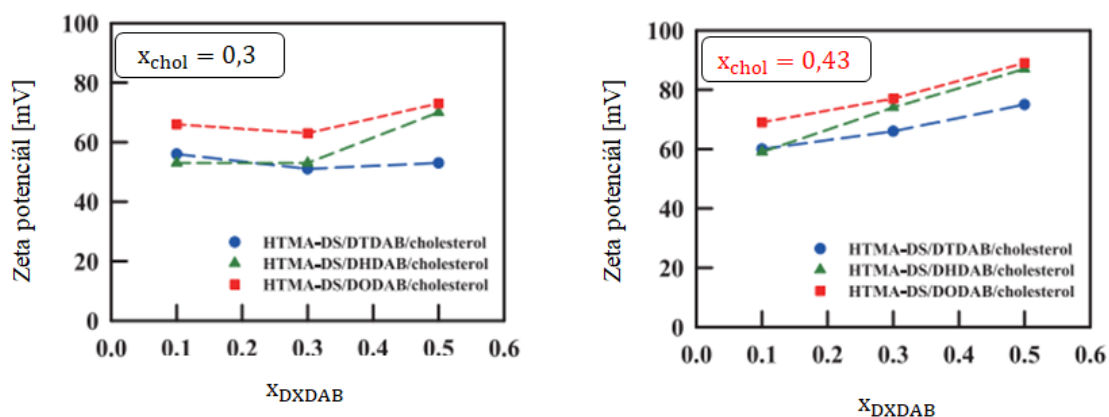
Obr. 26 Schéma elektrickej dvojvrstvy [12]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Zvýšenie stability katiónových vezikulárných systémov pomocou prídavku cholesterolu

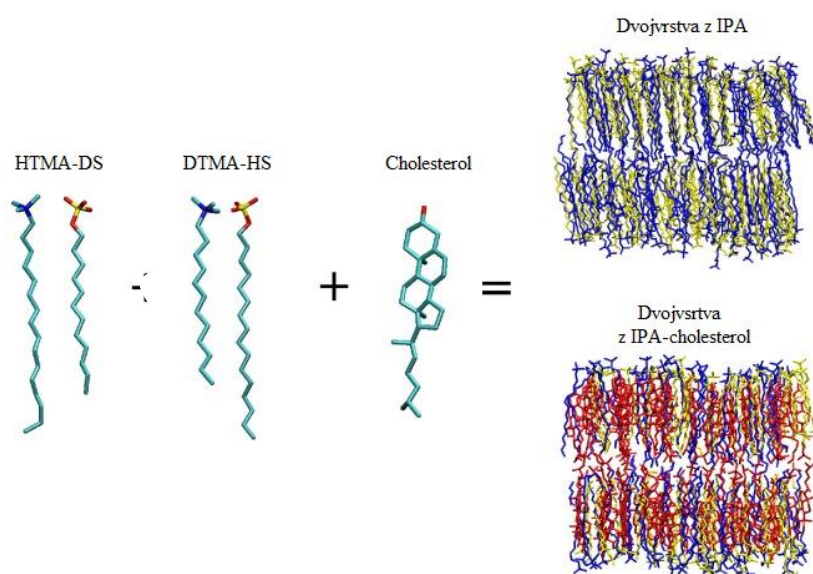
Kuo An-Tsung a koleg. študovali zvýšenie stability vezikulárneho systému pomocou pridaného cholesterolu. Vezikulárny systém bol pripravený z CTAB a SDS. Ako opačne nabitú amfifilnú zlúčeninu využili dvojreťazcový katiónový tenzid ditetradecylmetylamónium bromid. Prídavok cholesterolu zlepšil fyzikálne vlastnosti celkového systému. Začlenený cholesterol a jeho sterolový kruh maximalizoval kontakt so susednými uhl'ovodíkmi, čím sa zlepšila pevnosť dvojvrstvy. Naopak nabitú polárnu skupinu po začlenení cholesterolu zväčšili svoju vzdialenosť a znížili tendenciu väzby protiiónu na nabitý povrch vezikuly. Vezikula tak vykazovala výraznejší nábojový charakter. Pri nízkom obsahu cholesterolu ($x_{chol} \leq 0,3$) vzdialenosť a kondenzačné účinky prispievali k tvorbe malých vezikúl. Vyšší obsah cholesterolu ($x_{chol} > 3$) podporoval tvorbu veľkých vezikúl [39].

Kuo An-Tsung, Tu CH.-L a spol. sa zaoberali štúdiou katiónových vezikulárných systémov zložených z CTAB a SDS. Skúmali účinky cholesterolu a alkylového reťazca DXDAB (dialkyldimetylamónium bromid) na fyzikálnu stabilitu katiónových vezikúl. Tieto účinky boli sledované pomocou dvoch parametrov a to veľkosti častíc a zeta potenciálu. Ako aj v predchádzajúcej štúdií overili zlepšenie stability vezikúl po pridaní cholesterolu, jeho vplyv na charakter náboja vezikúl a taktiež aj na zlepšenie flexibility vezikulárnej dvojvrstvy. V súvislosti s DXDAB a jeho dĺžkou reťazca zaznamenali, že čím je dlhší alkylový reťazec, tým sa cholesterol orientuje viac do stredu dvojvrstvy. To spôsobí zvyšujúce sa účinky cholesterolu na náboj a ovplyvní sa molekulárne balenie vezikuly. Ak je reťazec DXDAB dlhší, dochádza k výraznejšiemu zvýšeniu stability systému. Ako môžeme vidieť na obr. 27 po pridaní cholesterolu k systému CTA-DS+DXDAB sa stabilita vezikúl zvýšila. Vyšší obsah cholesterolu $x = 0,43$ spôsobil zvýšenie zeta potenciálu spolu so zvýšeným obsahom DXDAB, zatiaľ čo zeta potenciál vezikúl s obsahom cholesterolu menším ako 0,3 sa významne nemenil [61].



Obr. 27 Porovnanie vplyvu nižšieho a vyššieho obsahu cholesterolu na zeta potenciál systému CTA-DS+DXDAB [61]

Tien W.J. a spol. sa vo svojom článku zamerali na štúdium ion pair amphiphile (IPA) ako lacnejšiu náhradu fosfolipidov na výrobu vezikúl s rôznymi farmaceutickými aplikáciami. Pri návrhu nosičov pre farmaceutické aplikácie sú dôležité fyzikálno-chemické a permeačné vlastnosti vezikúl. Preskúmali účinok prídavku cholesterolu na štruktúru, mechaniku a permitivitu vezikúl. Vezikuly boli zložené z hexadecyltrimetylamónium-hexadecylsulfátu HTMA-DS alebo dodecyltrimetylamónium-hexadecylsulfátu DTMA-HS, ako môžeme vidieť na obr. 28. Zo štruktúrneho a mechanického hľadiska sa vezikuly z HTMA-DS a DTMA-HS nachádzali v gélovej fáze pri teplote 278 K. Prídavok cholesterolu spôsobil usporiadanie alkylových reťazcov okolo sterolového kruhu a zvýšil tým hustotu medzier v hydrofilnej oblasti oboch IPA vrstiev. Cholesterol tiež znižuje priepustnosť tuhých membrán. Tento efekt je spôsobený vďaka synergickému účinku zvýšeného usporiadania alkylového reťazca a zvýšeniu mechanického modulu membrány.



Obr. 28 Porovnanie dvojvrstvy vzniknutej z IPA a z IPA s prídavkom cholesterolu [35]

Výsledky štúdie poukázali na to, že systém DTMA-HS-Chol má menší stupeň usporiadania reťazcov v porovnaní s HTMA-HS-Chol z dôvodu väčšieho vnútorného nesúladu alkylových reťazcov v blízkosti jadra systému. Prídavok cholesterolu zlepšil membránové mechanické vlastnosti v oboch prípadoch, ale systém HTMA-DS-Chol mal vyššiu mechanickú pevnosť, vďaka lepšiemu usporiadaniu alkylových reťazcov. Priepustnosť vody sa pri oboch systémoch pri nižšom obsahu cholesterolu ($x_{\text{chol}} = 0,094$) zvyšuje, čo je spôsobené v dôsledku zmenšenia voľnej energie bariéry. Pri obsahu cholesterolu väčšom ako 0,203, synergické účinky zvýšeného usporiadania alkylových reťazcov a zvýšenie mechanickej pevnosti membrány viedli k zníženiu priepustnosti vody cez dvojvrstvu [35].

3.2 Zvýšenie stability vezikúl pridaním záporne nabitých látok

Yotsumoto S. a spol. sa zaoberali skúmaním lipozómov so záporne nabitými zložkami – fosfolipidmi. Ako fosfolipidy boli použité fosfatidylserín a kyselina fosfatidová. Keďže fosfatidylserín (PS) a kyselina fosfatidová (PA) patria medzi hlavné záporne nabité fosfolipidy v plazmatickej membráne, lipozómy obsahujúce PS alebo PA sú prednostne absorbované

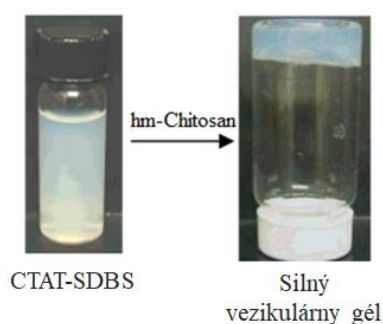
bunkami. Experimenty dokázali, že lipozómy s PS vykazovali vyššiu antigénovú špecifitu ako lipozómy s PA. V tomto prípade je to spôsobené negatívnym nábojom, ale aj serínovou hlavovou skupinou PS, čo zohráva dôležitú úlohu pri rozpoznávaní lipozómov bunkami. Výsledky experimentu taktiež naznačujú, že PS-lipozómy zapúzdujúce antigény čiastočne napodobňujú aktivitu apoptických buniek na aktiváciu imunitných. A tak majú záporne nabité lipozómy obsahujúce PS veľký potenciál pri bunkovej terapii [62].

Bana L. a jej tím sa zamerali na Alzheimerovu chorobu a jej liečenie. Skúmali schopnosť lipozómov funkcionalizovaných pomocou kyseliny fosfatidovej a modifikovaného peptidu. Takto funkcionalizované lipozómy sú schopné prechádzať hematoencefalickou bariérou. Výsledky ukazujú, že tieto systémy sú vhodnými nanočasticami s potenciálnou aplikáciou *in vivo* pri liečbe Alzheimerovej choroby [63].

3.3 Vezikulárne systémy v interakcii s polymérmi

3.3.1 Kataniónové vezikulárne systémy v interakcii s polykatiónmi

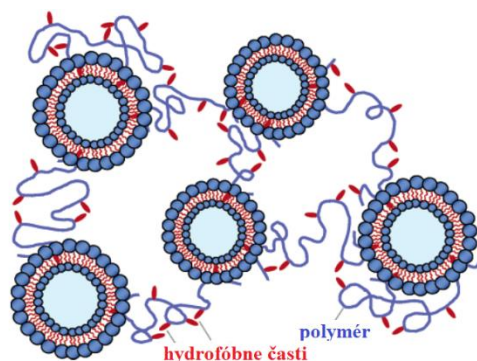
Lee J.-H. a spol. sa zaoberali účinkom, ktorý nastane po pridaní asociovaného polyméru k vezikulárnym systémom a micelám. Vezikulárne systémy boli pripravené z kladne nabitého tenzidu cetyltrimetylamóniumtosylátu a záporne nabitého tenzidu dodecylbenzénsulfonátu. Tento prídavok bol študovaný pomocou reológie a techniky malouhlového rozptylu elektrónov (SANS). Ako polymér bol využívaný chitosan, ktorý bol modifikovaný naviazaním hydrofóbných alkylových reťazcov k jeho hlavnému reťazcu. V tomto prípade boli použité n-dodecylové zvyšky pripojené k chitosanu reakciou amínových skupín s n-dodecylaldehydom. Naviazanie tohto modifikovaného polyméru s kladne nabitým vezikulárnym systémom viedlo ku vytvoreniu gélu (viď obr. 29). Avšak k týmto interakciám dochádzalo len pri hydrofóbne modifikovanom chitosane, pri natívnom chitosane k týmto interakciám nedochádza.



Obr. 29 Vytvorenie vezikulárneho gélu po pridaní hydrofóbne modifikovaného chitosanu [64]

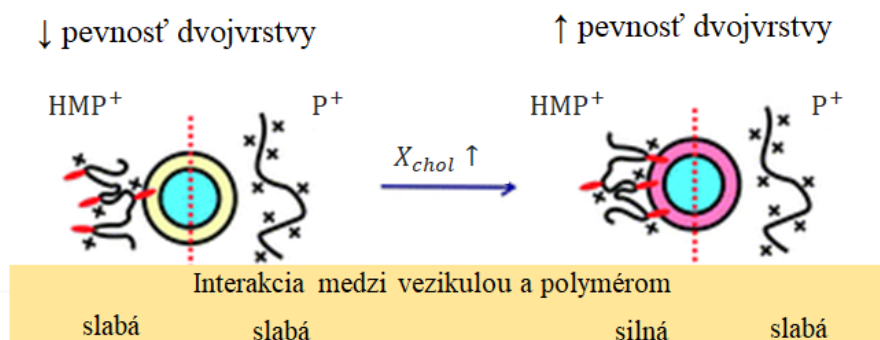
Interakcie medzi hydrofóbnymi časťami polyméru vedú k prechodnej makromolekulárnej sieti, čím dodávajú roztoku značnú viskoelasticitu. To znamená, že sa Newtonovská kvapalina pretransformovala na elastickú tuhú látku s frekvenčne nezávislými modulmi šmyku. Pomocou metódy SANS bolo dokázané, že vezikuly s polymérnymi reťazcami vytvárajú trojrozmernú sieť a vezikuly zostávajú neporušené. Asociovaný polymér je vo všeobecnosti vo vode rozpustný polymér nesúci hydrofóbne skupiny na koncoch reťazca alebo pozdĺž chrbta. Pri nízkych koncentráciách PAL sa ľahšie vytvárajú sieťové priečne väzby a zvyšuje sa viskozita roztoku. Pri vyšších koncentráciách sa vytvárajú sférické micely

a dochádza k zníženiu viskozity vďaka zachyteniu hydrofóbných častí micelami. Pri interakcii červovitých micel a asociatívnych polyméroch viskozita stúpa. Vezikuly s asociatívnym polymérom vytvárajú trojrozmerné siete. Väzba vezikuly a polyméru je pripisovaná k zapojeniu hydrofóbných častí polyméru do dvojvrstvy vezikúl. Každá vezikula tak pôsobí ako multifunkčný spoj v štruktúre siete. Ak vezikula nesie náboj, dochádza ku kombinácii hydrofóbných a elektrostatických síl. Po pridaní sa vezikula reorganizuje na menšie častice, aby poskytla väčšiu plochu povrchu pre interakciu s hydrofóbnymi časťami polyméru. Polymér môže pôsobiť ako stabilizačné činidlo. V niektorých prípadoch môže viesť až k vytvoreniu fazetovaných vezikúl [64].



Obr. 30 Začlenenie hydrofóbnjej časti do vezikulárneho systému a vytváranie sieťovitej štruktúry [64]

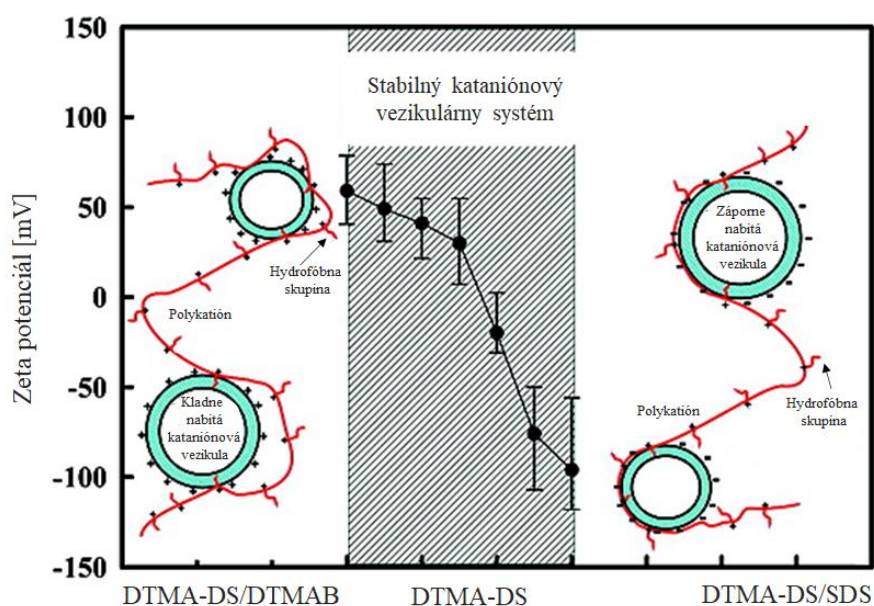
Chiu Ch.-W, Chang Ch.-H. a Yang Y.-M. študovali etozómové katiónové vezikulárne systémy, ktoré boli pripravené použitím IPA decyltrimetylamónium-dodecylsulfátu. Tieto systémy boli študované za účelom ich využitia v dermálnom podaní liečiv. Skúmali interakciu vezikulárnych systémov s polykatiónmi rozpustnými vo vode s hydrofóbnou modifikáciou HMP^+ a bez nej P^+ . Táto interakcia bola za účelom gelácie vezikulárnych systémov, ktorá bola potrebná na zvýšenie viskozity vzhľadom na mukoadhéziu kože. Taktiež boli študované účinky prídavku cholesterolu a etanolu na konfiguráciu polyméru a rigiditu membrány. Etanol mal zhoršujúce účinky na rigiditu membrány, zatiaľ čo cholesterol ju výrazne zvýšil. Reologické merania poukázali na zlepšenie interakcie medzi vezikulárnym systémom a hydrofóbnou modifikovaným polymérom po prídavku cholesterolu. So zvyšujúcou sa koncentráciou cholesterolu sa zvyšovala interakcia, čo môžeme vidieť na **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.**



Obr. 31 Interakcia etozómových vezikúl s polykatiónmi HMP^+ a P^+ [65]

Na polymér P^+ koncentrácia cholesterolu a etanolu nemala vplyv. Vo všeobecnosti etanol ovplyvňuje hlavne geláciu prostredníctvom svojho vplyvu na dielektrickú konštantu roztoku a teda na konfiguráciu polymérneho reťazca. Cholesterol ovplyvňuje rigiditu membrány a interakciu medzi vezikulami a hydrofóbne modifikovaným polymérom [65].

Huang. Z.-L. a jeho tím pripravovali rôzne nabité kataniónové vezikulárne systémy. Kataniónové vezikulárne systémy boli pripravené z IPA dodecyltrimetylamónium-dodecylsulfátu (DTMA-DS) a z prídavku jednoreťazcovej povrchovo aktívnej látky dodecyltrimetylamónium bromidu (DTMAB) alebo dodecylsulfátu sodného (SDS). Následne bola skúmaná ich interakcia s rôznymi typmi polymérov (hydroxyetylcelulóza, hydrofóbne modifikovaná hydroxyetylcelulóza) rozpustných vo vode.



Obr. 32 Interakcia záporne a kladne nabitých vezikúl s polykatiómom [66]

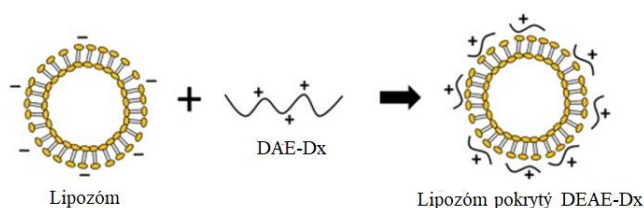
V prípade kataniónových vezikulárnych systémov v kombinácii s polymérmí bez náboja a bez hydrofóbnej interakcie došlo pri nízkych koncentráciách polyméru k separácii fáz a pri následnom zvyšovaní koncentrácie sa vytvorila gélovitá štruktúra. Pokiaľ bol použitý nenabitý hydrofóbne modifikovaný polymér bola separácia inhibovaná. Bolo to spôsobené hydrofóbnymi interakciami polyméru s vezikulami. Pri interakcii nabitého kataniónového systému s kladne nabitým polymérom bolo fázové správanie závislé na náboji vezikúl. Ak mali vezikuly negatívny náboj, dochádzalo k vytvoreniu viskózneho roztoku. Pri kladne nabitých vezikulárnych systémoch naopak dochádzalo k separácii fáz. Hydrofóbne modifikovaný polykatión reagoval so záporne nabitou vezikulou tak, že pri nízkych koncentráciách dochádzalo taktiež k separácii fáz. V tomto systéme tak pôsobili ako aj hydrofóbne, tak aj elektrostatické účinky. U kladne nabitých vezikúl s hydrofóbne modifikovaným polymérom bol zasa naopak vytvorený viskózný roztok pri vyšších koncentráciách, kde prevažoval hydrofóbny účinok nad elektrostatickým účinkom [66].

3.3.1.1 Vezikulárne systémy v interakcii s funkcionalizovaným dextránom

Ning S a jeho tím študovali a pripravovali lipozómy potiahnuté funkcionalizovaným dextránom (FD-LIPs). Lipozómy boli pripravené z fosfatidylcholínu a cholesterolu. Následne interagovali s hydrofóbne modifikovaným karboxymetyl-dextránom. Tieto systémy boli charakterizované pomocou NMR spektroskopie a metódy DLS. Do takto funkcionalizovaných lipozómov bol enkapsulovaný doxorubicín. Prítomnosť dextránu na povrchu vezikúl vytvára stérickú bariéru proti nešpecifickej adsorpcii proteínov a umožňuje naviazať ligandy s aktívnym zacielením na konkrétne bunky. Taktiež FD-LIPs vykazujú vysokú účinnosť enkapsulácie doxorubicínu a jeho trvalé uvoľňovanie v porovnaní s nepotiahnutými lipozómami naplnenými liečivom [67].

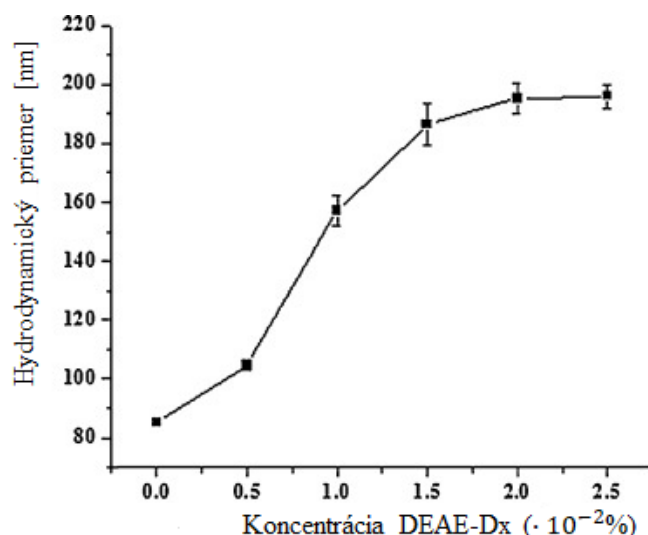
Rovnaký tím autorov sa ďalej zaoberal štúdiou lipozómov pozostávajúcich z rovnakých látok (fosfatidylcholín a cholesterol) v interakcii s karboxymetyl-dextránom. Tieto lipozómy boli charakterizované pomocou merania DLS a atómovej silovej mikroskopie AFM. Potvrdilo sa, že pripravené lipozómy sú rezistentné voči nešpecifickej adsorpcii proteínov, ponúkajú možnosť modifikácie ligandami a stabilitu systému. CMD-LIPs s enkapsulovaným doxorubicínom by mohli poskytnúť stabilný injekčný roztok a lyofilizovaný prášok. Enkapsulácia liečiva bola až do 94,2 % s následným dlhodobým uvoľňovaním liečiva [68].

Menon P., Yin Y.-T a Misran M. skúmali stabilizáciu negatívne nabitých lipozómov pripravených zo sójového lecitínu pomocou interakcie s polykationovým derivátom dextránu: dietylamoetyl-dextrán (DEAE-Dx) (viď obr. 33). DEAE-Dx je biologicky odbúrateľný, biokompatibilný a dokáže zvyšovať prenikanie lipozómov pokožkou. Taktiež preukazuje inhibičné účinky na rast nádoru, pretože dokáže vytvárať konjugáty s rôznymi molekulami liečiva a zvyšuje ich terapeutické účinky. V tejto štúdii bol použitý kurkumín enkapsulovaný do lipozómu potiahnutého DEAE-Dx na preskúmanie účinnosti enkapsulácie. Charakterizácia systému bola získaná pomocou merania zeta potenciálu, veľkosti častíc a diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (DSC).



Obr. 33 Záporne nabitý lipozóm pokrytý DEAE-Dx [69]

Veľkosť nepotiahnutých lipozómov bola stanovená na $(85,1 \pm 1,0)$ nm. Po pridaní DEAE-Dx sa výrazne zvýšila veľkosť častíc z dôvodu zosieťovania negatívne nabitého lipozómu s polykationom. Optimálna koncentrácia DEAE-Dx bola stanovená na 0,02 hm.% (veľkosť častíc $(195,3 \pm 6,2)$ nm). Po pridaní väčšej koncentrácie DEAE-Dx nedochádzalo k významnej zmene veľkosti lipozómov a povrch lipozómu bol už dostatočne nasýtený DEAE-Dx, čo môžeme vidieť na obr. 34. Taktiež sa zmenil zeta potenciál lipozómov zo zápornej hodnoty na kladnú, čo potvrdilo poťahovanie lipozómov pomocou DEAE-Dx a vznik stabilnejšieho koloidného systému.

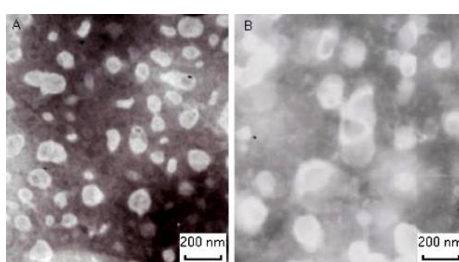


Obr. 34 Rôzne koncentrácie DEAE-Dx v interakcii s lipozómami [69]

Lipozómy potiahnuté DEAE-Dx preukázali väčšiu účinnosť zachytenia kurkumínu ako len negatívne nabité lipozómy. Tieto výsledky poukazujú na možnosť využitia lipozómov potiahnutých DEAE-Dx ako účinných nosičov liečiv [69].

3.3.1.2 Vezikulárne systémy v interakcii s TMC

Zhang J. a Wang S. sa zaoberali štúdiou lipozómov pripravených z fosfatidylcholínu a cholesterolu injekčným vstrekaním. Lipozómy boli pokryté trimetylchitosanom a dokázali enkapsulovať koenzým Q10. Experimentálne skúmali účinky molekulevej hmotnosti a koncentrácie TMC (0,1; 0,2; 0,5; 10 %) na výsledné vlastnosti lipozómov. Tieto vlastnosti boli skúmané pomocou sledovania distribúcie veľkosti častíc, zeta potenciálu a prítomnosť polymérnej vrstvy bola dokázaná pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie. Na obr. 35 môžeme vidieť potvrdenie potiahnutia lipozómov trimetylchitosanom. Vo všetkých prípadoch vznikli guľovité častice a prítomnosťou polymérnej vrstvy sa zväčšila veľkosť vezikul.



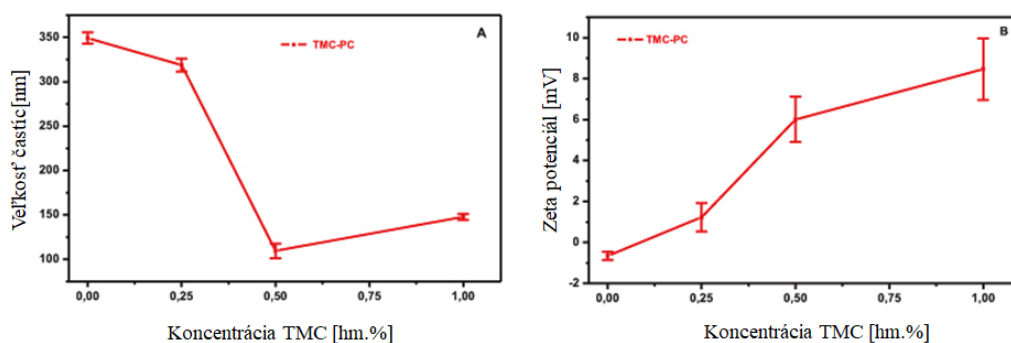
Obr. 35 Snímka z transmisného elektrónového mikroskopu: naľavo samotné lipozómy, napravo lipozómy potiahnuté TMC [70]

Väčšie častice predstavovali úplné potiahnutie polymérom TMC, menšie častice predstavovali len čiastočne polymerizovaný lipozóm. Väčšia veľkosť častíc bola pripisovaná elektrostatickému pôsobeniu medzi kladne nabitými reťazcami TMC, ktoré sa nachádzajú na vonkajšej strane membrány. To zvýši zakrivenie lipozómov, a tým aj zväčšenie hrúbky potiahnutej vrstvy. Zeta potenciál bol so zvyšujúcou sa koncentráciou väčší (vid' tab. 1), až do bodu dosiahnutia relatívne konštantnej hodnoty. Tento systém by mal potenciálne uplatnenie v topickom použití a liečbe ochorenia rohovky [70].

Tab. 1 Zmena veľkosti častíc lipozómov a zeta potenciálu s rastúcou koncentráciou TMC [70]

TMC	Koncentrácia (%)	Veľkosť častíc		Zeta potenciál (mV)
		Lipozóm (nm)	Lipozóm +TMC (nm)	
	0	136		-8.7
TMC601	0.1	71.3	193.1	4.12
	0.2	84.1	228.8	9.36
	0.5	91.2	217.1	22.2
	1.0	99.2	331.6	24.1
TMC602	0.1	78.7	245.1	8.16
	0.2	87.3	256.9	12.3
	0.5	91.9	307.4	24.6
	1.0	102.3	354.7	25.1

Van der Merwe S.M. a jeho tím sa zaoberali vplyvom pridaného trimetylchitosanu v rôznych koncentráciách na výsledný systém lipozóm – TMC. Lipozómy pozostávali z fosfatidylcholínu. Trimetylchitosan bol pridávaný k vzniknutým lipozómom v koncentráciách 0,25; 0,5 a 1 hm. %. Vzniknutý systém bol skúmaný pomocou dynamického rozptylu svetla a diferenčnej skenovacej kalorimetrie (DSC). Povrchový náboj lipozómov sa výrazne menil vplyvom koncentrácie TMC. Ako môžeme vidieť na obr. 36, so zvyšujúcou sa koncentráciou TMC sa veľkosť častíc znižovala. Hodnoty zeta potenciálu sa naopak zväčšovali s prídavkom TMC, čo naznačuje interakciu polyméru s lipozómami, pretože fosfatidylcholín má nulový náboj a TMC kladný náboj. Taktiež došlo k ovplyvneniu fázovej prechodovej teploty, čím bola overená interakcia polyelektrolytu s lipidovou dvojvrstvou [71].



Obr. 36 Vplyv zvyšujúcej sa koncentrácie TMC na veľkosť častíc a hodnotu zeta potenciálu [71]

Huang A., Makhlof A. a spol. skúmali lipozómy potiahnuté TMC s následným využitím pomocou orálneho podania s enkapsulovaným kalcitonínom. Terapeutické peptidové a proteínové liečivá majú vysokú špecifitu, aktivitu a ich spôsob dodávania je náročnejší. Preto sa vyžaduje preskúmanie nových systémov na ich distribúciu za cieľom zlepšiť ich biologickú

dostupnosť. Študované lipozómy boli pripravené z distearoylfosfatidylcholínu, dicetylfosfátu a cholesterolu v pomere 8 : 2 : 1. TMC (kvartenizácia 78 %) bol pridávaný k vzniknutým lipozómom v pomere 1 : 1. Vlastnosti systému boli skúmané pomocou dynamického rozptylu svetla a taktiež boli skúmané mukoadhezívne vlastnosti TMC a schopnosť enkapsulácie kalcitonínu.

Ako môžeme vidieť v *tab. 2*, zeta potenciál lipozómov, ktoré boli nabité záporne sa po potiahnutí TMC zmenil do kladnej oblasti. Tento fakt poukazuje na úspešnú interakciu lipozómov s pozitívne nabitým polymérom. Taktiež bola potvrdená vysoká účinnosť enkapsulácie kalcitonínu ($89,14 \pm 3,1$ %), ktorá bola rovnako vysoká aj u nepotiahnutého lipozómu, a tak táto modifikácia lipozómu nenarušila jeho účinnosť.

Tab. 2 Charakterizácia pripravených nepotiahnutých lipozómov, lipozómov s chitosanom a s trimetylchitosanom [72]

Vzorka	Veľkosť častíc [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	E.E [%]
Lipozóm	171,9	0,129	$-57,2 \pm 2,4$	$91,2 \pm 2,6$
Chitosan-lipozóm	337,5	0,312	$46,4 \pm 3,7$	$88,73 \pm 1,7$
TMC-lipozóm	262,9	0,172	$35,8 \pm 1,2$	$89,14 \pm 3,1$

Prítomnosť TMC v systéme viedlo k predĺženiu doby zotrvania a k zvýšeniu permeačného účinku systému. Mukoadhezívne vlastnosti chitosanu a TMC boli porovnateľné. TMC vykazuje mukoadhezívne vlastnosti na sliznicovej vrstve nielen vďaka elektrostatickým interakciám medzi pozitívne nabitým reťazcom a negatívne nabitým povrchom sliznice, ale aj pre iné nekovalentné väzby (vodíkové a hydrofóbne väzby). Chitosan je obmedzený svojou rozpustnosťou závislou na pH prostredia. TMC má lepšiu rozpustnosť a väčšie mukoadhezívne vlastnosti, a preto je TMC sľubnou alternatívou k chitosanu a využiteľnosti systému lipozóm – TMC ako nových systémov na orálne podávanie peptidových a proteínových liečiv [72].

Khameneh B., Momen-nejad M. a Tafaghodi M. sa zamerali na prípravu a charakterizáciu lipozómov potiahnutých trimetylchitosanom. Tento systém skúmali za účelom nazálneho dodávania antigénu (tetanický toxoid). Tieto lipozómy majú potenciál zosilniť imunitnú reakciu a mukoadhezívne vlastnosti, a tak z nich pripraviť užitočné systémy na podávanie liečiv sliznicou.

Lipozómy boli pripravené kombináciou fosfatidylcholínu, cholesterolu a dicetylfosfátu, ktorý poskytoval lipozómu celkový záporný náboj. Ich priemerná veľkosť bola 100 nm. Tieto lipozómy boli potiahnuté 0,01 hm. % trimetylchitosanom s kvartenizáciou 50 ± 10 % v pomere 1 : 4. Systémy boli charakterizované metódou DLS a stabilita a integrita antigénu pomocou SDS-PAGE elektroforézy. Veľkosť potiahnutých častíc v porovnaní s nepotiahnutými sa zvýšila dvojnásobne, čo môžeme vidieť v *tab. 3*. Spomenuté zvýšenie lipozomálnej veľkosti a taktiež posun zeta potenciálu zo zápornej hodnoty do kladnej potvrdilo obalenie lipozómov trimetylchitosanom. Miera enkapsulácie toxoidu bola 70 ± 3 % a proces poťahovania lipozómov trimetylchitosanom nijako neovplyvnil naviazaný antigén.

Tab. 3 Porovnanie vlastností nepotiahnutého a potiahnutého lipozómu TMC [73]

	Veľkosť častíc [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	Enkapsulácia [%]
Lipozóm	153 ± 8	0,21 ± 0,02	-40,1 ± 2,5	72 ± 5
TMC-lipozóm	376 ± 79	0,47 ± 0,07	34,1 ± 6,6	70 ± 3

Taktiež sa zistilo, že stupeň kvartenizácie TMC má priamy vplyv na výsledné vlastnosti celkového systému. Vďaka vyššiemu stupňu kvartenizácie a hustoty náboja TMC vznikne dostatočne silná elektrostatická interakcia medzi záporne nabitými lipozómami a polykatiómom [73].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

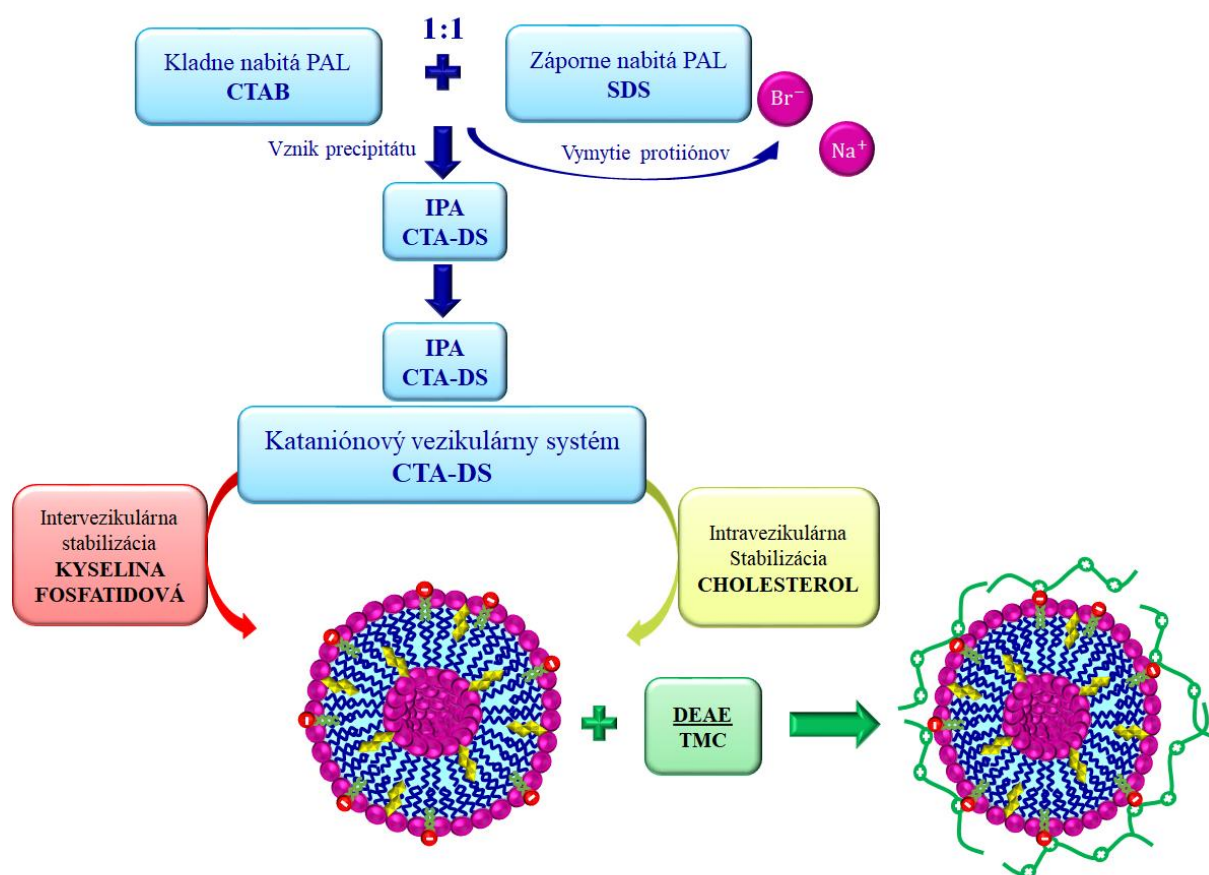
V tejto časti kapitoly budú zhrnuté a predstavené použité chemikálie, príprava vzoriek a ich meranie pomocou stanovenej metódy, ktorá bola použitá počas riešenia diplomovej práce a následné vyhodnocovanie získaných dát.

4.1 Chemikálie

Tenzidy	Dodecylsírán sodný SDS Sigma Aldrich CAS: 151-21-3 Číslo šarže: L3771-100G M _r : 288,38 g·mol ⁻¹
	Cetyltrimetylamónium bromid CTAB Sigma Aldrich CAS: 7647-14-5 Číslo šarže: H5882-1KG M _r : 364,45 g·mol ⁻¹
Lipidy	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3fosfát (sodná soľ – PA 12:0) Avanti Polar Lipids, Inc. CAS: 108321-06-8 Číslo šarže: 840365P-200MG-A024 M _r : 558,661 g·mol ⁻¹
	Cholesterol Sigma Aldrich CAS: 57-88-5 Číslo šarže: 267-25G-F M _r : 386,65 g·mol ⁻¹
Polyelektrolyty	Dextrán hydrochlorid DEAE Sigma Aldrich CAS: 9064-91-9 Číslo šarže: D9885-100G
	Trimetylchitosan Syntetizovaný na FCH VUT Stupeň kvartenizácie: 60 %
Rozpúšťadlá	Chloroform Penta s.r.o. CAS: 67-66-3 Číslo šarže: 602-006-00-4 M _r : 119,38 g·mol ⁻¹
	Metanol Sigma Aldrich CAS: 67-56-1 Číslo šarže: 154903 M _r : 32,04 g·mol ⁻¹
	Deionizovaná voda Systém ELGA

4.2 Príprava vzoriek

V tejto časti diplomovej práce sa budeme zaoberať prípravou a následnou charakterizáciou záporne nabitých kataniónových vezikulárných systémov. Základ týchto systémov pozostával z kladne nabitých povrchovo aktívnych látok CTAB a záporne nabitých SDS. Stabilizácia systémov bola uskutočnená pomocou prídavku lipidov. Intra-vezikulárna stabilizácia systému bola docielená prídavkom cholesterolu. Ako záporný komponent systému bola pridaná kyselina fosfatidová (PA), ktorá bola začlenená do systému za cieľom napomáhať inter-vezikulárnej stabilizácii. Prídavok PA nám taktiež umožnil následnú interakciu s vybranými polykationami ako je dextrán hydrochlorid (DEAE) a N,N,N-trimetylchitosan (TMC), ktoré zlepšia finálne vlastnosti vezikulárneho systému pre následné využitie ako nosičov liečiv.



4.2.1 Príprava IPA

Ako prvé boli pripravené roztoky opačne nabitých povrchovo aktívnych látok, z ktorých boli následne získané ion pair amphiphile (IPA). Roztok záporne nabitých PAL SDS ako aj kladne nabitých PAL CTAB, bol pripravený rozpustením navážky v deionizovanej vode. Navážka PAL odpovedala takému množstvu, aby výsledná koncentrácia roztoku činila $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vybraná koncentrácia $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je výrazne vyššie nad CMC povrchovo aktívnych látok. Takto pripravené roztoky boli ponechané na magnetickej miešačke po dobu 24 hodín, aby došlo k úplnému premiešaniu.

Po 24 hodinách boli tieto roztoky zmiešané v pomere 1 : 1. Výsledný roztok bol miešaný ďalších 24 hodín pri teplote $30 \text{ }^\circ\text{C}$, aby došlo k úplnému premiešaniu a vytvoreniu väzieb medzi

CTAB a SDS. Pri nižšej teplote by sa mohli tenzidy spätne vyzrážať a nedošlo by tak k úplnej interakcii ekvivalentného množstva povrchovo aktívnych látok. Počas miešania bol pozorovaný výskyt vyzrážaného CTA-DS v roztoku. Následne bol tento zmiešaný roztok s vytvoreným precipitátom centrifugovaný 10 min pri 3 500 otáčkach. Po centrifugácii bol získaný precipitát CTA-DS, ktorý bol oddelený od nežiadúceho supernatantu. Predposledným krokom bola filtrácia výsledného produktu a jeho premytie od prebytočných protiónov pomocou deionizovanej vody. Filtrácia prebehla na Büchnerovej nálevke s použitím filtračného papiera za zníženého tlaku. Finálnou úpravou získaného CTA-DS bolo sušenie pri 50 °C po dobu 3-5 dní. Bol získaný CTA-DS (IPA) vo forme prášku, ktorý bol použitý v ďalších krokoch.

4.2.2 Príprava katiónového vezikulárneho systému

Navážením a následným rozpustením požadovaného množstva vytvoreného CTA-DS v chloroforme vznikol roztok, ktorého výsledná koncentrácia predstavovala 2 mmol·dm⁻³. K tomuto roztoku boli do vialky pridané sklenené guľičky, ktoré slúžili na zväčšenie povrchu rozpustenej pevnej látky v chloroforme. Vialka bola zvortexovaná, aby sa guľičky dôsledne obalili. Po premiešaní bol z vialky dôkladne odparený chloroform a rozpustená látka zostala zachytená na sklenených guľičkách. Po odparení chloroformu bol vzniknutý film rehydratovaný pomocou potrebného množstva deionizovanej vody. Posledným krokom bola sonifikácia pomocou tyčového dispergátoru. Sonifikácia prebiehala pri 30% amplitúde do získania požadovaného množstva energie a čírosti vzorky, kedy 6 ml roztoku bolo potrebné dodať minimálnu energiu 5 kJ. Systém CTA-DS bol však veľmi nestabilný a aj pri dodaní vyššieho množstva energie bola vzorka zakalená.

4.2.2.1 Intravezikulárna stabilizácia systému prídavkom 43 mol. % cholesterolu

Nestabilita systému bola zlepšená prídáním cholesterolu k systému CTA-DS. Bolo navážené také množstvo cholesterolu, aby vo výslednom roztoku predstavoval 43 mol. % [61]. Navážka bola pridaná do vialky súčasne s navážením CTA-DS. Následne boli navážky zaliate chloroformom. Vzorka bola ďalej pripravená rovnakým postupom, ako je popísaný v kapitole 4.2.2. Systém CTA-DS s prídavkom cholesterolu bol stabilný a pri sonifikácii postačovalo dodanie 5 kJ energie pri 30% amplitúde.

4.2.2.2 Intervezikulárna stabilizácia systému prídavkom záporne nabitej amfifilnej látky

Ďalším stabilizačným prvkom bolo prídanie záporne nabitej amfifilnej látky. Ako amfifilná látka bola vybratá kyselina fosfatidová, ktorá dokáže zlepšiť fyzikálne vlastnosti membrány (viď 2.3.1.1) a taktiež jej dodá celkový záporný náboj, ktorý je potrebný na následnú interakciu s polykatiómi.

Kyselina fosfatidová bola pridávaná k systému CTA-DS+43 mol. % cholesterol v rôznych koncentráciách. Ako počiatočná koncentrácia bola vybraná hodnota 6 mol. % (inšpirovaná článkom [74]). Ďalej sme pokračovali prídavkom 10, 20 a 30 mol. %. Samotné vzorky boli pripravené navážením požadovaného množstva CTA-DS, cholesterolu a PA. Následne boli vzorky zaliate požadovaným množstvom chloroformu a taktiež metanolu, ktorý zabezpečil úplné rozpustenie kyseliny fosfatidovej. Ďalší postup prebiehal rovnako, ako je popísaný

v odstavci 4.2.2. Po sonifikácii sme získali číre, opalescentné vzorky, ktoré boli následne charakterizované.

4.2.3 Interakcia záporne nabitého kataniónového vezikulárneho systému s polykatiónmami

Pre interakciu záporne nabitého kataniónového vezikulárneho systému boli vybrané polykatióny dextrán hydrochlorid a N, N, N - trimetylchitosan. Pripravené stabilizované kataniónové vezikulárne systémy boli zmiešané so zásobnými roztokmi príslušných polykatiónov. Polykatióny boli k systémom pridávané v rôznych koncentráciách 0,01; 0,05; 0,1, 0,5 a 1 hm. %. Roztoky polykatiónov boli pripravené navážením potrebného množstva polykatiónu zodpovedajúcemu koncentrácii a zaliatím určeným množstvom deionizovanej vody. Tieto roztoky boli ponechané na magnetickej miešačke po dobu 24 hodín, aby došlo k úplnému rozpusteniu navážky v rozpúšťadle. Následne bol roztok CTA-DS+43 mol. % cholesterol + x mol. % PA zmiešaných v pomere 1 : 1 s roztokom polykatiónu. Tento systém bol miešaný po dobu 1 hodiny (inšpirácia článkom [69]), aby bolo dosiahnuté čo najlepšie obalenie vezikúl polykatiónom.

4.3 Meranie pripravených vzoriek a spracovanie výsledkov

Na charakterizáciu a potvrdenie vzniku vezikulárnych systémov bola v tejto diplomovej práci zvolená metóda stanovenia distribúcie veľkosti častíc a zeta potenciálu na prístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument). Meranie vzoriek bolo prevedené kvôli ich reprodukovateľnosti dvakrát.

Distribúcia veľkosti častíc bola získaná vďaka dynamickému rozptylu svetla. Meranie vzoriek prebiehalo v sklenených kyvetách pri 25 °C s kalibráciou 30 s. Laser snímal vzorku a rozptyl častíc vo fixnej polohe kyvety 1,0. Každá vzorka bola premeraná 3krát. Následne boli tieto 3 hodnoty spriemerované na výslednú hodnotu. Výstupom merania bola závislosť intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc. Na vyhodnocovanie merania bola taktiež využitá stredná hodnota veľkosti častíc (získaná z hodnôt Z-average). Táto hodnota bola získaná z inflexného bodu korelačnej krivky.

Po aplikácii DIP cell elektródy do kyvety so vzorkou a aplikáciou elektrického poľa bolo možné zmerať zeta potenciál. Táto hodnota bola určená vďaka metóde elektroforetického rozptylu svetla pomocou Smoluchovského modelu. Meranie prebiehalo pri 25 °C s kalibráciou 5 s. Výsledná hodnota zeta potenciálu bola spriemerovaná hodnotou piatich meraní.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto kapitole sa budeme zaoberať výsledkami, ktoré boli získané počas štúdia záporne nabitých kataniónových vezikulárnych systémov v interakcii s polykatiómi.

5.1 Kataniónový vezikulárny systém CTA-DS s 43 mol. % prídavkom cholesterolu

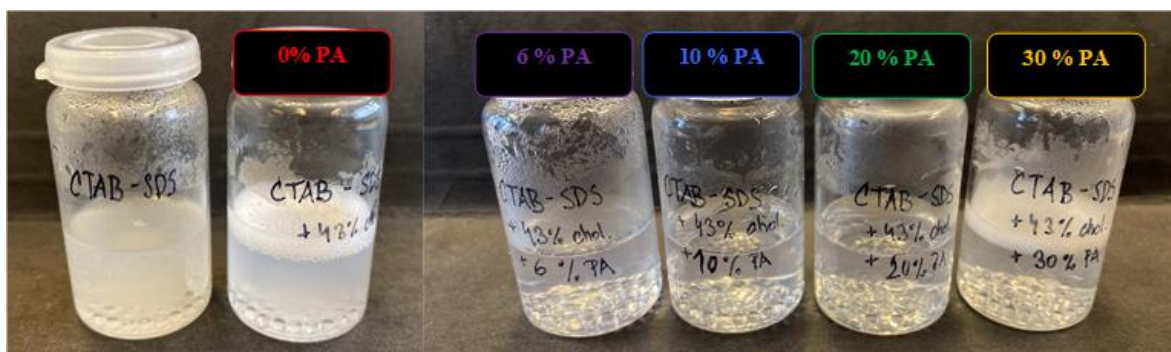
Základný systém CTA-DS bol veľmi nestabilný. Ako môžeme vidieť na *obr. 37*, vzorka bola aj po sonifikácii zakalená, nachádzali sa v nej častice viditeľné voľným okom a nebolo možné stanoviť veľkosť častíc ani zeta potenciál. Nestabilita vzorky môže byť pripisovaná nedostatočným odpudivým silám, kedy dochádza k agregácii vezikúl. Po prídavku 43 mol. % cholesterolu sme získali opalescentný roztok, ktorý bol podrobený meraniu DLS a ELS. Vďaka inkorporácii cholesterolu do vezikúl bola zvýšená ich stabilita (viď kapitola 2.3.1.1). Vo vzorke sa nachádzali častice so strednou veľkosťou okolo 209,8 nm a ich zeta potenciál bol -3,14 mV. Jedným z krokov v príprave kataniónových vezikulárnych systémov bolo dôkladné vymytie protiiónov. Zeta potenciál sa pohyboval okolo hodnoty 0, a tak bolo potvrdené vymytie protiiónov zo systému a celkový systém bol neutrálny.



Obr. 37 Vzorky CTA-DS a CTA-DS+43 mol. % cholesterolu po sonifikácii

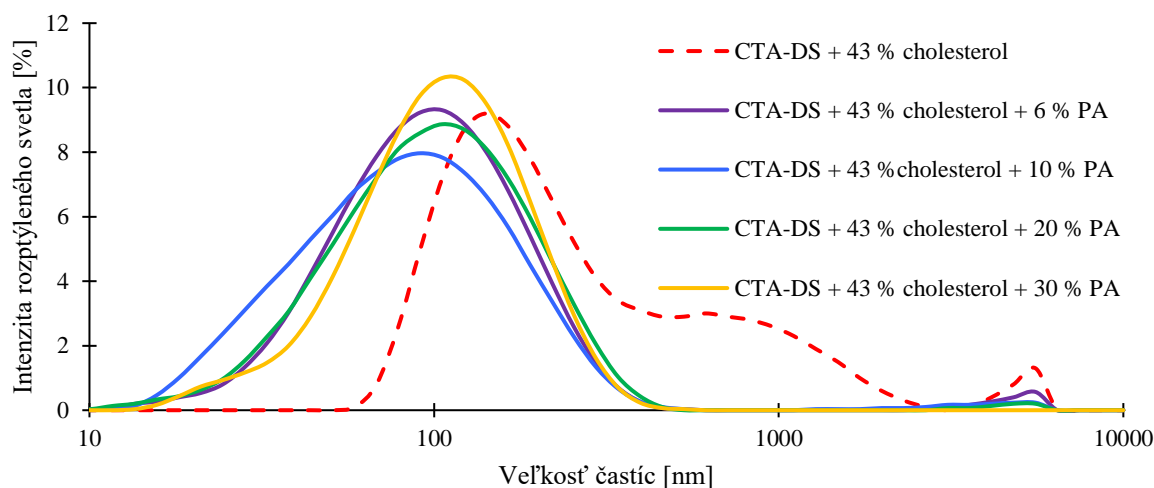
5.1.1 Kataniónový vezikulárny systém CTA-DS s 43 mol. % prídavkom cholesterolu a rôznymi molárnymi prídavkami kyseliny fosfatidovej

Ďalšia stabilizačná látka bola pridávaná kyselina fosfatidová. Kyselina fosfatidová v prídavkoch 6, 10, 20 a 30 mol. % prispela k výraznému zvýšeniu stability (popisované v kapitole 2.3.1.1), čo môžeme vidieť na *obr. 38*. Toto zvýšenie stability už cholesterolom stabilizovaného systému sa preukázalo nielen vizuálne, ale aj v hodnotách strednej veľkosti častíc a zeta potenciálu. Vzorky boli veľmi dobre reprodukovateľné.



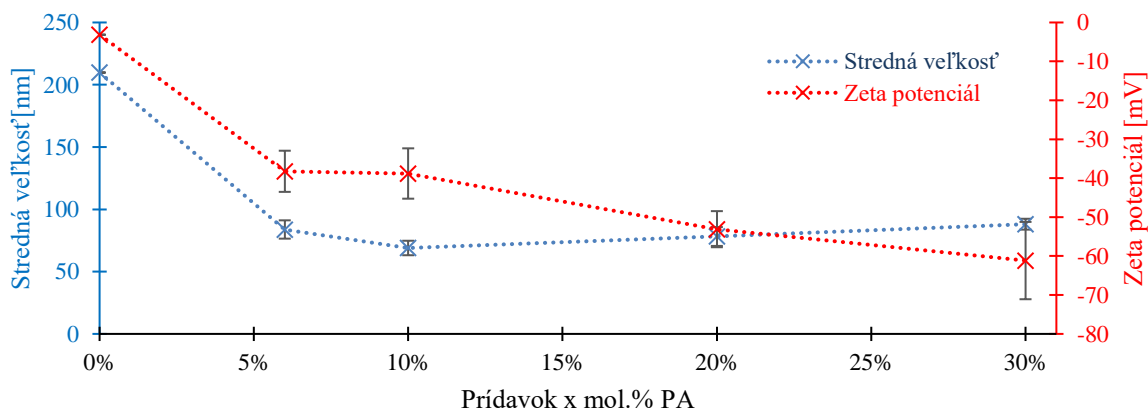
Obr. 38 Vzorky CTA-DS+43 mol. % cholesterol s prídavkom 6, 10, 20, 30 mol. % PA

Ako môžeme vidieť na obr. 39, u systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol vznikali vezikuly s väčšími rozmermi. Po pridaní prvého 6 mol. % prídavku kyseliny fosfatidovej sa posunula distribúcia častíc do menších rozmerov a zúžil sa pík distribučnej krivky. Bolo to spôsobené vďaka zvýšeniu elektrostatických odpudivých síl a následným znížením možnosti agregácie vezikúl. Veľkosť častíc sa teda výrazne zmenila z 209,8 nm v systéme CTA-DS + 43 mol. % cholesterol na $(83,81 \pm 7,33)$ nm. Následné pridávanie vyšších koncentrácií PA znižovalo distribúciu častíc už len veľmi mierne a veľkosť častíc sa zreteľne nemenila. Pri 30 mol. % prídavku PA bol dosiahnutý najvyšší pík distribúcie častíc a veľkosť sa pohybovala okolo $(88,06 \pm 4,36)$ nm.



Obr. 39 Distribúcia veľkosti vezikulárnych systémov CTA-DS+43 mol. % cholesterol s rôznym prídavkom PA

Hodnota zeta potenciálu $-3,14$ mV systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol, ktorá sa nachádzala v nestabilnej oblasti, sa po prídavkoch PA presúvala do záporných hodnôt. Tento jav potvrdil začlenenie kyseliny fosfatidovej do membrány vezikuly. Zeta potenciál odpovedal stabilnej oblasti a so zvyšujúcim sa prídavkom PA sa znižovala jeho hodnota, čo môžeme vidieť na obr. 40. Pri vyšších koncentráciách (20, 30 mol. %) sa dokázalo začleniť väčšie množstvo PA do vezikuly a celkový náboj systému sa výrazne zvyšoval.



Obr. 40 Porovnanie strednej veľkosti vezikúl so zeta potenciálom v závislosti na prídavku PA

5.2 Interakcia záporného kataniónového vezikulárneho systému s DEAE/TMC

Po príprave stabilných a reprodukovateľných záporne nabitých kataniónových vezikulárnych systémov, ktoré obsahovali 43 mol. % cholesterolu a rôzne koncentrácie (6, 10, 20 30 mol. %) PA, sme sa snažili o ich následnú interakciu s polykatiómi. Potvrdenie naviazania polykatiónu na vezikulárny systém sme sledovali pomocou posunu distribúcie veľkosti častíc a taktiež zmenou zeta potenciálu zo záporných hodnôt do kladných.

5.2.1 Interakcia s DEAE

Ako môžeme vidieť na obr. 41 a obr. 42, po pridaní rôznych koncentrácií polykatiónu DEAE k záporne nabitému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + x mol. % PA, sa každý systém správal vizuálne inak. Po prídavku DEAE k vezikulárnym systémom sme mohli pozorovať rôzne chovanie od vzniku opalescentného roztoku až ku vzniku zrazenín pozorovateľných voľným okom.

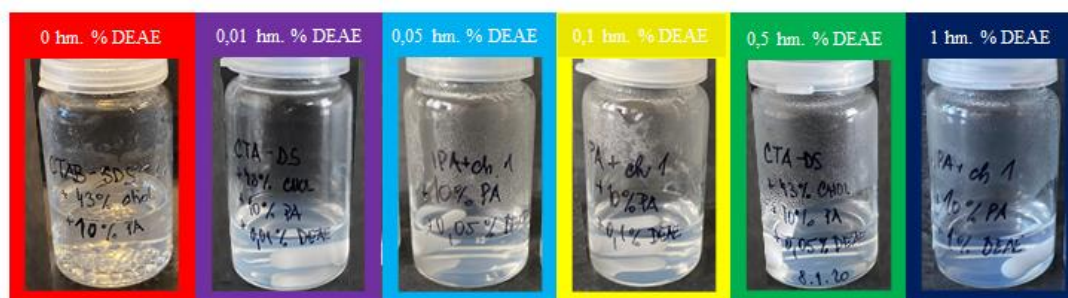
5.2.1.1 Záporné kataniónové vezikuly s 6 a 10 mol. % PA s rôznymi prídavkami DEAE

Vo vzorke s 6 mol. % PA sa po pridaní 0,01 hm. % DEAE vytvorili vyvločkované častice, ktoré pripomínali malé zrazeniny. Toto vyžrážanie mohlo byť spôsobené vyrovnaním náboja vzniknutej zmesi (viď obr. 41). S ďalšími zvyšujúcimi sa prídavkami DEAE bol roztok opalescentný a až pri prídavku 0,5 a 1 hm. % DEAE sme mohli pozorovať malé množstvo vzniknutých častíc viditeľných voľným okom (na obr. 41 nie sú častice dobre viditeľné).



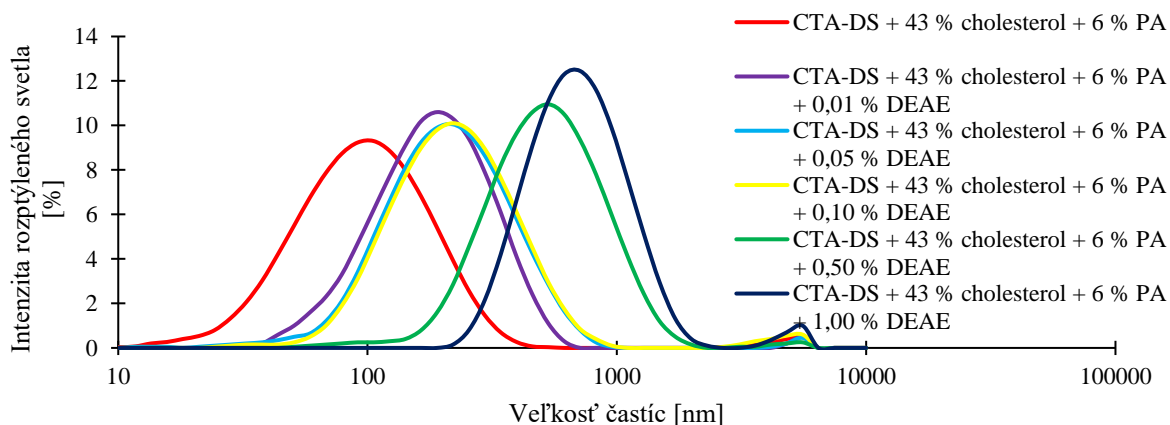
Obr. 41 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA + x hm. % DEAE

Pri vzorkách s 10 mol. % PA nám vznikali roztoky, ktoré boli opalescentné. Až pri vyšších koncentráciách, obdobne ako u predošlých vzoriek, došlo k malému výskytu častíc viditeľných voľným okom. U prídavku 0,01 hm. % bol jemne zvýšený zákal roztoku, avšak v tomto prípade sme nepozorovali vyvločkované častice.



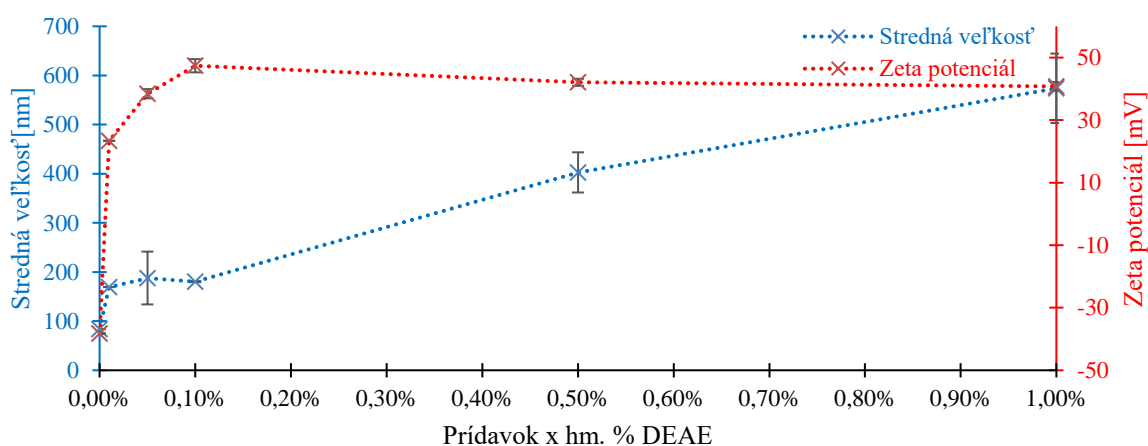
Obr. 42 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA + x hm. % DEAE

Už prvý prídavok 0,01 hm. % DEAE pridaný k systému s 6 mol % PA dokázal obaliť záporne nabitý vezikulárny systém, čo nám potvrdilo aj posunutie distribúcie veľkosti častíc. Stredná veľkosť častíc sa zmenila z 83,71 nm na 169,40 nm (obdobne ako v štúdiu [69]). Dva ďalšie prídavky 0,05 a 0,1 hm. % DEAE jemne zvyšovali veľkosť častíc v porovnaní s predošlou koncentráciou DEAE. Po pridaní 0,5 hm. % a 1 hm. % DEAE sa výrazne posunula distribúcia častíc, ako môžeme vidieť na obr. 43, od distribúcie častíc predošlých troch koncentrácií. Taktiež sa výrazne zväčšila stredná veľkosť systému na $(402,7 \pm 40,87)$ nm.



Obr. 43 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného DEAE

Zväčšenie systému môže byť spôsobené aj vznikajúcimi elektrostatickými odpudivými silami medzi nadbytočnými reťazcami DEAE v roztoku, ktoré sa už nedokázali naviazať na systém, kvôli nižšiemu obsahu PA. Toto nadbytočné množstvo DEAE v roztoku mohlo byť príčinou vzniku častíc viditeľných voľným okom.

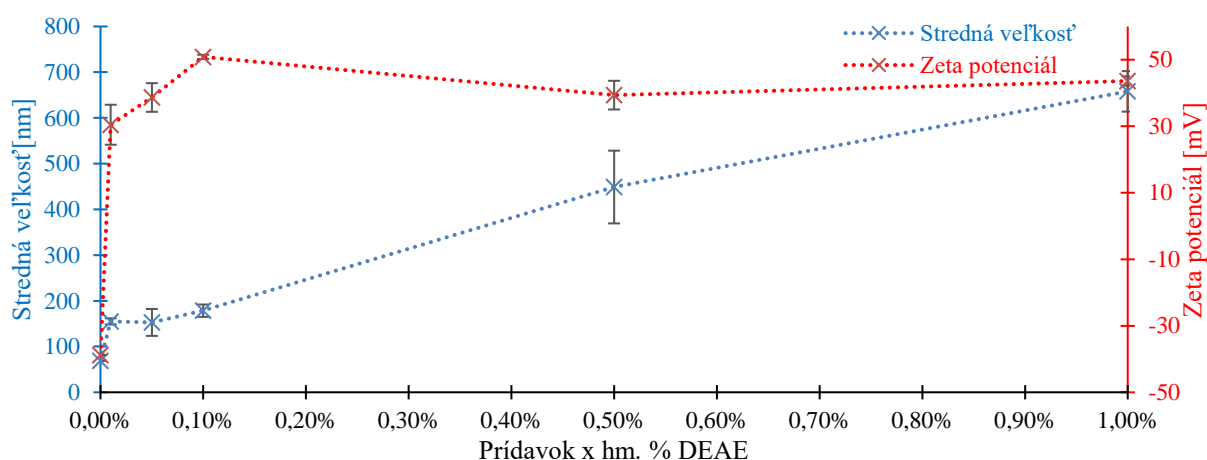


Obr. 44 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA + x hm. % DEAE na hodnote zeta potenciálu

Táto krivka potvrdzuje obalenie záporne nabitého vezikulárneho systému pomocou kladne nabitého DEAE. Už prvý prídavok 0,01 hm. % zvýšil hodnotu zeta potenciálu na 23,40 mV. Táto hodnota však poukazuje na nestabilitu systému, čo môže byť príčinou vzniku vyvločkových častíc nachádzajúcich sa v tejto vzorke. Ďalšie hodnoty zeta potenciálu

prechádzali do stabilnej kladnej oblasti. Najvyššia hodnota zeta potenciálu ($47,40 \pm 2,12$) mV bola získaná systémom s 0,1 hm. % prídavkom DEAE, ktorá poukázala na výraznú zmenu povrchového náboja, a tak potvrdila naviazanie DEAE. Ďalšie prídavky hodnotu zeta potenciálu výrazne nemenili.

Systém s obsahom 10 mol. % PA sa choval obdobne ako u 6 mol. % PA, keďže táto koncentrácia sa líši minimálne (vid' obr. 68). Ako môžeme vidieť na obr. 45, hodnota zeta potenciálu už pri prvom prídavku 0,01 hm. % DEAE poukazovala na stabilitu systému a zmenu hodnoty zeta potenciálu zo zápornej hodnoty do kladnej, čo taktiež potvrdilo obalenie systému. Táto hodnota bola ($30,45 \pm 6,01$) mV. Ďalej sa hodnota zeta potenciálu zvyšovala s prídavaným množstvom DEAE až po dosiahnutie hodnoty 0,1 hm. % DEAE ako aj v predošlom systéme s 6 mol. % PA. Po prekročení tejto koncentrácie sa hodnotu zeta potenciálu výrazne nemenila.



Obr. 45 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA + x hm. % DEAE na hodnote zeta potenciálu

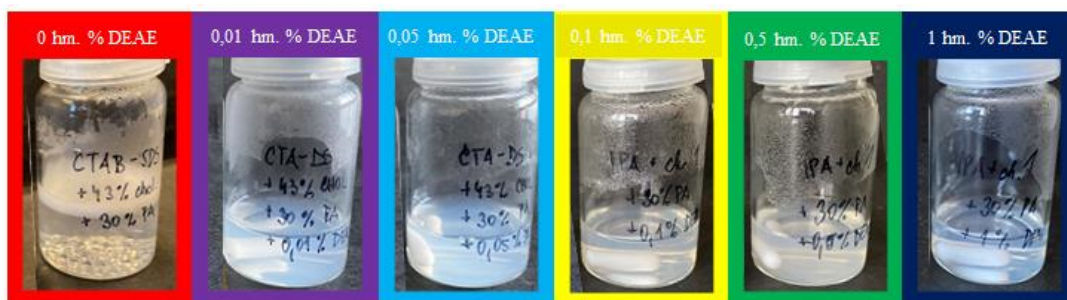
5.2.1.2 Záporné katiónové vezikuly s 20 a 30 mol. % PA s rôznymi prídavkami DEAE

Vezikulárny systém s 20 mol. % prídavkom PA interagoval s 0,01 hm. % DEAE za vzniku vyvločkovaných častíc. Ďalšie koncentračné prídavky DEAE sa prejavili opalescentným správaním roztoku, kedy sa miera zákalu so zvyšujúcim sa prídavkom znižovala (vid' obr. 46).



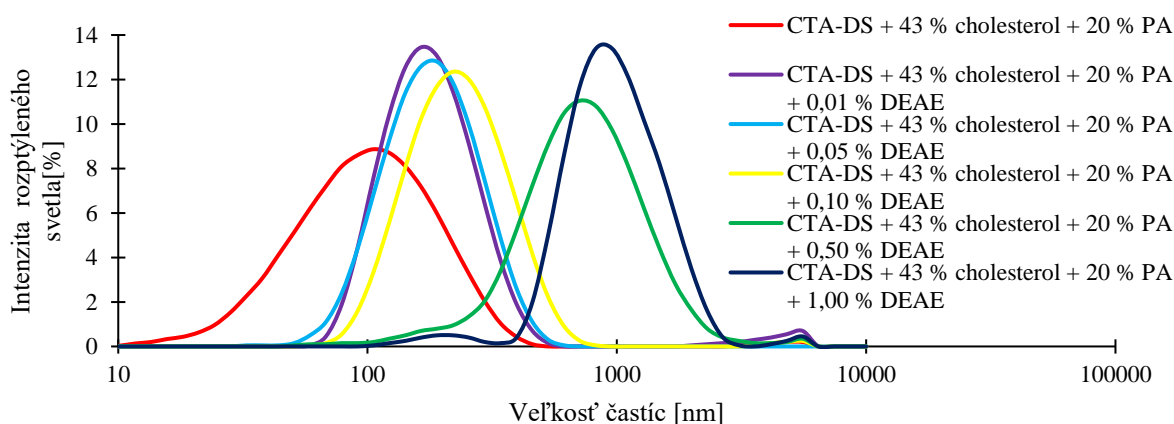
Obr. 46 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA + x hm. % DEAE

Systém s 30 mol. % prídavkom PA reagoval po prídavku DEAE obdobne ako systém s 20 mol. % PA, a to za vzniku opalescentných roztokov, ktorých intenzita sa znižovala so zvyšujúcim sa prídavkom DEAE. U prídavku 0,5 hm. % si môžeme všimnúť jemný zákal roztoku.



Obr. 47 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA + x hm. % DEAE

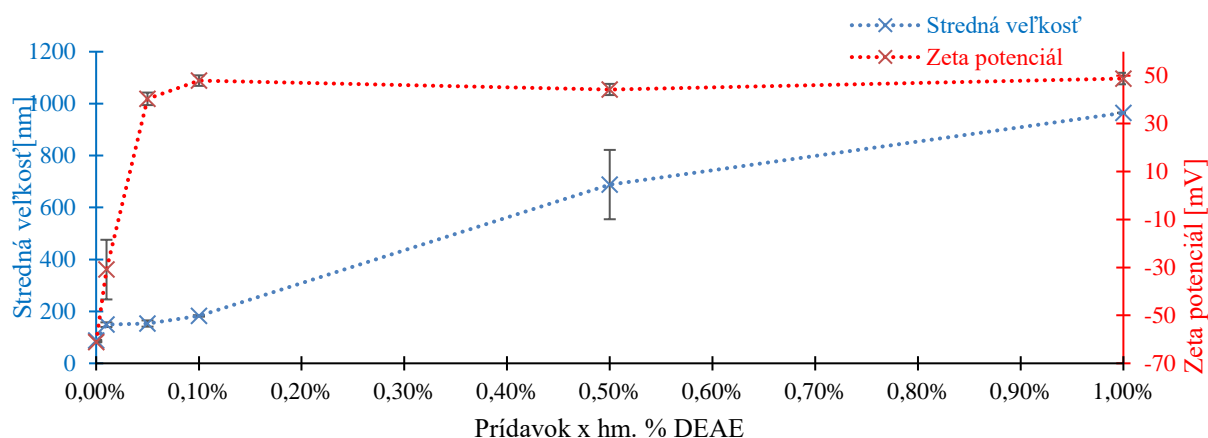
Stredná veľkosť častíc systémov s 20 mol. % prídavkom PA mala v prvých troch koncentráciách DEAE (0,01; 0,05; 0,1 hm.%) obdobný priebeh ako u predošlých systémoch. Pri 0,1 hm. % prídavku DEAE sme získali častice so strednou veľkosťou ($193,50 \pm 5,79$) nm. Ďalším prídavkom 0,5 hm. % DEAE sa posunul pík priebehu distribúcie častíc a získali sme strednú hodnotu veľkostí častíc ($574,30 \pm 49,78$) nm. V predošlých prípadoch viedla táto zvýšená koncentrácia k rozšíreniu distribučnej krivky a k znižovaniu hodnoty zeta potenciálu. V tomto prípade vďaka vyššej koncentrácii PA v prítomných vezikulách sa dokázalo naviazať viac reťazcov na záporne nabitú vezikulu a je veľká pravdepodobnosť, že pri tejto koncentrácii vznikla hrubšia vrstva naviazaného DEAE, čo by odpovedalo väčšej veľkosti získaných častíc. S ďalším prídavkom 1 hm. % sa mohli prejavovať elektrostatické odpudivé sily medzi nenaviazanými reťazcami DEAE.



Obr. 48 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného DEAE

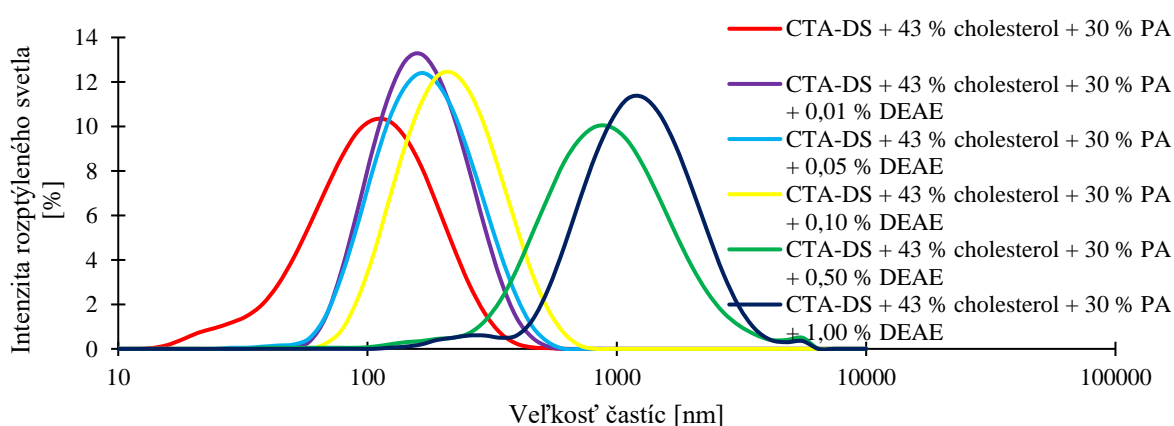
Prvý prídavok DEAE zmenil hodnotu zeta potenciálu na $(-20,35 \pm 11,95)$ mV. Táto hodnota poukazovala na neúplné pokrytie záporne nabitého systému polykationóm. V tomto prípade má systém väčší záporný náboj vďaka vyššiemu obsahu PA a koncentrácia 0,01 hm. % pridávaného DEAE je nepostačujúca na pokrytie celého systému. Tým pádom prevládala záporný náboj systému. Táto hodnota taktiež poukázala na to, že sa systém nachádzal v nestabilnej oblasti, čím mohli byť spôsobené už spomínané vyvločkované častice nachádzajúce sa vo vzorke. Koncentrácia 0,05 hm. % DEAE už bola postačujúca na úplné obalenie vezikulárneho systému, zeta potenciál nadobudol hodnotu $(39,35 \pm 1,62)$ mV, čo nám potvrdilo naviazanie DEAE a taktiež stabilitu systému. Najvyššia hodnota zeta potenciálu bola

dosiahnutá pri prídavku 0,1 hm. % DEAE ako aj u predošlých systémov. Následné sa zeta potenciál ďalších pridaných koncentrácií DEAE výrazne nemenil, ako môžeme vidieť na obr. 49.



Obr. 49 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA + x hm. % DEAE na hodnote zeta potenciálu

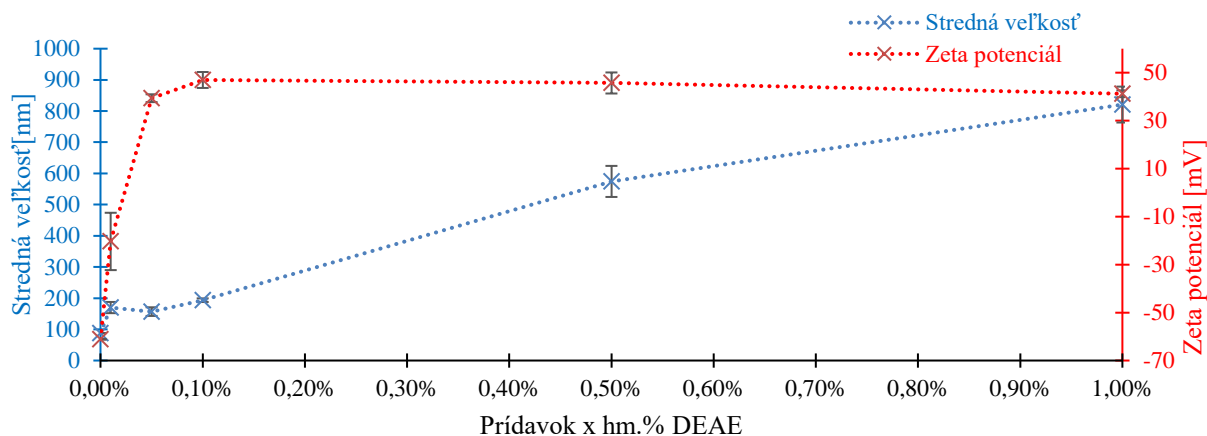
Systém s 30 mol. % ponúkal ešte vyššiu hustotu záporného náboja na povrchu vezikúl ako v predošlom (20 mol. % PA) prípade. Stredná veľkosť častíc sa tak isto aj v tomto prípade správala obdobne ako u predošlých systémoch. U 0,5 hm. % prídavku sme získali hodnotu strednej veľkosti častíc ($688,40 \pm 133,50$) nm, kde však odchýlka merania bola veľmi veľká, čo mohlo byť spôsobené vzniknutým zákalom roztoku. Táto vzorka mala taktiež rozšírený priebeh distribúcie častíc ako môžeme vidieť na obr. 50. Najväčšiu hodnotu strednej veľkosti častíc sme získali po prídavku 1 hm. % DEAE a to ($964,65 \pm 1,06$) nm. V tomto prípade mohol vzniknúť okolo záporne nabitej vezikuly rozsiahly obal tvorený kladne nabitým DEAE. Tento efekt mohol byť spôsobený vďaka hustému zápornému náboju dosiahnutý vysokou koncentráciou PA až 30 mol. %.



Obr. 50 Porovnanie zmeny veľkosti CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného DEAE

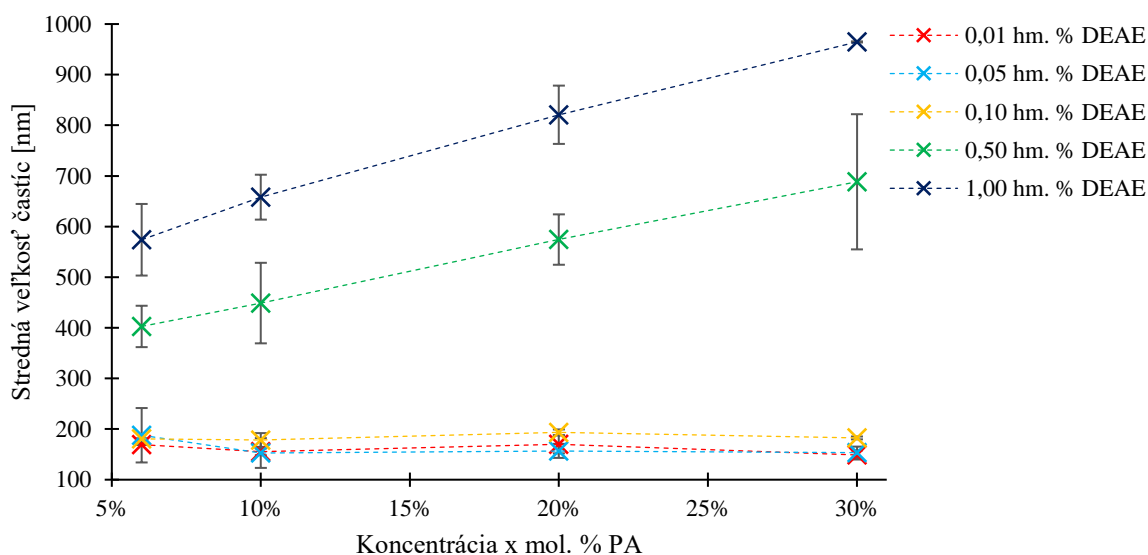
V tomto prípade sme u 0,01 hm. % prídavku získali stabilné vezikuly, ktorá však boli stále neúplne obalené DEAE kvôli jeho nedostačujúcej koncentrácii, čo sa prejavilo zápornou

hodnotou zeta potenciálu. Ďalšie prídavky DEAE zvyšovali hodnotu zeta potenciálu a potvrdilo sa úplné naviazanie kladne nabitého DEAE na záporný povrch vezikuly. Najvyššiu hodnotu zeta potenciálu sme získali pri prídavku 0,1 hm. % (viď obr. 51). Ďalším prídavkom sa zeta potenciál jemne znížil, čo mohlo byť spôsobené vzniknutým zákalom vo vzorke. Posledným prídavkom 1 hm. % DEAE sme nadobudli najvyššiu hodnotu zeta potenciálu ($48,80 \pm 2,40$) mV, ktorá poukazovala na kladný a veľmi stabilný vzniknutý systém.



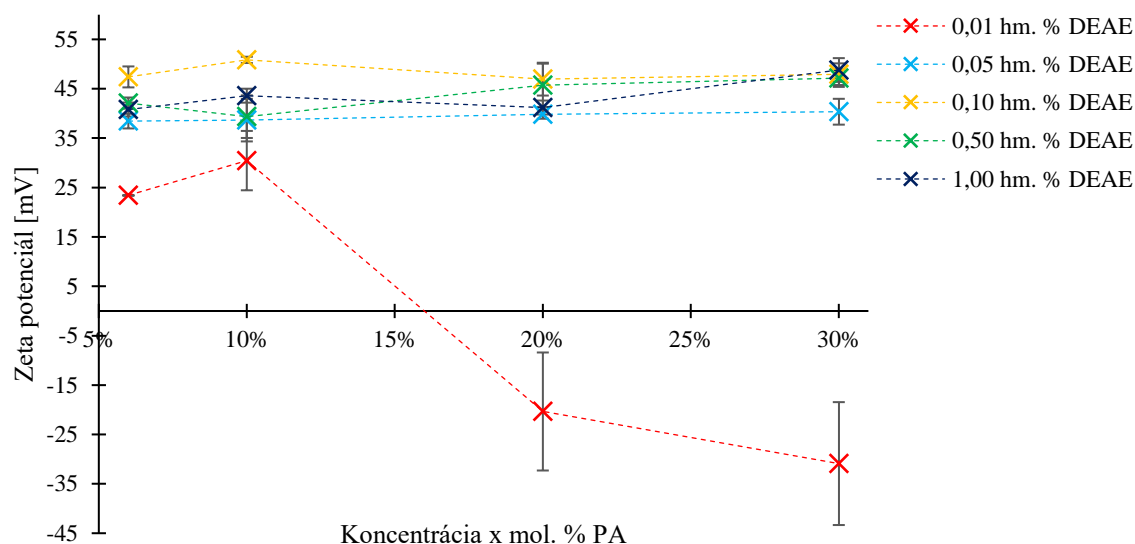
Obr. 51 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA+ x hm. % DEAE na hodnote zeta potenciálu

Prípravené záporné vezikulárne systémy interagovali s pridávanými koncentraciami DEAE v obdobnom trende. Pri zvyšovaní koncentrácie DEAE sa zvyšovala stredná veľkosť častíc ako môžeme vidieť na obr. 52. Prvé koncentrácie 0,01; 0,05 a 0,1 hm. % DEAE sa pohybovali približne na rovnakých stredných veľkostiach častíc. S výrazným zvýšením koncentrácie pridávaného DEAE sa zvýšila aj stredná veľkosť častíc.



Obr. 52 Zmena strednej veľkosti častíc v závislosti na zvyšujúcom sa prídavku DEAE a na koncentrácii PA

Naviazanie DEAE ovplyvňovala veľkosť pripravenej vezikuly a taktiež aj jej povrchový náboj ovplyvnený množstvom PA (vid' obr. 53). Zmena nastala v prípade 20 mol. % PA, kedy povrchový náboj vezikuly bol veľmi výrazný a pridané množstvo 0,01 hm. % DEAE nestačilo na úplné pokrytie vezikuly a prevažoval jej záporný náboj. Ďalšie prídavky DEAE boli postačujúce na úplné obalenie záporne nabitých vezikúl, na čo poukazuje kladná hodnota zeta potenciálu. Tieto pripravené systémy boli veľmi stabilné.



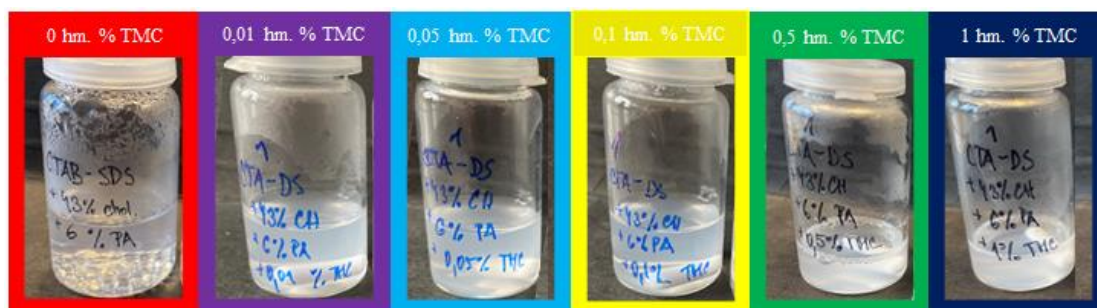
Obr. 53 Zmena zeta potenciálu v závislosti na zvyšujúcom sa prídavku DEAE a na koncentrácii PA

5.2.2 Interakcia s TMC

Na pokrytie záporne nabitých kataniónových vezikulárnych systémov bol využitý trimetylchitosan s kvartenizáciou 60 %. Vyšší stupeň kvartenizácie by mal zabezpečiť vyššiu hustotu náboja TMC, a tak môže vzniknúť dostatočne silná interakcia medzi záporne nabitými vezikulami a polykatiónom.

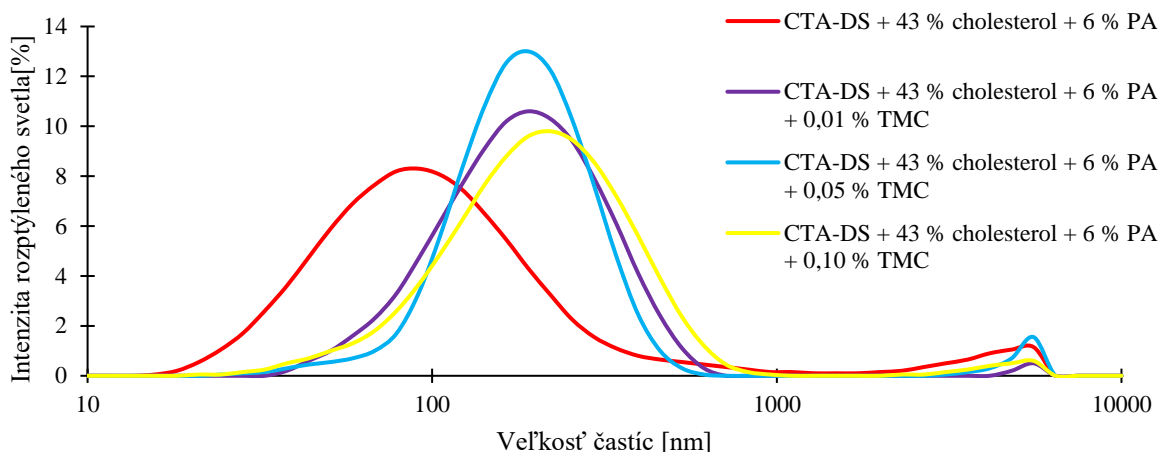
5.2.2.1 Záporné kataniónové vezikuly s 6 mol. % PA s rôznymi prídavkami TMC

Ako môžeme vidieť na obr. 54, pri prvých prídavkoch trimetylchitosanu nám vznikli opalescentné vzorky. Pri koncentrácii 0,5 a 1 hm. % TMC vznikol zakalený roztok s časticami viditeľnými voľným okom a tieto vzorky nebolo možné charakterizovať.



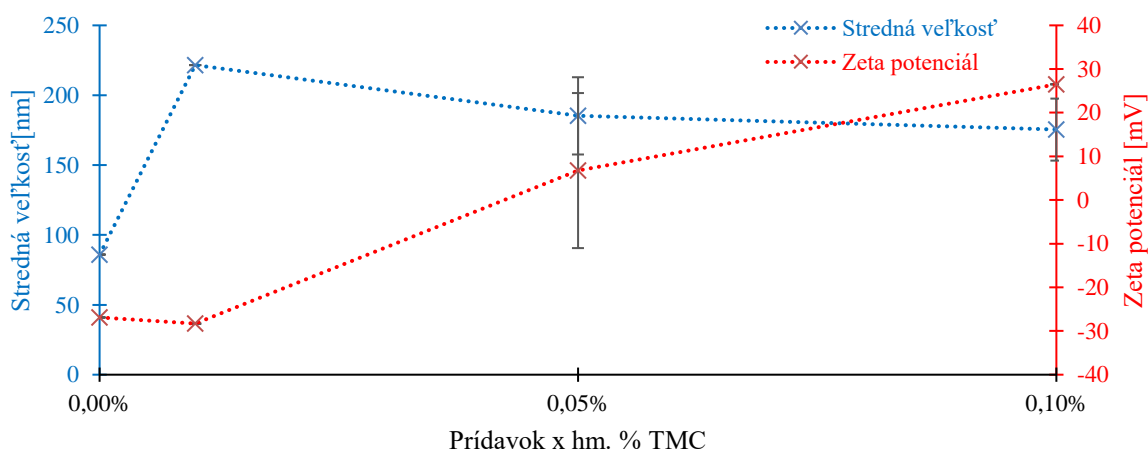
Obr. 54 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA + x hm. % TMC

Už prvým prídavkom 0,01 hm. % TMC sa posunula distribúcia veľkosti častíc, zúžil sa pík priebehu distribúcie (vid' obr. 55) a priemerná veľkosť častíc bola 221,55 nm.



Obr. 55 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného TMC

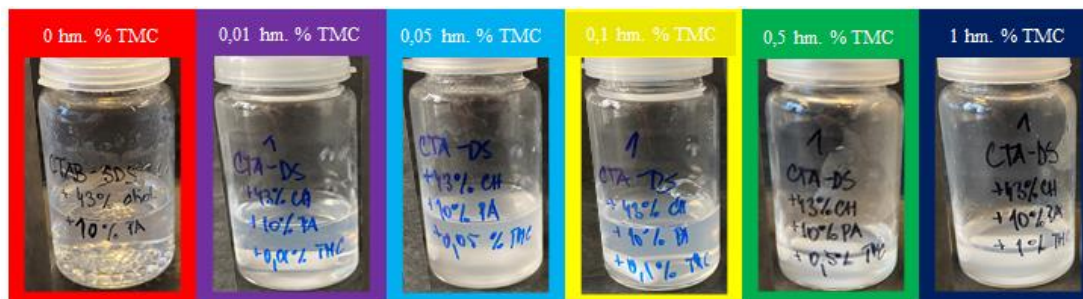
Avšak táto koncentrácia nebola postačujúca na úplné obalenie vezikulárneho systému, na čo poukázala hodnota zeta potenciálu. Došlo tak len k čiastočnému obaleniu vezikulárneho systému a stále prevládal celkový záporný náboj vezikuly, kedy jeho hodnota bola -28,3 mV. So zvyšujúcimi sa prídavkami TMC sa hodnota zeta potenciálu posúvala do kladných hodnôt. Pri 0,1 hm. % prídavku TMC bola dosiahnutá hodnota zeta potenciálu 26,5 mV. Kladná hodnota zeta potenciálu taktiež potvrdila nekovalentné naviazanie reťazcov TMC na záporne nabitý vezikulárny systém. Očakávaná vyššia hodnota strednej veľkosti častíc inšpirovaná štúdiami [70; 71; 73] nebola dosiahnutá. Mohlo to byť spôsobené nízkou koncentráciou PA. Vezikula neposkytovala toľko možných miest na naviazanie TMC, a tak aj vzniknutá vrstva okolo polyméru nebola až tak rozsiahla, pretože obsahovala len málo reťazcov. Taktiež bol TMC syntetizovaný na našej fakulte a mohol mať nižší stupeň kvartenizácie.



Obr. 56 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 6 mol. % PA + x hm. % TMC na hodnote zeta potenciálu

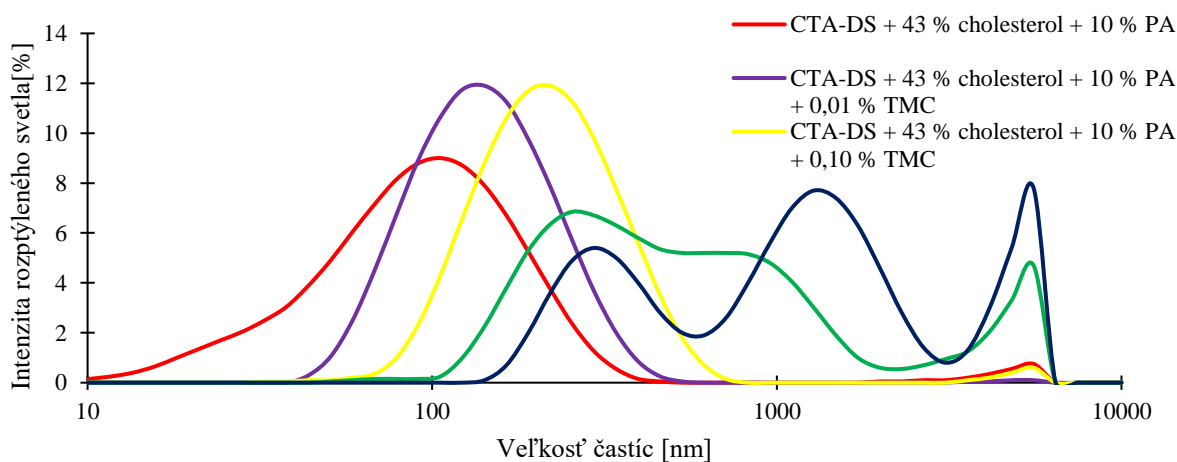
5.2.2.2 Záporné katiónové vezikuly s 10 mol. % PA s rôznymi prídavkami TMC

Katiónový systém s 10 mol. % PA sa pri prvom 0,01 hm. % prídavku TMC správal rovnako ako v systéme s 6 mol. % PA. S ďalším prídavkom (0,05 % TMC) však v roztoku vznikol zákal (vid' obr. 57) a túto vzorku nebolo možné charakterizovať.



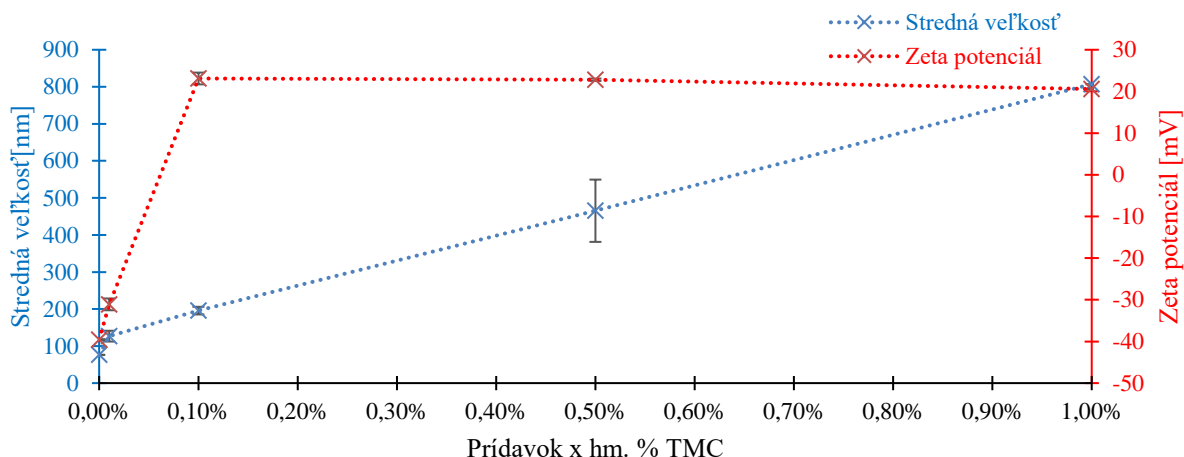
Obr. 57 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA + x hm. % TMC

Následne však ďalší prídavok 0,1 hm. % dokázal interagovať so záporne nabitou časticou za vzniku vezikúl o strednej veľkosti častíc ($195,7 \pm 10,32$) nm. Priebeh distribúcie bol posunutý a pík bol zúžený. U vyšších koncentráciách TMC sa vo vzorkách mohli nachádzať voľné reťazce TMC, ktoré sa neboli schopné naviazať na už obalené častice. Ako môžeme vidieť na obr. 58, priebeh distribúcie zodpovedá niekoľkým veľkostiam častíc nachádzajúcich sa v tejto vzorke.



Obr. 58 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného TMC

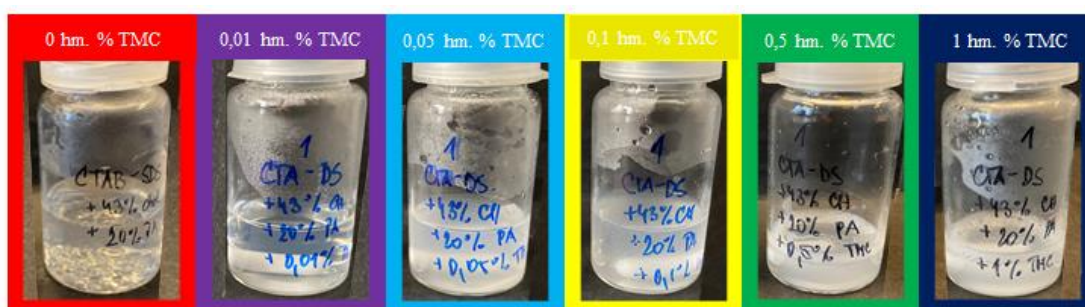
Koncentrácia prvého prídavku 0,01 hm. % TMC nebola dostatočná na úplné obalenie vezikuly. Úplné obalenie bolo dosiahnuté až prídavkom 0,1 hm. % TMC, na čo poukazuje aj hodnota zeta potenciálu, ktorá prešla zo zápornej hodnoty do kladne. Aj keď sa podarilo úplné pokrytie vezikulárneho systému záporne nabitým TMC, systém sa stále nachádzal v nestabilnej oblasti.



Obr. 59 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA + x hm. % TMC na hodnote zeta potenciálu

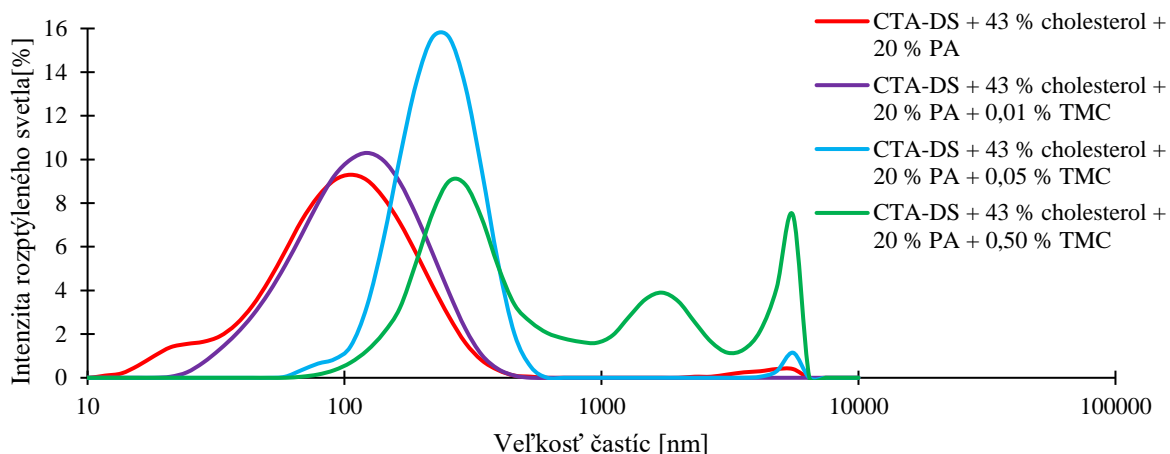
5.2.2.3 Záporné katiónové vezikuly s 20 mol. % PA s rôznymi prídavkami TMC

Vyššia koncentrácia náboja na povrchu vezikuly nám umožnila zväčšenie celkového systému do obdobnej veľkosti (viď kapitola 3.3.1.2). Prídavok TMC 0,1 hm. % a 1 hm. % nebolo možné zmerať kvôli vzniknutému zákalu. Častice viditeľné voľným okom pripomínali vyzrážané vločky, ktoré by mohli poukazovať na možné vyrovnanie náboja systému, ktoré sa prejaví ako zrazenina.



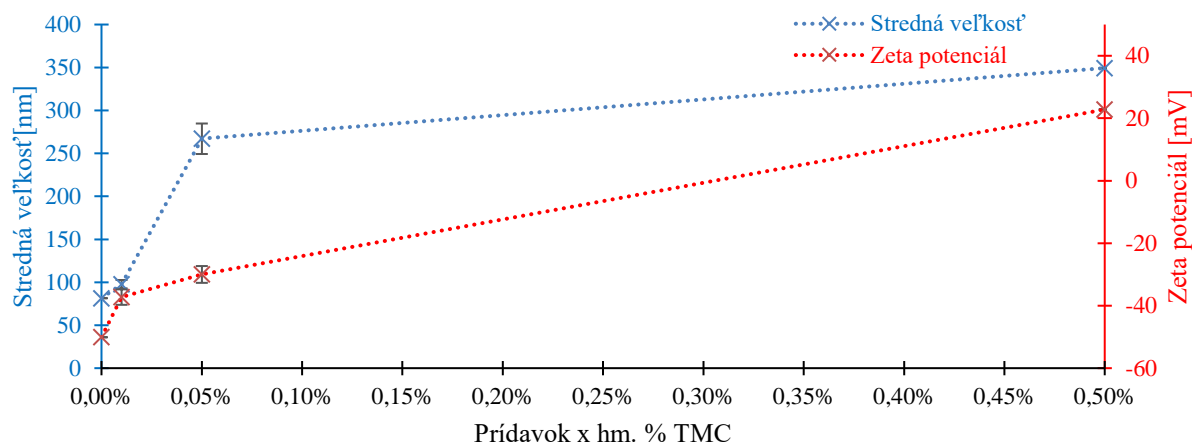
Obr. 60 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA + x hm. % TMC

Prídavok 0,01 hm. % TMC nepostačoval na pokrytie vezikuly, čo sa preukázalo širšou, príliš nezmenenou distribúciou v porovnaní so vzorkou bez prídavku TMC a minimálnym zväčšením strednej veľkosti vezikúl. Avšak po prídavku 0,05 hm. % sa distribúcia veľkosti častíc výrazne posunula a zúžil sa pík priebehu distribúcie. Stredná veľkosť častíc odpovedala ($267,05 \pm 17,75$) nm. U 0,5 hm. % prídavku TMC vznikli vezikuly o strednej veľkosti častíc 349,30 nm, ale priebeh distribúcie bol široký a poukazoval na výskyt viacerých veľkostných frakcií v tejto vzorke.



Obr. 61 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného TMC

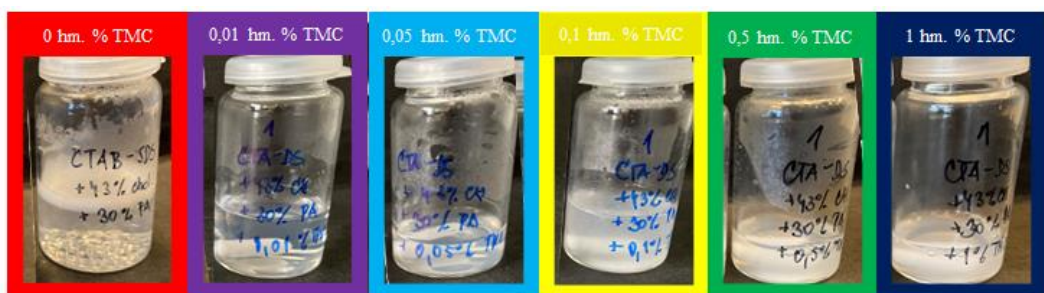
Positívny nárast veľkosti častíc však u vzorky s prídavkom 0,05 hm. % TMC nepotvrdil úplné pokrytie systému reťazcami TMC. Zeta potenciál tohto systému bol $(-30,00 \pm 2,69)$ mV, čo poukazuje na nedokonalé pokrytie systému reťazcami TMC a stálu prevahu záporného náboja vezikulárneho systému. Až v systéme s 0,5 hm. % prídavkom TMC sme sa presunuli do kladných hodnôt, kedy sú pravdepodobne úplne pokryté vezikulárne systémy polykatiónom TMC. V tomto prípade môžu vznikáť aj agregáty, čomu odpovedá priebeh distribúcie veľkosti častíc.



Obr. 62 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 20 mol. % PA + x hm. % TMC na hodnote zeta potenciálu

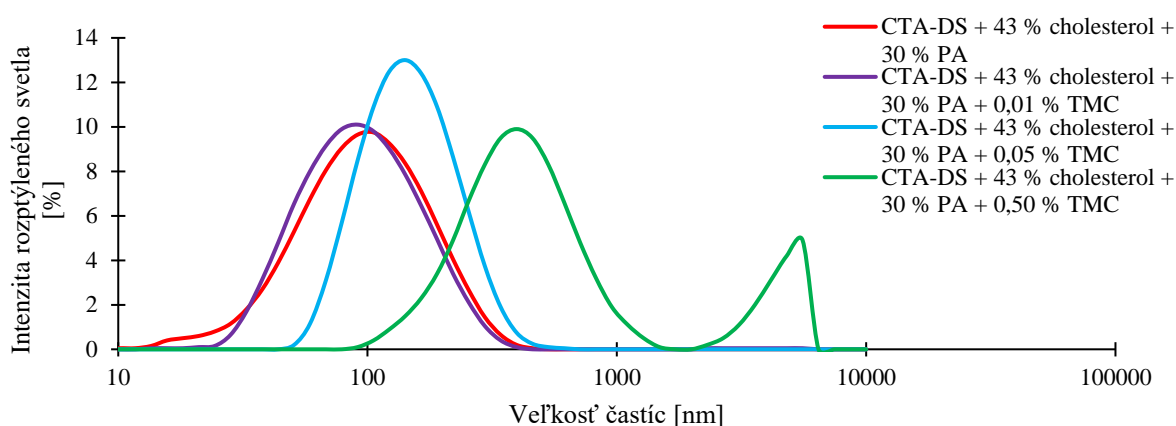
5.2.2.4 Záporné katiónové vezikuly s 30 mol. % PA s rôznymi prídavkami TMC

Systém s 30 mol. % prídavkom PA sa správal obdobne ako v kapitole 5.2.2.3. V prípade vzorky s 0,1 a 1 hm. % prídavkom TMC opäť vznikol zákal, častice viditeľné voľným okom a charakterizácia týchto systémov nebola možná.



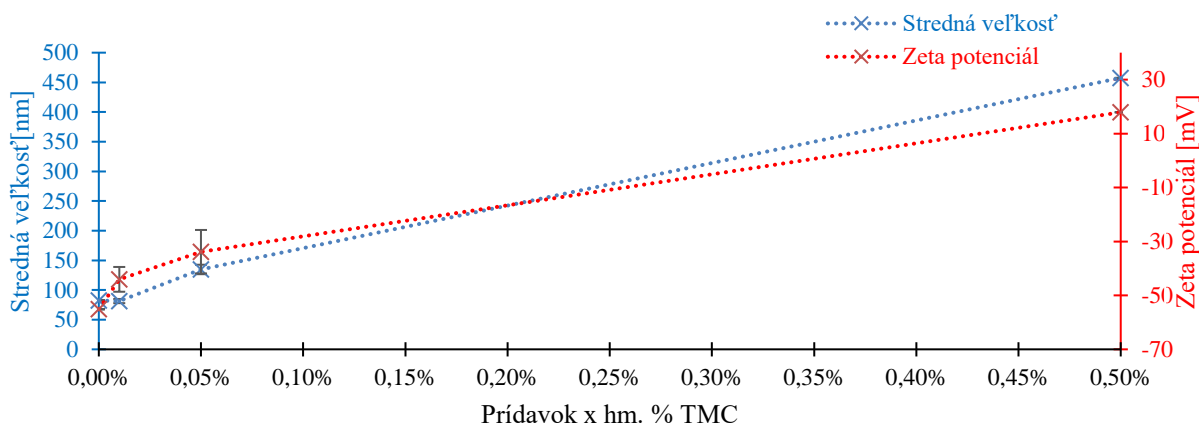
Obr. 63 CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA + x hm. % TMC

V porovnaní s predošlým systémom s 0,5 hm. % prídavkom TMC nám vznikli vezikulárne systémy so strednou veľkosťou častíc 457,50 nm, čo opäť potvrdilo naviazanie TMC a pík priebehu distribúcie sa výrazne zúžil.



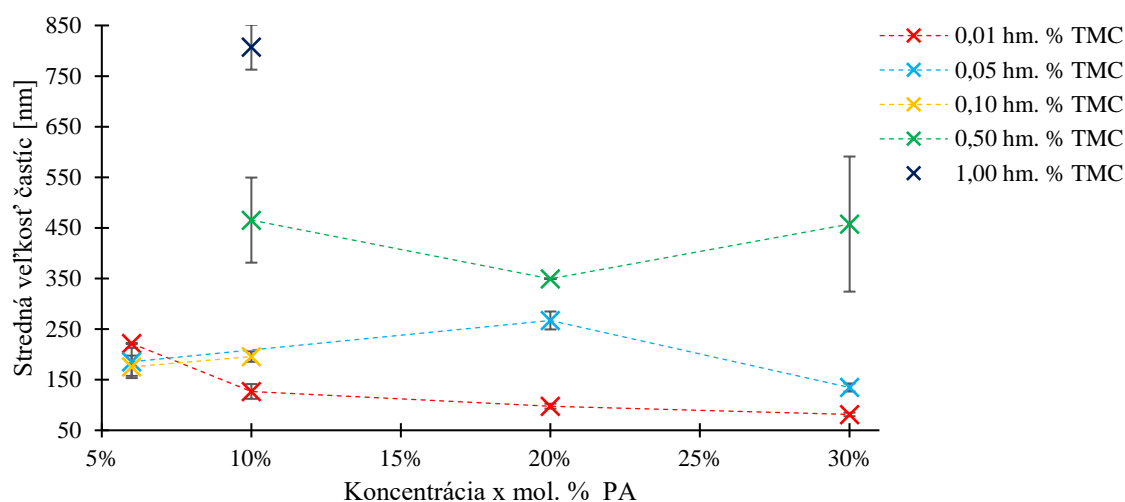
Obr. 64 Porovnanie zmeny veľkosti CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného TMC

Distribúcia veľkosti častíc stále poukazuje na možné vzniknuté agregáty s väčšou veľkosťou, avšak výskyt týchto väčších častíc nie je až taký veľký. Zeta potenciál tohto systému sa však nachádzal v nestabilnej oblasti. Jeho hodnota bola 17,9 mV.



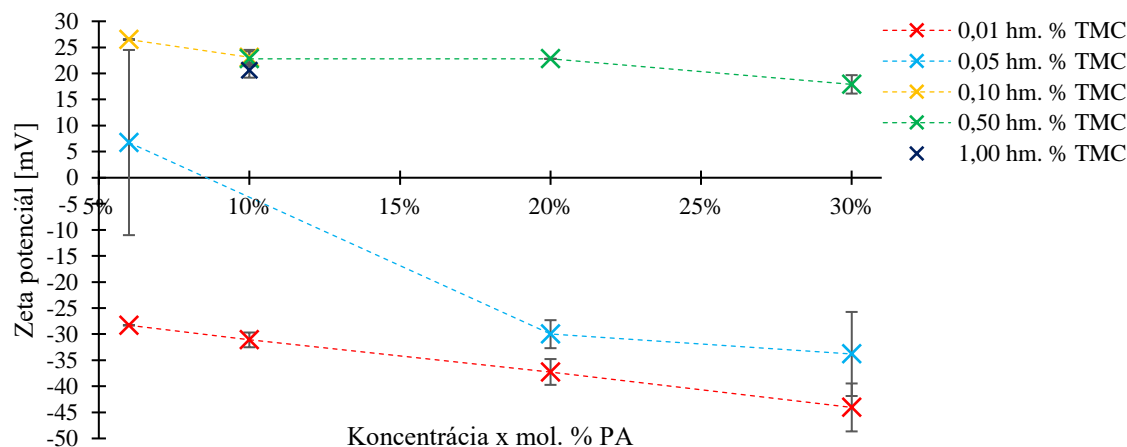
Obr. 65 Závislosť strednej veľkosti častíc systému CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 30 mol. % PA + x hm. % TMC na hodnote zeta potenciálu

TMC reagovalo so vzniknutými vezikulárnymi systémami rôzne. Pri prídavku 0,01 hm. % došlo k interakcii medzi všetkými vezikulárnymi systémami s rôznym obsahom kyseliny fosfatidovej. Pri vyšších koncentráciách sme v niektorých prípadoch dosiahli očakávané väčšie veľkosti vezikúl, avšak na úkor stability systému (hodnota zeta potenciálu nachádzajúca sa v nestabilnej oblasti -30 mV až +30 mV vid' obr. 67).



Obr. 66 Zmena strednej veľkosti častíc v závislosti na zvyšujúcom sa prídavku TMC a na koncentrácii PA

Vizuálne pozorovanie (zákal) pripravených vzoriek nám potvrdili aj hodnoty zeta potenciálu. V prípade 0,01 hm. % prídavku TMC sme sa nachádzali v stabilnej oblasti. Hodnota zeta potenciálu však bola záporná pre nedostačujúcu koncentráciu TMC na úplné obalenie vezikuly. Pri zvyšujúcich sa prídavkoch TMC sa nám začali vo vzorkách objavovať zákaly a vyzrážané častice. Tento efekt sa následne odrazil v hodnotách zeta potenciálu, ktoré sa nachádzali v nestabilnej oblasti, aj keď už koncentrácia TMC bola postačujúca na obalenie celej záporne nabitej vezikuly. 1 hm. % prídavok TMC už bol príliš koncentrováný. Reťazce nenaviazané na vezikulu pravdepodobne zatieňovali vzniknuté komplexy a bolo to viditeľné aj na výraznom zákale vzorku. Tieto pripravené systémy sme nedokázali charakterizovať hodnotami zeta potenciálu.



Obr. 67 Zmena zeta potenciálu v závislosti na zvyšujúcom sa prídavku TMC a na koncentrácii PA

V tomto prípade sa ako najlepšia kombinácia javí systém s 6 mol. % prídavkom kyseliny fosfatidovej v kombinácii s 0,1 hm. % TMC. Vznikali častice o strednej veľkosti ($175,4 \pm 22,2$) nm s hodnotou zeta potenciálu 26,50 mV.

Veľkosť lipozómov pripravených v štúdiách, ktorými sme sa inšpirovali, bola väčšia. Naše systémy nadobúdali menšiu veľkosť celkového systému, čo by však mohlo byť v možných medicínskych aplikáciách pozitívne. Pri aplikácii týchto systémov ako nosičov liečiv a celkovej aplikácie, ľahšie prenikajú do bunky častice o menšej veľkosti ako častice s väčšími rozmermi. Zeta potenciál sa približoval veľkosti v *tab. 1* a mohol by byť postačujúci pri interakcii vezikulárnych systémov s negatívne nabitými časťami lokalizovanými na bunke.

6 ZÁVER

Prvými dvoma cieľmi tejto diplomovej práce bolo na základe literárnej rešerše zvoliť vhodnú záporne nabitú amfifilnú látku, ktorá by dokázala stabilizovať vybraný systém inšpirovaný prebiehajúcim projektom na našej fakulte. Vďaka tejto stabilizácii a vytvoreniu záporne nabitého vezikulárneho systému nájsť polykatióny vhodné na spoločnú interakciu.

Základný kataniónový vezikulárny systém pozostával z bežne dostupných a lacných alternatív k fosfolipidom, povrchovo aktívnych látok. Ako záporne nabitá povrchovo aktívna látka bol použitý dodecylsírán sodný a ako kladná povrchovo aktívna látka cetyltrimetylamónium bromid. Na všeobecné zlepšenie fluidity dvojvrstvy a stability bol do systému zakomponovaný lipid, cholesterol. Cholesterol je dôležitou zložkou nášho tela a jeho použitie pozitívne ovplyvňuje výsledný systém. Druhým lipidom v tomto systéme bola vybraná záporne nabitá amfifilná látka, kyselina fosfatidová. Kyselina fosfatidová má taktiež priaznivé účinky na dvojvrstvu a týmto pridaným komponentom sme docieli nielen zvýšenie stability systému, ale aj jeho celkový záporný náboj. Následne takto pripravený systém mohol interagovať s vybranými polykatiónami. Dextrán hydrochlorid je veľmi známym polyelektrolytom využívaným na našej fakulte vďaka svojej biokompatibilite, biodegradabilite a už terajším využívaním v medicíne. A tak aj pre nás bol vhodnou voľbou. Ďalším polykatiómom bol vybraný trimetylchitosan. Trimetylchitosan je modifikovaný chitosan, ktorý má lepšie mukoadhezívne a antibakteriálne vlastnosti, a čo je najdôležitejšie, jeho rozpustnosť nie je limitovaná pH rozpúšťadlom ako u chitosanu. S takto namodelovaným záporne nabitým systémom v interakcii s polykatiónami sme mohli splniť tretí cieľ tejto práce, a to jeho príprava a charakterizácia pomocou vhodne vybranej inštrumentálnej techniky – DLS a ELS.

Samotný systém CTA-DS je veľmi nestabilný a nebolo možné ho charakterizovať, avšak prídavok cholesterolu dokázal tento systém výrazne stabilizovať. Po prídavku 6, 10, 20 a 30 mol. % PA sme získali stabilné a veľmi dobre reprodukovateľné systémy, ktoré boli využité na interakciu s vybranými polykatiónami v koncentráciách 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; a 1 hm. %. So zvyšujúcim sa prídavkom PA sa zväčšovala stredná veľkosť častíc a zeta potenciál sa znižoval. Systém s prídavkami kyseliny fosfatidovej bol stabilný a prejavoval sa výrazný záporný povrchový náboj u vyšších koncentráciách PA.

Následne bol k pripraveným stabilizovaným záporne nabitým systémom pridávaný roztok polykatiónu v pomere 1 : 1. U DEAE bol trend v koncentračných prídavkoch obdobný. Získali sme optimálnu koncentráciu 0,1 hm. % DEAE v systémoch s 6 a 10 mol. % PA, kedy vyššia koncentrácia DEAE výrazne nemenila veľkosť častíc, pretože už nedošlo k naviazaniu polykatiónu na vezikuly. Zeta potenciál taktiež nadobudol v tomto bode najvyššiu hodnotu a systém bol stabilný. U systémov s ďalšími prídavkami 20 a 30 mol. % PA sa pri vyššom prídavku DEAE vytvorili vezikuly s väčšou strednou veľkosťou. V prípade 20 mol. % PA to bola hodnota $(574,30 \pm 49,78)$ nm a 30 mol. % PA pri 1 hm. % prídavku DEAE až $(964,65 \pm 1,06)$ nm. Tieto väčšie stredné veľkosti vezikúl boli spôsobené vďaka hustejšiemu povrchovému náboju pripravených vezikúl (vyšší obsah PA) a vytvoreniu rozsiahlejšej vrstvy DEAE. V kombinácii rôzne intenzívne nabitých vezikulárnych systémov a rôznych koncentračných prídavkoch DEAE, tak vieme ovplyvniť a manipulovať so strednou veľkosťou častíc, čo nám ponúka širokú možnosť uplatnenia.

V prípade pridávaného TMC každý systém reagoval inak. Najvhodnejší pripravený systém bol s 6 mol. % prídavkom PA v interakcii s 0,1 hm. % TMC. Tento systém mal optimálnu veľkosť a kladný zeta potenciál. Vo všetkých štúdiách zameraných na kombináciu vezikulárnych systémov s TMC sa veľkosti pohybovali okolo 300 nm. V našom prípade bola veľkosť pripraveného systému ($175,4 \pm 22,2$) nm. Na prvý pohľad odrádzajúci fakt môže poukazovať na využiteľnosť nami pripravených systémov. Príliš veľké systémy sú pre cieľnú distribúciu liečiv a cieľný prechod bunkou nežiadúce. Naš pripravený systém sa pohybuje vo veľkosti bežne využívajúcich sa lipozómov použitých na enkapsuláciu rôznych látok. Keďže výsledná vrstva TMC neovplyvní mieru enkapsulácie do vnútorného priestoru a nezmení sa objem celkovej vezikuly, tieto systémy sú zaujímavé z hľadiska ich veľkosti a následného využitia.

Posledným cieľom tejto diplomovej práce bolo poukázať na možné uplatnenie systému vo farmaceutickom priemysle. Na základe rešerše a vykonaných experimentoch sa nám podarilo pripraviť systém, ktorý po ďalšom hlbšom preskúmaní by mohlo nájsť uplatnenie aj vo farmácii. Tento systém nám ponúka širokú možnosť modifikácie rôznymi látkami. Do jeho endovezikulárneho vodného priestoru môžeme enkapsulovať hydrofilné liečivo alebo fragmenty RNA/DNA. Dvojvrstvový obal ponúka priestor pre lipofilné liečivá a povrch vezikuly môžeme modifikovať pomocou povrchovo funkčných molekúl alebo ligandov. Následné obalenie vezikulárneho systému polykationmi ochráni samotnú vezikulu pred nežiadúcimi enzýmami a proteínmi a dopomôže ku prestupu vezikúl bunkou.

Tento systém bol skúmaný na našej fakulte prvýkrát, a tak je ešte veľa ďalších možností charakterizácie pripravených obalených vezikulárnych systémov. Ako ďalšiu metódu overenia vzniknutých vezikúl by bolo možné použiť fluorescenčnú spektroskopiu, kde by do systému boli zakomponované fluorescenčné sondy (napr. Laurdan). Ďalšou štúdiou by mohlo byť otestovanie enkapsulácie hydrofilnej látky do endovezikulárneho priestoru častice. Potvrdenie enkapsulácie by sa mohlo uskutočniť pomocou UV-VIS.

Nami namodelovaný systém s TMC má potenciálne uplatnenie v inhalačnom podávaní liečiv a s DEAE ako topické podanie alebo taktiež ako intravenózne podanie vo forme injekčného roztoku s rôzne enkapsulovanými liečivými látkami, kontrastnými látkami alebo modifikované antigénmi.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] LU, Huiling, Isabelle PEZRON, Théophile GAUDIN a Audrey DRELICH. Non-equilibrium micelles formed by sugar-based surfactants under their Krafft temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2018, 540, 167-176 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.12.053. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775717311500>
- [2] What are surfactants and how do they work? *Biolin Scientific* [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://blog.biolinscientific.com/what-are-surfactants-and-how-do-they-work>
- [3] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [4] Surfactants & critical micelle concentration (CMC). Data Physics: *Understanding interface* [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>
- [5] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x.
- [6] SEDLAŘÍKOVÁ, PH.D., Ing. Jana. *CHEMIE A TECHNOLOGIE TENZIDŮ II* [online]. FAKULTA TECHNOLOGICKÁ UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/29914679-Chemie-a-technologie-tenzidu-ii.html>
- [7] TENZIDY, TYPY, SUROVINY NA VÝROBU. <https://www.fchpt.stuba.sk/> [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <http://www.chtf.stuba.sk/kot/otp/172.pdf>
- [8] Povrchově aktivní látky. *MUNI* [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: Povrchově aktivní látky
- [9] LIU, H., Yu. GAO a Z. HU. Determination of critical micelle concentration values by capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2007, 62(2), 176-178 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1134/S106193480702013X. ISSN 1061-9348. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S106193480702013X>
- [10] Dodecylsulfát sodný - Sodium dodecyl sulfate. *Wiki* [online]. [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: https://cs.qwe.wiki/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate
- [11] PRASAD NIRLAULA, Tulasi, Ajaya BHATTARAI a Sujeet KUMAR CHATTERJEE. Sodium dodecylsulphate : A very useful Surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*. 2014, (2), 111-113. ISSN 2350-8884(P).

- [12] LOMBARDO, Domenico, Mikhail A. KISELEV, Salvatore MAGAZÚ a Pietro CALANDRA. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Advances in Condensed Matter Physics* [online]. 2015, 2015, 1-22 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1155/2015/151683. ISSN 1687-8108. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/acmp/2015/151683/>
- [13] Hexadecyltrimethylammonium bromide. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/52367?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite_-_caRecBlock_recBlock_cooccuranceModel_-_recBlock5-1
- [14] Final Report on the Safety Assessment of Cetrimonium Chloride, Cetrimonium Bromide, and Steartrimonium Chloride. *International Journal of Toxicology* [online]. 2016, 16(3), 195-220 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1080/109158197227152. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/109158197227152>
- [15] AZMAT, Muhammad Abubakkar, Iqrar Ahmad KHAN, Hafiza Masooma Naseer CHEEMA, Ishtiaq Ahmad RAJWANA, Ahmad Sattar KHAN a Asif Ali KHAN. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* [online]. 2012, 13(4), 239-243 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1631/jzus.B1100194. ISSN 1673-1581. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1100194>
- [16] SHTYKOV, S. N. Chemical Analysis in Nanoreactors : Main Concepts and Applications. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 57(10), 859-868 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1023/A:1020410605772. ISSN 10619348. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020410605772>
- [17] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN isbn978-80-7080-675-3.
- [18] Vesicles- Definition, Structure, Functions and Diagram. *Microbe Notes: Microbiology Notes by Sagar Aryal* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/vesicles-structure-types-and-functions/>
- [19] Samodrobený redox-senzitivný stomatocytový nanomotor dodáva a uvoľňuje lieky pre bunky - Chémia - 2020. *Slo.sciences-world* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://slo.sciences-world.com/self-destroyed-redox-sensitive-stomatocyte-nanomotor-delivers-26038>
- [20] JIANG, Yue, Feifei LI, Yuxia LUAN, Wenting CAO, Xiaoqing JI, Lanxia ZHAO, Longlong ZHANG a Zhonghao LI. Formation of drug/surfactant catanionic vesicles and their application in sustained drug release. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, 436(1-2), 806-814 [cit. 2020-04-19].

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.053. ISSN 03785173. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312007740>

- [21] KOTLA, Niranjana G., Bhargavi CHANDRASEKAR, Peadar ROONEY, Gandhi SIVARAMAN, Aitor LARRANAGA, K. Vijaya KRISHNA, Abhay PANDIT a Yury ROCHEV. Biomimetic Lipid-Based Nanosystems for Enhanced Dermal Delivery of Drugs and Bioactive Agents. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2016, 3(7), 1262-1272 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00681. ISSN 2373-9878. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.6b00681>
- [22] Design and synthetic engineering of OMSs. *IMRCP* [online]. [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <http://imrcp.ups-tlse.fr/en/page/design-and-synthetic-engineering-omss>
- [23] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. 2005, 21(14), 6179-6184 [cit. 2020-04-19]. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la047207g>
- [24] SHI, Shaoxiong, Tianxiang YIN a Weiguo SHEN. Multilamellar to unilamellar vesicle transformation in aqueous solutions of a catanionic surface active ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2019, 290 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111245. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732219322317>
- [25] MAL, Arpan, Surajit BAG, Soumen GHOSH a Satya P. MOULIK. Physicochemistry of CTAB-SDS interacted catanionic micelle-vesicle forming system: An extended exploration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2018, 553, 633-644 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.05.099. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775718304758>
- [26] RUSSO KRAUSS, Irene, Riccardo IMPERATORE, Augusta DE SANTIS, Alessandra LUCHINI, Luigi PADUANO a Gerardino D'ERRICO. Structure and dynamics of cetyltrimethylammonium chloride-sodium dodecylsulfate (CTAC-SDS) catanionic vesicles: High-value nano-vehicles from low-cost surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2017, 501, 112-122 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.04.032. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979717304344>
- [27] BRAMER, Tobias, Mattias PAULSSON, Katarina EDWARDS a Katarina EDSMAN. Catanionic Drug-Surfactant Mixtures: Phase Behavior and Sustained Release from Gels. *Pharmaceutical Research* [online]. 20(10), 1661-1667 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1023/A:1026103805283. ISSN 07248741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1026103805283>

- [28] BROHEDE, U., T. BRAMER, K. EDSMAN a M. STRØMME. Electrodynamic Investigations of Ion Transport and Structural Properties in Drug-Containing Gels: Dielectric Spectroscopy and Transient Current Measurements on Catanionic Carbopol Systems. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2005, 109(32), 15250-15255 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1021/jp0511350. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp0511350>
- [29] BRAMER, Tobias, Noel DEW a Katarina EDSMAN. Pharmaceutical applications for catanionic mixtures. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2007, 59(10), 1319-1334 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1211/jpp.59.10.0001. ISSN 00223573. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.59.10.0001>
- [30] STAGNOLI, Soledad, Lucas SOSA ALDERETE, M. Alejandra LUNA, Elizabeth AGOSTINI, R. Dario FALCONE, Ana M. NIEBYSKI a N. Mariano CORREA. Catanionic nanocarriers as a potential vehicle for insulin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2020, 188 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110759. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776519309038>
- [31] SRIVASTAVA, Anirudh, Chunyu LIU, Jing LV, Debojit KUMAR DEB a Weihong QIAO. Enhanced intercellular release of anticancer drug by using nano-sized catanionic vesicles of doxorubicin hydrochloride and gemini surfactants. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2018, 259, 398-410 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.03.065. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732218303520>
- [32] LIU, Jing, Yue JIANG, Yuting CUI, Chuanshan XU, Xiaoqing JI a Yuxia LUAN. Cytarabine-AOT catanionic vesicle-loaded biodegradable thermosensitive hydrogel as an efficient cytarabine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 473(1-2), 560-571 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.032. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314005316>
- [33] JIANG, Yue, Xu HU, Jing ZHANG, Guoxia JIN a Yuxia LUAN. Chlorambucil prodrug-participating catanionic aggregates for sustained drug release and improved antitumour activity. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2019, 274, 556-561 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.10.165. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732218329635>
- [34] BOUDIER, Ariane, Pauline CASTAGNOS, Elodie SOUSSAN et al. Polyvalent catanionic vesicles: Exploring the drug delivery mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, 403(1-2), 230-236 [cit. 2020-04-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.024. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517310007994>

- [35] TIEN, Wu-jhao, Kun-you CHEN, Fong-yin HUANG a Chi-cheng CHIU. Effects of Cholesterol on Water Permittivity of Biomimetic Ion Pair Amphiphile Bilayers: Interplay between Membrane Bending and Molecular Packing. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(13) [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.3390/ijms20133252. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/13/3252>
- [36] STILLWELL, William. Membrane Polar Lipids. *An Introduction to Biological Membranes* [online]. Elsevier, 2016, s. 63-87 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63772-7.00005-1. ISBN 9780444637727. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637727000051>
- [37] An ever-growing role for a tiny lipid. *ASBMB TODAY: The member magazine of the american society for biochemistry and molecular biology* [online]. [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://www.asbmb.org/asbmb-today/science/060119/role-for-a-tiny-lipid>
- [38] EFIMOVA, Anna A., Stepan N. KOSTENKO, Viktor N. ORLOV a Alexander A. YAROSLAVOV. Effect of cholesterol on the phase state and permeability of mixed liposomes composed of anionic diphosphatidylglycerol and zwitterionic dipalmitoylphosphatidylcholine. *Mendeleev Communications* [online]. 2016, 26(2), 99-100 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/j.mencom.2016.03.003. ISSN 09599436. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959943616000523>
- [39] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2018, 92, 29-35 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/j.jtice.2018.02.013. ISSN 18761070. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107018300993>
- [40] Polyelektrolyt. *Vydavatelství VŠCHT* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/polyelektrolyt.html
- [41] KHAN, Nasreen a Blair BRETTMANN. Intermolecular Interactions in Polyelectrolyte and Surfactant Complexes in Solution. *Polymers* [online]. 2019, 11(1) [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.3390/polym11010051. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/11/1/51>
- [42] CHIAPPISI, Leonardo, Ingo HOFFMANN a Michael GRADZIELSKI. Complexes of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants – recent developments in the field of biologically derived polyelectrolytes. *Soft Matter* [online]. 2013, 9(15) [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1039/c3sm27698h. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3sm27698h>

- [43] Dextran. *Wikipedia: The Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dextran>
- [44] HUANG, Shiyu a Gangliang HUANG. Design and application of dextran carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, 55 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101392. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224719316004>
- [45] Dextran. *Wiki* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://cs.qwe.wiki/wiki/Dextran>
- [46] NEELY, W. Brock. *Dextran: Structure and Synthesis* [online]. Elsevier, 1961, s. 341-369 [cit. 2020-04-20]. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. DOI: 10.1016/S0096-5332(08)60191-5. ISBN 9780120072156. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0096533208601915>
- [47] KALINA, Michal, Andrea KARGEROVÁ a Miloslav PEKAŘ. DEAE-dextran hydrochloride behaviour in aqueous solution—The effect of ionic strength and concentration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, 220, 163-169 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.070. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861719305624>
- [48] DEAE-dextran, chloride form. *MP Biomedicals* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://eu.mpbio.com/0219513310-deae-dextran-chloride-form-cf?SID=47f2ng94theo33lera9igi00t3>
- [49] MOURYA, V. K. a Nazma N. INAMDAR. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, 20(5), 1057-1079 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3659-z>
- [50] BOSE, Anirbandeep a Tin Wui WONG. Oral colon cancer targeting by chitosan nanocomposites. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2018, s. 409-429 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813741-3.00018-2. ISBN 9780128137413. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137413000182>
- [51] ZHAO, Jing, Jinqi LI, Zhongliang JIANG, Rongsheng TONG, Xingmei DUAN, Lan BAI a Jianyou SHI. Chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) and 2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HTCC): The potential immune adjuvants and nano carriers. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 154, 339-348 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.065. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019368370>

- [52] ZHANG, Jingjing, Wenqiang TAN, Gang WANG, Xiuli YIN, Qing LI, Fang DONG a Zhanyong GUO. Synthesis, characterization, and the antioxidant activity of N , N , N - trimethyl chitosan salts. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 118, 9-14 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.018. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018317811>
- [53] KULKARNI, Abhijeet D., Harun M. PATEL, Sanjay J. SURANA, Yogesh H. VANJARI, Veena S. BELGAMWAR a Chandrakantsing V. PARDESHI. N,N,N-Trimethyl chitosan: An advanced polymer with myriad of opportunities in nanomedicine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, 157, 875-902 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.041. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716312036>
- [54] ANTUNES, Filipe E., Eduardo F. MARQUES, Ricardo GOMES, Krister THURESSON, Björn LINDMAN a Maria G. MIGUEL. Network Formation of Catanionic Vesicles and Oppositely Charged Polyelectrolytes. Effect of Polymer Charge Density and Hydrophobic Modification. *Langmuir* [online]. 2004, 20(11), 4647-4656 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1021/la049783i. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la049783i>
- [55] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, 8(4), 409-427 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-016-0218-6>
- [56] The principles of dynamic light scattering. *Wiki Anton Paar* [online]. [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>
- [57] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 235, 337-351 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>
- [58] Dynamic Light Scattering: Particle size measurement using multiangle dynamic light scattering. *3P Instruments: Characterization of particles, powders, pores* [online]. [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>
- [59] Dynamic light scattering. *Wikipedia: The Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering

- [60] Optické vlastnosti koloidných soustav: Fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. *Xray* [online]. [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [61] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science* [online]. 2018, 67(6), 727-735 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.5650/jos.ess18008. ISSN 1345-8957. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/67/6/67_ess18008/_article
- [62] YOTSUMOTO, Satoshi, Terutaka KAKIUCHI a Yukihiro ARAMAKI. Enhancement of IFN- γ production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. *Vaccine* [online]. 2007, 25(29), 5256-5262 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.05.037. ISSN 0264410X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X07006147>
- [63] BANA, Laura, Stefania MINNITI, Elisa SALVATI et al. Liposomes bi-functionalized with phosphatidic acid and an ApoE-derived peptide affect A β aggregation features and cross the blood–brain-barrier: Implications for therapy of Alzheimer disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2014, 10(7), 1583-1590 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/j.nano.2013.12.001. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963413006849>
- [64] LEE, Jae-Ho, John P. GUSTIN, Tainhoh CHEN, Gregory F. PAYNE a Srinivasa R. RAGHAVAN. Vesicle–Biopolymer Gels: Networks of Surfactant Vesicles Connected by Associating Biopolymers. *Langmuir*. Department of Chemical Engineering, University of Maryland, College Park, Maryland 20742-2111, and Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland 20742-4450, 2004, 2005, 26-33. DOI: 10.1021/la048194+.
- [65] CHIU, Chun-Wei, Chien-Hsiang CHANG a Yu-Min YANG. Gelation of ethosome-like cationic vesicles by water-soluble polymers: ethanol and cholesterol effects. *Soft Matter* [online]. 2013, 9(31) [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1039/c3sm51061a. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3sm51061a>
- [66] HUANG, Zheng-Lin, Jhen-Yi HONG, Chien-Hsiang CHANG a Yu-Min YANG. Gelation of Charged Cationic Vesicles Prepared by a Semispontaneous Process. *Langmuir* [online]. 2010, 26(4), 2374-2382 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1021/la902798n. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la902798n>
- [67] NING, Shunhua, Qiyu HUANG, Juan LI, Yi ZHANG a You-Nian LIU. Functionalized dextran-coated liposomes for doxorubicin loading. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, 152, 49-51 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.08.115.

ISSN 01683659. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911007292>

- [68] NING, Shunhua, Qiyu HUANG, Xiaoyi SUN, Chunlei LI, Yi ZHANG, Juan LI a You-Nian LIU. Carboxymethyl dextran-coated liposomes: Toward a robust drug delivery platform. *Soft Matter* [online]. 2011, 7(19) [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1039/c1sm05814b. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1sm05814b>
- [69] MENON, Premanarayani, Teo YIN YIN a Misni MISRAN. Preparation and characterization of liposomes coated with DEAE-Dextran. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, 481, 345-350 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.036. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715004318>
- [70] ZHANG, Jing a Siling WANG. Topical use of Coenzyme Q10-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, 372(1-2), 66-75 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.001. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517309000040>
- [71] VAN DER MERWE, S.M., N. BOUROPOULOS, D.A. KATSAMENIS, O.L. LAMPOU a D.G. FATOUROS. Preparation and Characterization of Large Unilamellar Vesicles Mixed With Trimethylchitosan (TMC): The Effect of Polyelectrolyte Concentration. *The Open Biotechnology Journal* [online]. 2018, 12(1), 134-139 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.2174/1874070701812010134. ISSN 1874-0707. Dostupné z: <https://openbiotechnologyjournal.com/VOLUME/12/PAGE/134/>
- [72] HUANG, Aiwen, Abdallah MAKHLOF, Qineng PING, Yuichi TOZUKA a Hirofumi TAKEUCHI. N-trimethyl chitosan-modified liposomes as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Drug Delivery* [online]. 2011, 18(8), 562-569 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.3109/10717544.2011.596585. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2011.596585>
- [73] KHAMENEH, Bahman, Mahdi MOMEN-NEJAD a Mohsen TAFAGHODI. In vivo evaluation of mucoadhesive properties of nanoliposomal formulations upon coating with trimethylchitosan polymer. *Nanomedicine Journal*. 2013, 1(3), 147-154. ISSN 2322-5904.
- [74] LEVCHENKO, Tatiana S, Ram RAMMOHAN, Anatoly N LUKYANOV, Kathleen R WHITEMAN a Vladimir P TORCHILIN. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, 240(1-2), 95-102 [cit. 2020-05-14]. DOI:

10.1016/S0378-5173(02)00129-1. ISSN 03785173. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302001291>

8 ZOZNAM SKRATIEK A POUŽITÝCH SYMBOLOV

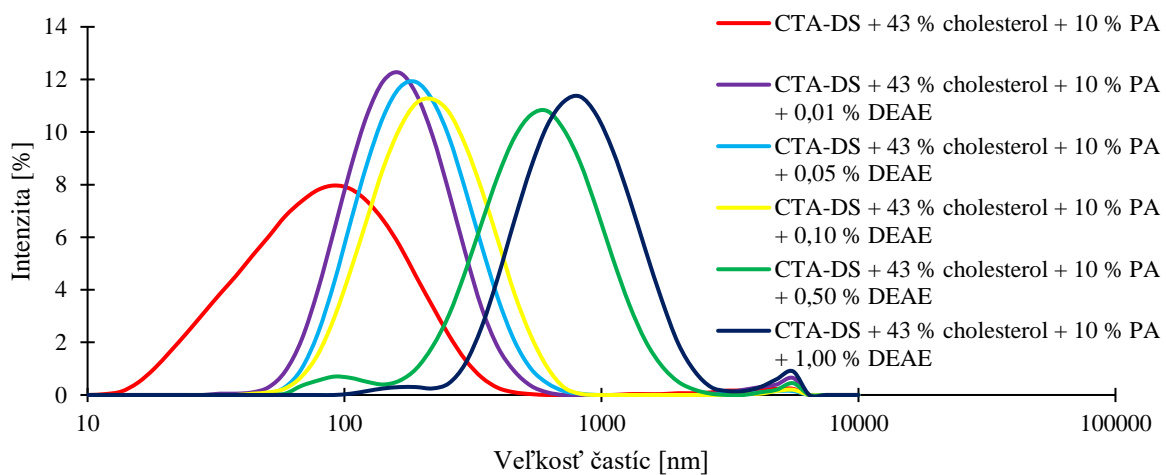
8.1 Skratky

PAL	povrchovo aktívna látka
SDS	dodecylsírán sodný
CTAB	cetyltrimetylamónium bromid
CMC	kritická micelárna koncentrácia
IPA	ion pair imphiphile
PA	kyselina fosfatidová
DEAE	dextran hydrochlorid
TMC	N, N, N-trimetylchitosan
DLS	dynamický rozptyl svetla
CTA-DS	kataniónový vezikulárny systém z CTAB a SDS
DXDAB	dialkyldimetylamónium bromid
HTMA-DS	hexadecyltrimetylamónium-hexadecylsulfát
DTMA-HS	dodecyltrimetylamónium-hexadecylsulfát
PS	fosfatidylserín
SANS	malouhlový rozptyl elektrónov
HMP ⁺	hydrofóbne modifikovaný polykatión
P ⁺	polykatión
DTMA-DS	dodecyltrimetylamónium-dodecylsulfát
DTMAB	dodecyltrimetylamónium bromid
FFS-LIPs	lipozómy funkcionalizované dextranom
CMD-LIPs	lipozómy pokryté karboxymetyl-dextranom
DEAE-Dx	dietylamoetyl-dextran
DSC	diferenciálna skenovacia kalorimetria
ELS	elektroforetický rozptyl svetla
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
UV-VIS	

8.2 Symboly

<i>G</i>	Gibbsova energia
<i>H</i>	entalpia
<i>S</i>	entropia
<i>T</i>	termodynamická teplota
<i>T_K</i>	Krafftova teplota
<i>V</i>	efektívny objem
<i>L</i>	maximálna dĺžka reťazca
<i>A</i>	účinná plocha povrchu hydrofilnej časti
<i>d_H</i>	veľkosť častíc
<i>k_B</i>	Boltzmannova konštanta
<i>T</i>	termodynamická teplota
<i>η₀</i>	viskozita rozpúšťadla
<i>D</i>	difúzny koeficient
<i>CPP</i>	kritický zbalovací parameter
<i>Mr</i>	molárna hmotnosť

9 PRÍLOHY



Obr. 68 Porovnanie zmeny veľkostí CTA-DS + 43 mol. % cholesterol + 10 mol. % PA v závislosti na rôznej koncentrácii pridávaného DEAE