



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

SMĚSNÉ LIPIDY A JEJICH INTERAKCE S BIOPOLYMERY

MIXED LIPIDS AND THEIR INTERACTION WITH BIOPOLYMERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Barboříková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1107/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Hana Barboříková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Směsné lipidy a jejich interakce s biopolymery

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma interakce směsných lipidů s biopolymery a na jejím základě vybrat vhodné lipidy a vhodné techniky/metody pro studium interakcí se záporně nabitými biopolymery se zaměřením na fluorescenční spektroskopii.
2. Pomocí vhodných technik fluorescenční spektroskopie studovat vliv složení na průběh agregace směsných lipidů a fluiditu lipidických agregátů.
3. Studovat vliv přidavku sodné soli kyseliny hyaluronové na tyto agregáty.
4. Diskutovat využitelnost těchto systémů pro farmaceutické aplikace.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Hana Barboříková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na studium interakcí hyaluronanu s lipidem DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan) a jeho směsí s lipidem DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin) ve vodě. Nejprve bylo proměřeno agregační chování samotného lipidu a jeho směsí a poté ovlivnění hyaluronanem o různých koncentracích. Dále byla změřena anizotropie fluorescence sondy DPH v těchto směsích a její ovlivnění přidavkem cholesterolu. Tyto vlastnosti byly sledovány pomocí fluorescenční spektroskopie, za využití fluorescenčních sond pyrenu a DPH. Bylo zjištěno, že hyaluronan má vliv na agregační chování lipidu DOTAP i jeho směsí s DPPC a že cholesterol ovlivňuje fluiditu liposomů.

ABSTRACT

This thesis focuses on the study of interactions between hyaluronan and lipid DOTAP and its mixtures with DPPC in water. First, the aggregation behavior of the lipid itself and its mixtures was measured, afterwards the influence of hyaluronan in different concentration was studied. Further the fluorescence anisotropy of fluorescence probe DPH in these mixtures and influence of cholesterol was measured. These properties were investigated by fluorescence spectroscopy using pyrene and DPH as fluorescence probes. The measurements revealed that the addition of hyaluronan has observable influence on the aggregation behavior of the lipid DOTAP and its mixtures with DPPC and that cholesterol influences liposomes fluidity.

KLÍČOVÁ SLOVA

lipid, DPPC, DOTAP, hyaluronan, cholesterol, fluorescence, anizotropie, DPH, pyren

KEY WORDS

lipid, DPPC, DOTAP, hyaluronan, cholesterol, fluorescence, anisotropy, DPH, pyrene

BARBOŘÍKOVÁ, H. *Směsné lipidy a jejich interakce s biopolymery*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomhle místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za celkové vedení a rady během zpracování této práce, dále své konzultantce Ing. Janě Burdíkové za vstřícnost, cenné připomínky a pomoc při řešení problémů. Zároveň velký dík patří Ing. Petře Holínkové, Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. a Ing. Jitce Krouské, Ph.D., kteří mi pomáhali s metodami použitými v experimentální části této diplomové práce.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Lipidy	8
2.1.1	Rozdělení.....	8
2.1.2	Složené lipidy	8
2.1.3	Odvozené lipidy	10
2.2	Liposomy	11
2.2.1	Agregace amfifilních molekul.....	11
2.2.2	Druhy liposomů.....	13
2.2.3	Aplikace liposomů.....	14
2.3	Kyselina hyaluronová	15
2.3.1	Struktura	15
2.3.2	Uspořádání v roztoku	15
2.3.3	Biokompatibilita.....	16
2.3.4	Využití v medicíně	16
2.4	Fotoluminiscence	17
2.4.1	Fluorescence.....	18
2.4.2	Instrumentace	19
2.4.3	Fluorescenční sondy	20
2.5	Anizotropie fluorescence	22
2.5.1	Polarizační stupeň.....	23
2.5.2	Ustálená anizotropie	23
2.5.3	Časově rozlišená anizotropie.....	23
2.5.4	Aditivní zákon anizotropie	24
2.5.5	Fundamentální anizotropie	24
2.5.6	Princip měření časově rozlišené anizotropie – TCSPC metoda	24
2.6	Dynamický rozptyl světla	26
2.6.1	Velikost částic	26
3.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	28
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Chemikálie	32
4.2	Metody	33

4.2.1	Příprava zásobních roztoků	33
4.2.2	Příprava zásobních roztoků hyaluronanu	34
4.2.3	Příprava vzorků	34
4.2.4	Měření a zpracování výsledků.....	35
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1	Studium agregace DOTAP a jeho směsí s DPPC	38
5.2	Agregace DOTAP a jeho směsí s DPPC v přítomnosti hyaluronanu	39
5.2.1	Směsi lipidů v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 15 mg/l	39
5.2.2	Směsi lipidů v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 5 mg/l a 30 mg/l	43
5.3	Parametr uspořádání lipidů a velikost částic.....	49
5.3.1	Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání DOTAP přidavkem cholesterolu a hyaluronanu.....	49
5.3.2	Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání směsi DOTAP/DPPC v poměru 50/50 přidavkem cholesterolu a hyaluronanu	51
5.3.3	Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání směsi DOTAP/DPPC v poměru 25/75 přidavkem cholesterolu a hyaluronanu	52
5.3.4	Ovlivnění parametru uspořádání poměrem DOTAP/DPPC.....	54
5.4	Teplota fázového přechodu.....	55
6.	ZÁVĚR	56
7.	POUŽITÁ LITERATURA	58
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	62
8.1	Seznam použitých zkratk	62
8.2	Seznam symbolů	63

1 ÚVOD

Denně používáme na naši pokožku kosmetické nebo farmaceutické přípravky, které by měly zajistit dopravení účinné látky do cílené oblasti a současně i pokožku hydratovat. Pokud chceme tyto požadavky splnit, je ideální použít látky, které jsou lidskému tělu vlastní, jako jsou například fosfolipidy a kyselina hyaluronová.

Právě spojením fosfolipidů a hydratačních účinků kyseliny hyaluronové by mohl vzniknout přípravek, který tyto vlastnosti bude mít. Lipidy jsou přirozenou součástí všech vrstev pokožky a díky tomu by liposomy složené z lipidu měly být schopny proniknout do vnitřních vrstev pokožky. Díky kompatibilitě fosfolipidů a hyaluronanu s lidským tělem by tyto látky neměly způsobit žádné podráždění pokožky a také by mohlo dojít k vytvoření stabilních liposomů, které by mohly být schopné nést hydrofobní látky, jejichž aplikace v čisté formě není možná.

Jedním z problémů použití liposomů, jako nosičů pro transdermální použití, je jejich nestabilita. Je třeba najít takovou kombinaci lipidů, která by zajistila dostatečnou stabilitu použitého nosičového systému, aby se účinná látka neuvolnila předčasně. Kdyby k uvolnění terapeutika docházelo předčasně, snižovalo by to jeho účinnost a mohlo by dojít i k intoxikaci organismu. Z toho důvodu byl v práci zkoumán vliv cholesterolu na fluiditu membrány liposomů. Již v dřívějších studiích bylo potvrzeno, že přídavek cholesterolu ovlivňuje fluiditu membrány liposomu, dělá liposom pevnější (prodlužuje životnost částic v krevním oběhu). Také by cholesterol, který je v organismu nedílnou součástí biologických membrán, mohl zvýšit pružnost liposomu.

Cílem práce bylo pomocí fluorescenční spektroskopie studovat agregaci různých systémů směsných lipidů a ovlivnění agregace přítomností hyaluronanu. Další oblastí studia bylo ovlivnění fluidity a teploty fázového přechodu směsí přídavkem cholesterolu. Pro doplnění získaných informací byla změřena velikost částic ve všech systémech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy patří mezi přírodní látky, které jsou omezeně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech jako chloroform, benzen a éter. Představují rozmanitou skupinu biomolekul, které se od sebe mohou lišit ve struktuře (acylglyceroly, izoprenoidy, fosfolipidy, aj.) i funkci, které zastávají v živých organismech. Podle funkce lze lipidy dělit na strukturní (součást biomembrán), ochranné (tepelná a mechanická izolace tukové tkáně), regulační (steroidní hormony, vitamíny) a zásobní (zásobárna chemické energie) [1].

2.1.1 Rozdělení

Lipidy lze dělit podle několika hledisek. Toto členění rozděluje lipidy podle chemického složení a je přejato z Bloorovy klasifikace [2]:

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

2.1.2 Složené lipidy

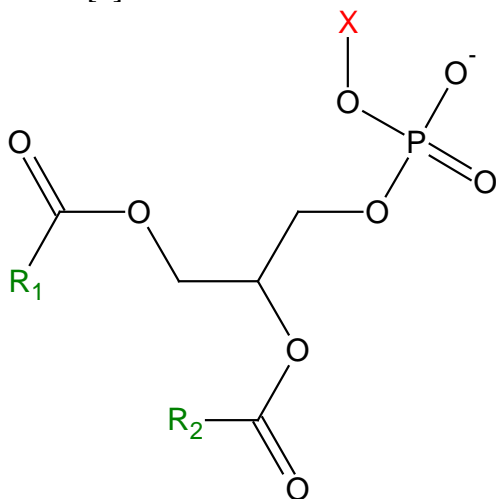
Složené lipidy tvoří základní stavební prvek buněčných membrán. Obsahují kromě hydrofobní části i část hydrofilní. V jejich struktuře se kromě mastných kyselin a alkoholu vyskytuje i další funkční skupina. Podle typu této funkční skupiny je můžeme rozdělit do několika kategorií. Pokud tuto funkční skupinu představuje zbytek kyseliny fosforečné, mluvíme o fosfolipidech. Na lipidovou část molekuly se také může navázat sacharid, tyto sloučeniny jsou pak označovány jako glykolipidy. Dále se na lipidy může navázat složka se sirnou funkční skupinou, čímž vznikají sulfolipidy, nebo s aminoskupinou a takové lipidy nazýváme aminolipidy [3].

2.1.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy mohou být považovány za deriváty kyseliny fosfatidové, ve které je fosfát esterifikován s hydroxylovou skupinou příslušného alkoholu. Jejich strukturu tvoří uhlíkové zbytky mastných kyselin (nepolární část), fosfátová skupina a další polární skupiny, jako například cholin, ethanolamin a serin (polární část). Molekuly fosfolipidu se ve vodném prostředí chovají jako amfifilní látky, jejich nepolární část není v kontaktu s rozpouštědlem. Při nižších koncentracích (10^{-7} mol/dm³) fosfolipidu vznikají lipidové micely a pokud je koncentrace fosfolipidu dosti vysoká, seskupí se molekuly do dvojvrstvy. Právě tato vlastnost je odlišuje od amfifilních látek, které při vysokých koncentracích tvoří micely. Jsou hlavní složkou buněčných membrán.

2.1.2.2 Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy patří mezi amfifilní molekuly a jsou jednou z hlavních biologicky významných fosfolipidů. Tvoří hlavní lipidovou složku biomembrán. Jsou tvořeny sn-glycerol-3-fosfátem (Obrázek 1), který je esterifikován mastnými kyselinami a na své fosforylové skupině příslušnou skupinou X (cholin, serin, glycerol, ethanolamin, atd.). U glycerofosfolipidů, které se nachází v biomembránách, jsou polární části odvozené od alkoholů [4].



Obrázek 1: Struktura sn-glycerol-3-fosfátu. Zelené R₁ a R₂ představují uhlíkový řetězec zbytků mastných kyselin a červené X značí funkční skupinu esteru vázanou na fosforylovou skupinu.

Nejjednoduššími glycerofosfolipidy jsou fosfatidové kyseliny, u kterých X představuje H. U glycerofosfolipidů je R₁ nejčastěji tvořeno nasycenými mastnými kyselinami, zatímco R₂ je častěji obsazena nenasycenými mastnými kyselinami [4].

DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-fosfocholin) se skládá ze dvou uhlíkových řetězců zbytků palmitových kyselin a na jeho fosforylové skupině je navázaný cholin, který tvoří jeho polární část. Řadí se mezi zwitteriony, jelikož ve své molekule obsahuje kladný i záporný náboj, přičemž celkový náboj molekuly je neutrální. Je jedním z nejhojnějších fosfolipidů, nejčastěji se vyskytuje v buněčné membráně a plazmě. Slouží jako strukturální prvek buněčných membrán, protože se díky svému válcovitému tvaru molekuly spontánně organizuje do dvojvrstvy.

2.1.2.3 Kationtové lipidy

Tyto lipidy se vyznačují tím, že další skupina, kterou kromě vyšších mastných kyselin a alkoholu obsahují, nese kladný náboj při neutrálním pH. Díky kladnému náboji jsou schopny interagovat s negativně nabitými komponentami buněk nebo DNA. V přírodě se kationtové lipidy prakticky nevyskytují. Jelikož je možné je využít jako vektory v genové terapii či jako nosiče léčiv, tak roste zájem o jejich syntézu. Vzhledem k jejich náboji tvoří kationtové lipidy spontánně ve vodě velmi malé útvary (menší než 50 nm) [5, 6].

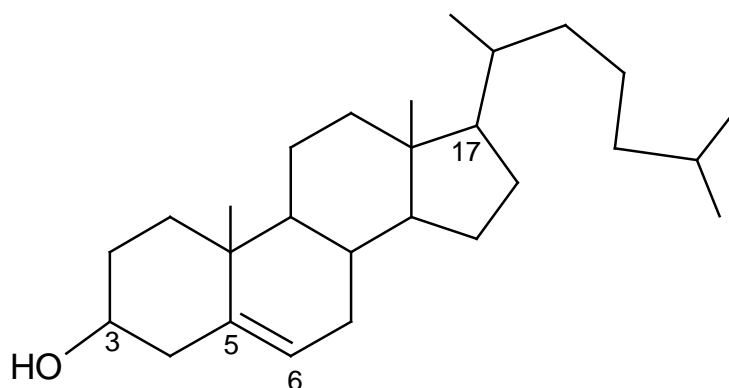
2.1.3 Odvozené lipidy

V podstatě všechny odvozené lipidy lze zařadit mezi izoprenoidy. K lipidům jsou řazeny díky jejich nerozpustnosti ve vodě, kterou způsobuje jejich hydrofobní charakter. Molekuly izoprenoidů se skládají ze dvou či více pětiuhlíkatých izoprenových jednotek. Izoprenoidy se dělí na terpenoidy a steroidy [8].

Terpenoidy jsou tvořeny různým počtem izoprenových jednotek a jejich struktura bývá lineární. Patří mezi ně například karotenoidy, vitamín A nebo přírodní kaučuk. Steroidy jsou komplexními deriváty triterpenů a jejich strukturální základ tvoří cyklický steran. Mezi steroidy se řadí žlučové kyseliny, steroidní hormony, steroly (cholesterol, vitamín D) nebo steroidní alkoholy [8].

2.1.3.1 Cholesterol

Cholesterol (*Obrázek 2*) je rozšířen ve všech buňkách těla, obzvláště v nervové tkáni. Tvoří hlavní složku plazmatické membrány a je hojně zastoupen v lipoproteinech krevní plazmy. V menší míře se vyskytuje ve vnitrobuněčných organelách. Na uhlíku C₃ má polární hydroxylovou skupinu, která mu poskytuje slabý amfifilní charakter. Obsahuje rozvětvený alifatický řetězec o 8 až 10 uhlíkových atomech na uhlíku C₁₇. Nachází se u živočichů a rostlin, ale u bakterií se nevyskytuje [2, 4].



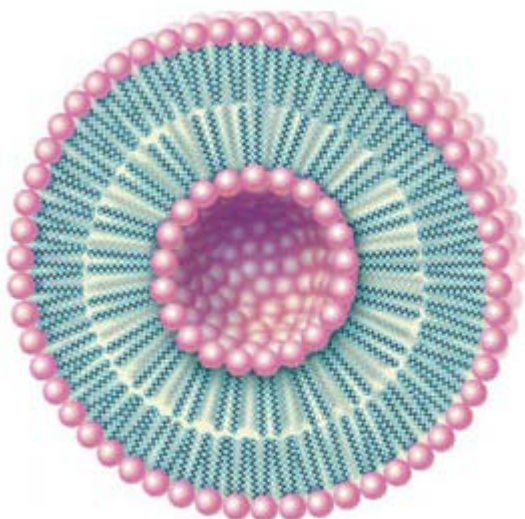
Obrázek 2: Strukturální vzorec cholesterolu

Jeho nejdůležitější funkcí je schopnost upravovat fyzikálně-chemické vlastnosti buněčných membrán. Při začlenění do fosfolipidové dvojvrstvy orientuje svoji hydroxylovou skupinu směrem do vodního prostředí a alifatický řetězec do středu dvojvrstvy. Cholesterol svým začleněním do membrány zvýší její mechanickou pevnost a sníží propustnost [7]. Navíc je také metabolickým prekurzorem steroidních hormonů, látek regulujících velké množství

různých fyziologických funkcí (pohlavní vývoj, metabolismus cukrů). Je často spojován se srdečními chorobami a aterosklerózou [4].

2.2 Liposomy

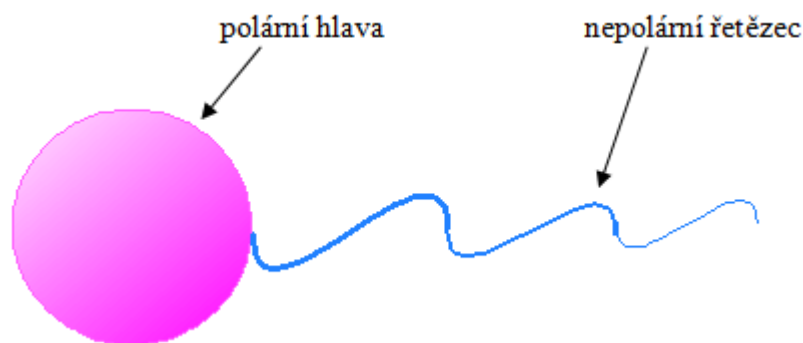
Liposomy (*Obrázek 3*) jsou sférické struktury vzniklé dispergací lipidového filmu ve vodě. Jejich povrch tvoří jedna nebo více lipidových dvojvrstev uzavírající část rozpouštědla disperzního prostředí. Pro jejich tvorbu mohou být použity různé amfifilní molekuly a způsob jejich přípravy se přizpůsobuje požadované velikosti a morfologii. Jelikož liposom obsahuje jak hydrofilní, tak hydrofobní prostředí, může enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látky. Hydrofilní látky jsou rozpuštěny ve vodném roztoku, který se nachází uvnitř liposomu, kdežto hydrofobní látky jsou uloženy uvnitř lipidové dvojvrstvy, jelikož nemohou interagovat s vodným roztokem. Při kontaktu s buňkou může dojít k fúzi membrán a přenášené látky se uvolní do intracelulární tekutiny. Díky tomuto mechanismu mohou přes membránu buněk pronikat látky, které by za normálních okolností buněčnou stěnou neprošly [9].



Obrázek 3: Schematické znázornění liposomu [10]

2.2.1 Agregace amfifilních molekul

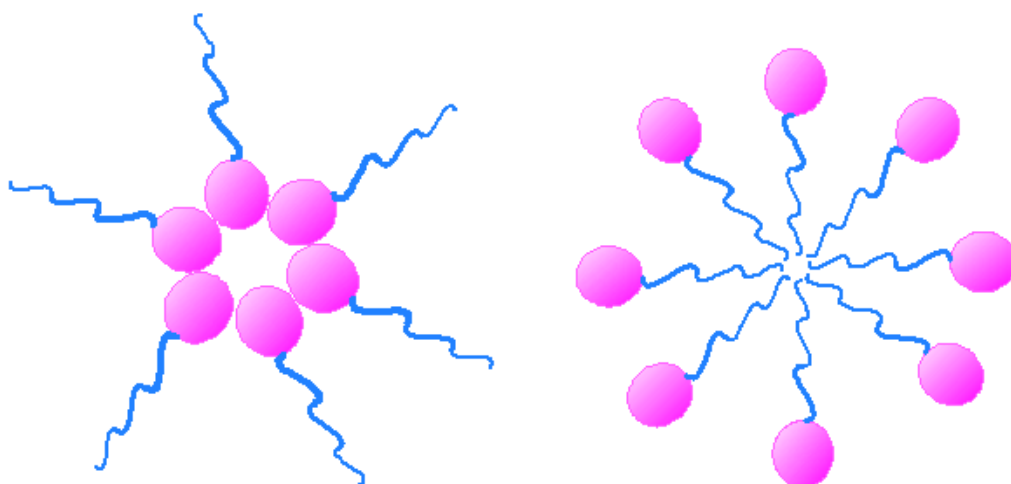
Amfifilní molekuly obsahují část hydrofilní a hydrofobní (*Obrázek 4*), což je důvodem jejich spontánní agregace. Hydrofilní část molekuly je zastoupena polární skupinou (polární hlava), která může být tvořena aminovou nebo sulfátovou skupinou či cukernými kruhy. Část hydrofobní (hydrofobní konec) je nepolární a skládá se z uhlovodíkového řetězce.



Obrázek 4: Struktura amfifilní molekuly

Amfifilní molekuly se ve vodném roztoku vyskytují ve formě monomerů, ovšem nad určitou koncentrací samovolně agregují, aby se minimalizovaly nevýhodné interakce. Pokud jsou ve vodě přítomny monomery amfifilu, dochází kolem hydrofobních částí k organizaci molekul vody, což vede ke vzniku strukturované vody. Tento jev je doprovázen nevýhodným snížením entropie systému. Díky agregaci a vzniku hydrofobních domén se strukturovaná voda již nevytváří, což je doprovázeno nárůstem entropie [11].

V polárním rozpouštědle zauímají amfifilní molekuly takovou pozici, aby nepolární konec nebyl rozpouštědлу vystaven. V nepolárním rozpouštědle budou vznikat obrácené micely. Hranice spontánní agregace amfifilních molekul je nazývána kritická micelární koncentrace (CMC), která je definována jako nejvyšší možná koncentrace amfifilních molekul, při níž se ještě vyskytují jako monomery. Nad touto hranicí dochází k spontánnímu shlukování molekul a vytváří se dvojvrstvy nebo micely. Při vyšších koncentracích lipidu dochází ke změně typu agregátů v roztoku. Tuto koncentraci nazýváme kritická agregační koncentrace (CAC) [11, 12].



Obrázek 5: a) struktura micely v nepolárním prostředí, b) struktura micely v polárním prostředí

2.2.1.1 Packing parametr

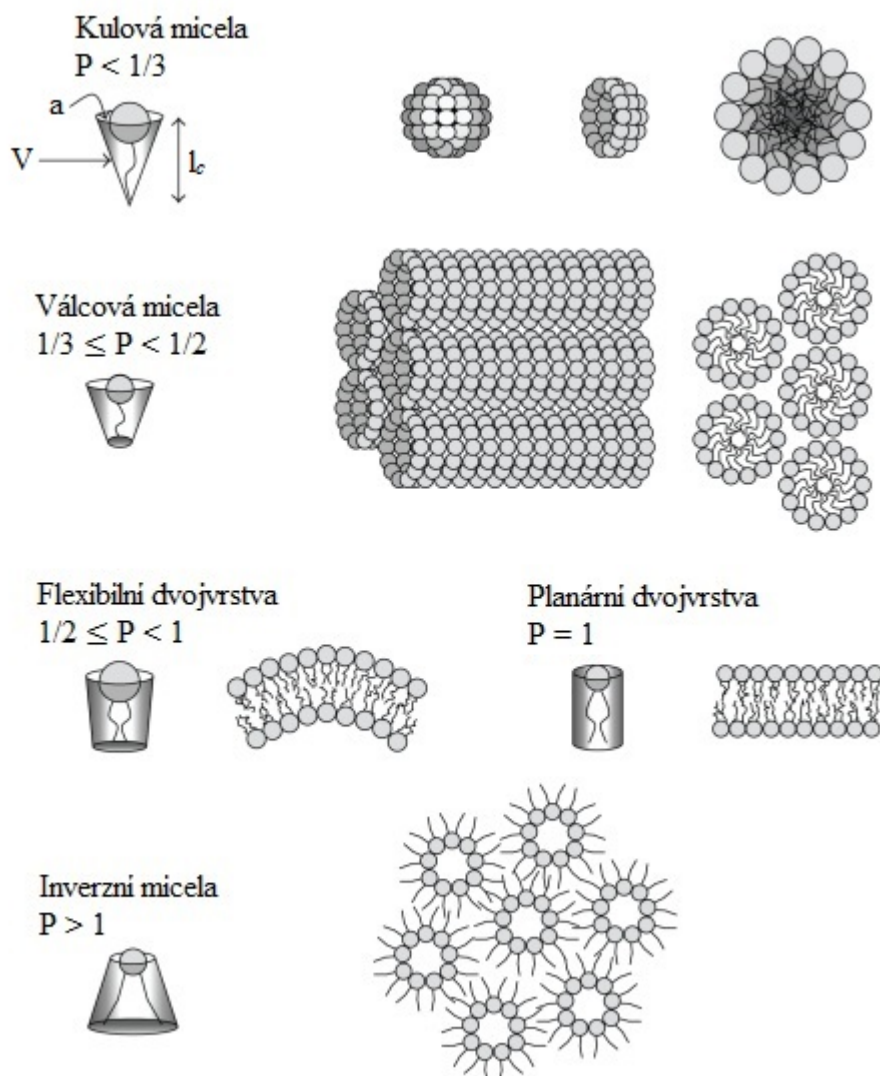
Agregující amfifilní molekuly tvoří různé mikrostruktury, přičemž je každá struktura vytvořena pomocí vlastností konkrétních amfifilních molekul, jež ji tvoří tak, aby byla energeticky nejvýhodnější. Packing parametr, který se v literatuře používá k vysvětlení nebo předpovědi tohoto samovolného uspořádání amfifilů v roztoku, je možné vypočítat pomocí rovnice (1):

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

kde V je objem hydrofobní části, a je plocha polární hlavy lipidu a l_c je maximální délka lipidového řetězce obsahujícího n atomů. Vzorec je možné, kromě čistého lipidu, aplikovat i na směs lipidů, pokud je brán v úvahu i poměr lipidů ve směsi.

Uvádí se, že hodnota P menší než jedna třetina odpovídá sférické (kulovité) micelle, pokud je P větší než jedna třetina ale menší než jedna polovina vzniká globulární (válcovitá) micela.

Při hodnotách P mezi polovinou a jednou se tvoří flexibilní dvojvrstva a při hodnotě kolem jedné planární dvojvrstva [13]. Možné tvary výsledných struktur jsou uvedeny na *Obrázku 6*.



Obrázek 6: Tvary vzniklých struktur v závislosti na hodnotě Packing parametru [13]

2.2.2 Druhy liposomů

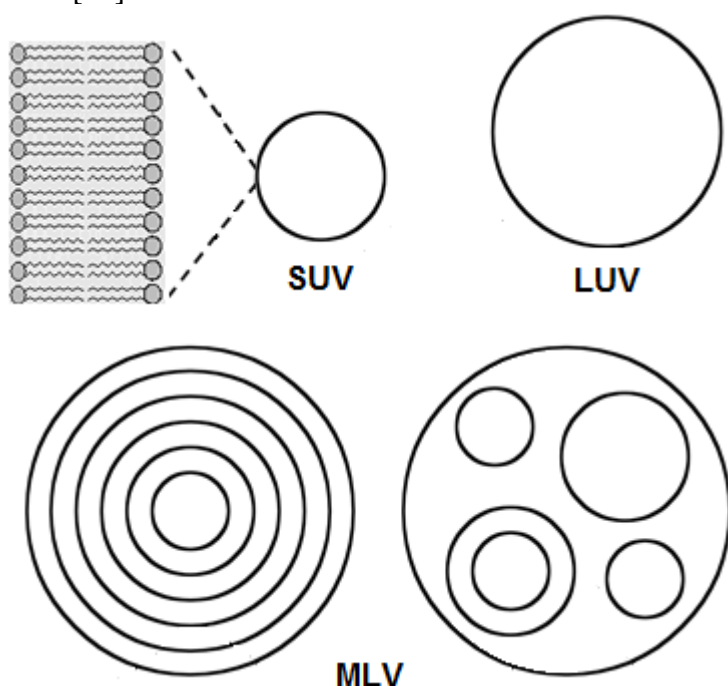
Existují čtyři základní strukturální typy liposomů (*Obrázek 7*), které se připravují odlišnými metodami. Malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles, SUV) jsou vezikuly, které tvoří jedna lipidová dvojvrstva o průměru < 50 nm. Jejich vysoké membránové napětí, vzniklé značným zakřivením membrány, je odlišuje od jiných liposomů. U nejmenších liposomů, které mají průměr kolem 20 nm, je ve vnitřní vrstvě poloviční množství lipidů proti vrstvě vnější. Díky tomu je vnitřní vodní prostor menší, což omezuje možnost inkorporace hydrofilních molekul léčiva. Ovšem díky svému malému průměru mohou být výhodnými nosiči léčiv pro orgánovou distribuci. Tyto liposomy jsou nestabilní, permeabilní pro hydrofilní molekuly a náchylné k fúzi nebo interakci s velkými molekulami [15].

Dalším typem jsou velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles, LUV) tvořené taktéž jednou lipidovou dvojvrstvou, ale jelikož je jejich průměr > 50 nm, tak vykazují nízké membránové napětí a větší stabilitu. Mají potenciál jako nosiče hydrofilních léčiv díky

poměrně vysokému podílu obsahu vody, rovněž mohou být využity jako model přirozené biologické membrány [15].

Velké multilamelární vezikuly (multilamellar large vesicles, MLV) v sobě obsahují několik vrstev membrán a dosahují velikosti 100–1 000 nm. Díky silnější vrstvě lipidu lze při jejich aplikaci jako nosiče léčiv docílit zpomaleného uvolňování léčiva. Umožní to také podání vyšších dávek léčiva a prodloužení terapeutického efektu. Tento typ liposomů vzniká jako vedlejší produkt při přípravě velkých unilamelárních vezikul [15].

Multivezikulární vezikuly (multivesicular vesicles, MVV) obsahují enkapsulované menší vezikuly v jedné větší vezikule. Také vznikají jako vedlejší produkt, tentokrát při výrobě MLV [15].



Obrázek 7: Přehled základních typů liposomů [14]

2.2.3 Aplikace liposomů

Liposomy nachází uplatnění ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu, ovšem jejich celkovému rozšíření brání vysoká cena vstupních surovin a technologická náročnost výroby. V kosmetických a dermatologických přípravcích se využívá hlavně jejich schopnost prostupovat i přes neporušenou kůži a vnášet léčivo do jejich hlubších vrstev [15].

Ve farmacii se liposomy nejběžněji používají jako nosiče léčiv, jelikož díky vysokému množství fosfolipidů umožní enkapsulovanému léčivu snadněji proniknout do nitra cílových buněk. Při celkovém podání umožňují cílenou distribuci do postižené tkáně, nebo jako zásobník léčiva zprostředkovávají řízené uvolňování. V topických přípravcích lze využít i samotné liposomy (bez enkapsulovaného léčiva) jako ochranný prostředek na tělesné povrchy. Rovněž jsou liposomy v biofarmacii a biofyzice velmi často používány jako model biologické membrány nebo distribuční model [15].

2.3 Kyselina hyaluronová

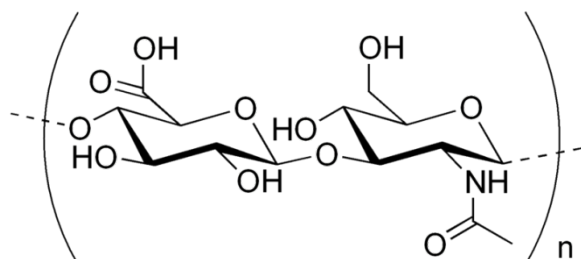
Kyselina hyaluronová byla poprvé připravena v první polovině 19. století. Popsána však byla až v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem, kteří ji izolovali z očního sklivce hovězího dobytka. Jelikož tato kyselina obsahovala uronovou kyselinu, byl její název vytvořen složením slov hyalos (sklovitý) a uronová kyselina [16].

V těle váže vodu a snižuje tření pohyblivých částí těla (klouby a svaly). Často se přidává do různých kosmetických produktů pečujících o pokožku, jelikož má dobrou konzistenci, schopnost hydratace a je přívětivá ke tkáním [17].

2.3.1 Struktura

Kyselina hyaluronová se řadí mezi lineární polysacharidy. Skládá se z opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu (*Obrázek 8*). Tyto jednotky spojují β -1,4 a β -1,3 glykosidické vazby. Oba cukry mají podobné prostorové uspořádání jako glukosa. V molekule kyseliny hyaluronové lze dosáhnout 10 000 a více opakujících se disacharidů. Tím pádem její molekulová hmotnost dosahuje přibližně 4 milionů g/mol (každý disacharid má přibližně 400 g/mol). Délka řetězce pak může dosahovat až 10 μ m [17].

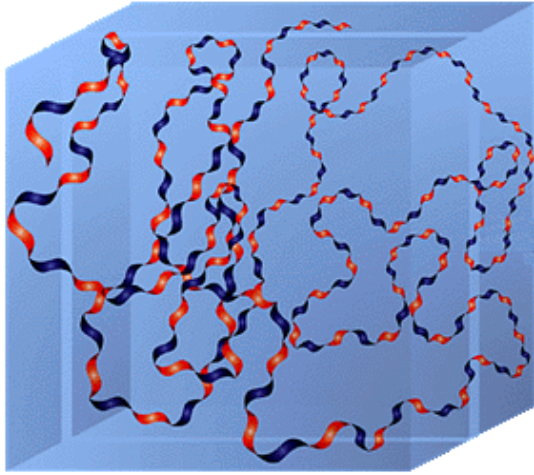
Přirozeně se vyskytuje v extracelulárním matrixu buněk. V lidském těle ji lze ve formě sodné soli nalézt v kůži, oku a synoviální tekutině. V těle je odbourávána enzymem hyaluronidázou a v místě zánětu reaktivními kyslíkatými meziproducty [18].



Obrázek 8: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové

2.3.2 Uspořádání v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je základní opora molekuly kyseliny hyaluronové posilněna kombinací chemické struktury disacharidu s vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku vytvoří nepolární (hydrofobní) část, zatímco ekvatoriální skupiny tvoří část polární (hydrofilní). Díky těmto vlastnostem připomíná struktura hyaluronanu v roztoku zkroucené pásy (*Obrázek 9*). Postranní skupiny karboxylu a acetamidu leží v těsné blízkosti u sebe na obou stranách glykosidické vazby. Při tvorbě soli se každý disacharid natočí tak, aby se na něj mohl navázat co největší kation. Tato rotace je pravděpodobně důvodem hexagonálního uspořádání sousedních řetězců, jelikož je přesně 120°. Některé modely struktury kyseliny hyaluronové v roztoku naznačují, že levotočivá šroubovice je příznivější forma, protože karboxylové a aminoacetalové skupiny jsou stočené směrem od sebe, čímž je poskytnut větší prostor pro vazbu kationtu. U pravotočivé šroubovice jsou tyto mezery menší [19]. Roztoky hyaluronanu projevují velmi neobvyklé reologické vlastnosti a jsou také velmi hydrofilní.



Obrázek 9: Struktura kyseliny hyaluronové ve vodném roztoku, kdy modročervené vlákno představuje dvakrát stočenou šroubovici se střídající se hydrofilní (modrou) a hydrofobní (červenou) zónou [20]

2.3.3 Biokompatibilita

Hyaluronan je tělu vlastní a proto patří mezi biokompatibilní a biodegradovatelné látky. Jeho biologická funkce v organismu se odvíjí od jeho molekulové hmotnosti. Nízkomolekulární hyaluronan (0,4–200 kDa) je regulační molekulou, která zabezpečuje biologickou aktivitu a vysokomolekulární hyaluronan se podílí na organizaci tkání a lubrikačních aktivitách. Jelikož je kyselina hyaluronová jednou z hlavních složek extracelulárního matrixu buněk, tak ji lze najít v epitelových, pojivových a nervových tkáních [21].

2.3.4 Využití v medicíně

Kyselina hyaluronová má díky svým unikátním vlastnostem (např. biodegradovatelnosti a biokompatibilitě) v lékařství široké využití. Klasifikace základních oblastí klinické aplikace hyaluronanu a jeho derivátů podle Balazse [21]:

1. Operace – chrání citlivé tkáně a poskytuje prostor během chirurgických manipulací a očních operací
2. Augmentace – vyplnění mezer v tkáních (kůže, svaly nebo tkáních hltanu)
3. Separace – oddělení povrchů poškozených chirurgickými postupy nebo zraněními od pojivové tkáně, aby se zabránilo nadměrné torbě jizev
4. Suplementace – nahrazení nebo doplnění tkáňových tekutin, jako je například výměna synoviální tekutiny, ke zmírnění bolesti
5. Ochrana – chránění zdravých, zraněných nebo poraněných (od sucha nebo škodlivými látkami) povrchů tkání a podpora jejich hojení

Jakožto přirozená součást oka je kyselina hyaluronová klíčovou podpůrnou makromolekulou v oftalmologii, kde se vzhledem ke své viskoelasticitě používá v řadě operací oka. Nejvíce je využívána jako náhražka nebo pro doplnění tekutiny sklivce, která byla ztracena např. při operacích šedého zákalu nebo implantaci čočky. Další oblastí využití hyaluronanu je kontaktologie, kde je používán jako lubrikační látka očních kapek a roztoků. Díky svým vlastnostem dodá kontaktním čočkám potřebné zvlhčení a přitom nijak nedráždí nebo nepoškozuje oko [21, 23]. V neposlední řadě se využívá při lokální léčbě syndromu suchého oka, kdy se přidává do umělých slz [22].

Hyaluronan nalézá také široké uplatnění v ortopedii a revmatologii např. při léčbě kloubů postižených artritidou. Zdravý kloub umožňuje volný pohyb bez jakékoliv bolesti, pokud je ovšem kloub postižený artritidou, je ztuhlý a pohyb se stává bolestivým. Většina artritických onemocnění (osteoartritida, revmatoidní artritida) je chronických. Při těchto onemocněních dochází k poklesu koncentrace hyaluronanu v synoviální tekutině zhruba na polovinu až třetinu. Také dochází k depolymeraci, čímž se sníží molekulová hmotnost hyaluronanu a tím se zhorší i jeho viskoelastické vlastnosti. Intraartikulární aplikace hyaluronanu, která se používá při léčbě těchto onemocnění, obnovuje reologické vlastnosti synoviální tekutiny. Bylo zjištěno, že intraartikulární aplikace hyaluronanu vede ke stimulaci biosyntetických pochodů buňky a může vyvolat syntézu dalšího potřebného hyaluronanu synoviálními buňkami, dále podpoří proliferaci chondrocytů nebo zabrání degeneraci chrupavky. Dále se prokázalo i protizánětlivé působení a analgetický účinek hyaluronanu, který si buňky vytváří samy [24–26].

V posledních letech se stala velmi zajímavým a diskutovaným tématem možnost využití hyaluronanu jako možného prostředku cílené distribuce léčiv proti rakovině. V současné době je velmi často k léčbě nádorových onemocnění používána chemoterapie, kdy je k dispozici velké množství léků, které lze rozlišit několika mechanizmy účinku. Běžná chemoterapeutická léčiva však postrádají receptory zprostředkovávající specifitu, zastavují růst proliferujících nádorových buněk, ale současně působí i na rychle se množící zdravé buňky. Navíc je řada cytostatik toxická a jsou spojeny s množstvím nežádoucích účinků. Tyto problémy zabraňují plnému využití jejich léčebného potenciálu. Proto byla vyvinuta snaha o vytvoření takového nosičového systému, který by snížil toxicitu léčiva a umožnil jeho cílenou distribuci pouze do nádorových buněk. Bylo zjištěno, že receptory hyaluronanu CD44, RHAMM, ICAM-1 a LYVE-1 se ve větším množství vážou na povrch nádorových buněk, čímž by šlo docílit selektivního transportu léčiva k nádoru a také snižují systémovou toxicitu [27].

Přípravky zesíťovaného hyaluronanu našly uplatnění při hojení akutních ran a popálenin na kůži, kdy je na postižené místo aplikován obvaz s hyaluronanem. Vysoká hydrofilita hyaluronanu způsobí odsávání tekutiny z rány, ale i přitahování vody společně s výživovými a růstovými látkami z ostatních tkání. Tato vlastnost hyaluronanu umožňuje rychlejší a efektivnější hojení. Zesíťovaný hyaluronan se mimo jiné využívá v kosmetice, a to buď pro vyplnění vrásek a jizev, nebo také bývá v dnešní době častou přísadou do krémů proti stárnutí pleti [21, 28]. Dále se také testuje možné použití kyseliny hyaluronové v plastické chirurgii, kde by mohla nahradit silikonové implantáty. Bylo prokázáno, že s použitím hyaluronanu je struktura orgánu vizuálně lepší a ani po roce implantace nebyly zjištěny žádné nežádoucí vedlejší účinky [29].

2.4 Fotoluminiscence

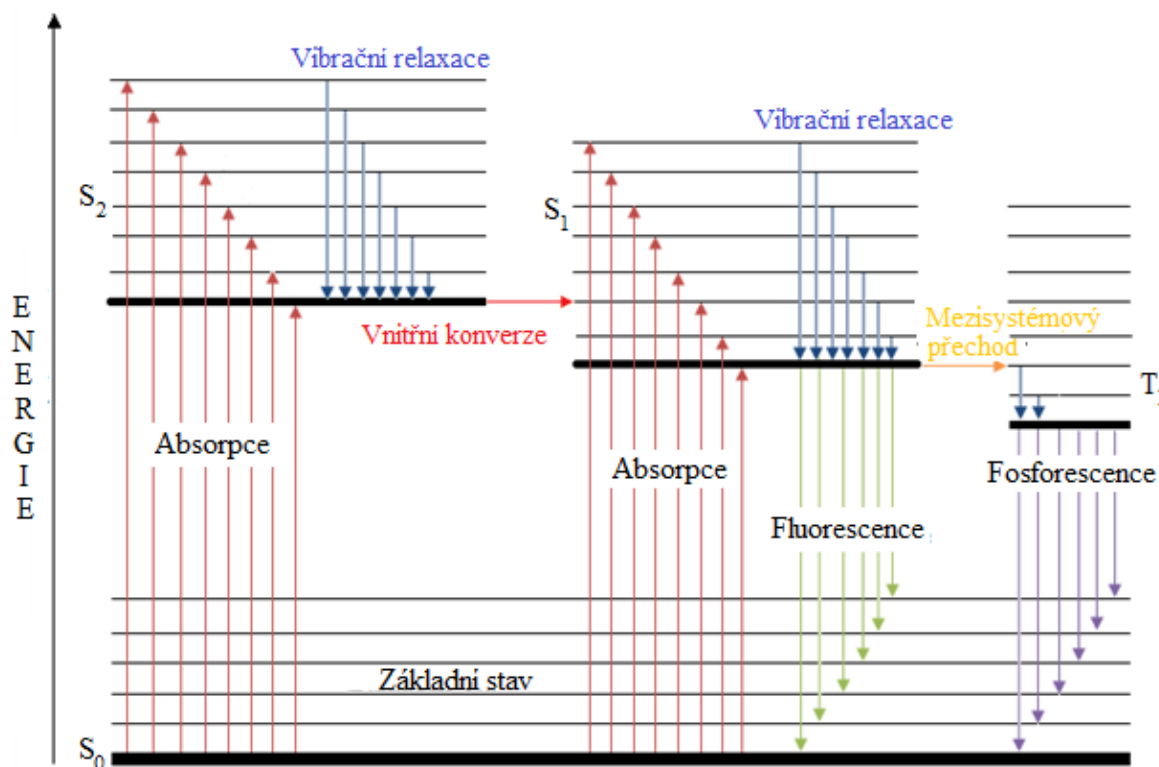
Fotoluminiscence je jev, kdy dochází vlivem absorpce záření o vhodné vlnové délce k excitaci a následné de-excitaci molekuly, která je spojena s emisí záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti.

Přirozeně se molekuly vyskytují v základním energetickém stavu, který je velmi stabilní, jelikož jsou jejich elektrony lokalizované na hladině S_0 s nejnižší možnou energií. Po pohlcení

kvanta světla je elektronům dodána energie, což vede k přechodu do excitovaného stavu. Existují dva typy excitovaných stavů, stav singletový (S_x) a stav tripletový (T_x), ke každému z těchto stavů přísluší vibrační hladiny. Z důvodu nestability excitovaného stavu se elektrony snaží nově nabitou energii zbavit, aby dosáhly opět stabilního základního stavu. Nadbytečná energie elektronů může být odbourávána buď zářivou deaktivací, nebo nezářivými přechody. Všechny jednotlivé přechody znázorňuje Jablůnskiho diagram (Obrázek 10)

Odbourání energie elektronů zářivou deaktivací je možné dvěma způsoby – fluorescencí a fosforescencí. Fluorescence je přechod ze singletového stavu do stavu S_0 , tento přechod trvá přibližně 10^{-9} až 10^{-6} s. Při fosforescenci elektron přechází z tripletového stavu do stavu S_0 . U tohoto jevu dochází ke změně spinu, a proto trvá déle 10^{-4} – 10^2 s.

K nezářivým přechodům se řadí vibrační relaxace, kdy je energie z excitovaného stavu převedena na vibrační energii, která je poté rozptýlena ve formě tepla, vnitřní konverze, kdy elektron přejde mezi stavy se stejnou spinovou multiplicitou, a mezisystémový přechod, při kterém elektron přejde mezi elektronovými stavy s odlišnou multiplicitou (zakázaný přechod). U nezářivých přechodů se na rozdíl od zářivých procesů celková energie systému nemění.



Obrázek 10: Jablůnskiho diagram - schematické znázornění elektronových energetických hladin v molekule a jednotlivých přechodů mezi nimi

2.4.1 Fluorescence

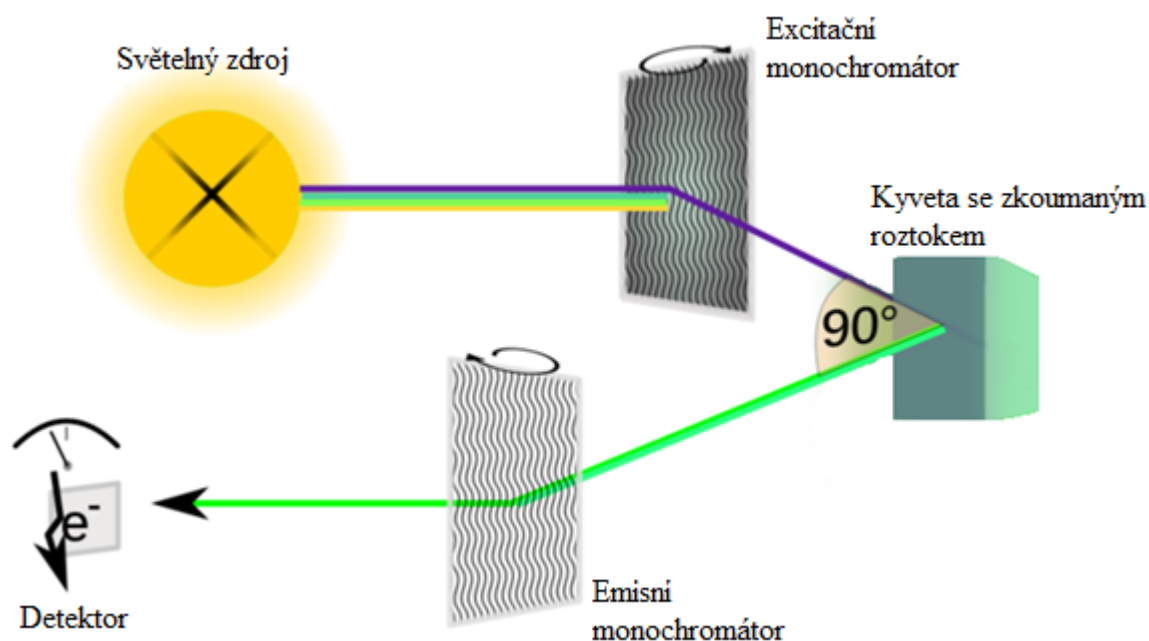
Fluorescence se řídí několika hlavními pravidly a zákony:

1. Stokesův zákon – vlnová délka emise při luminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla, z čehož vyplývá, že emisní spektrum fluoroforu je oproti absorpčnímu posunuto k delším vlnovým délkám. Je to způsobeno ztrátou energie při přechodech z vyšších vibračních hladin do nižších při vibrační relaxaci.

2. Kashovo pravidlo – před emisí fluorescenčního kvanta dochází většinou k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, což způsobí, že ke fluorescenčnímu přechodu dojde z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu.
3. Vavilovo pravidlo – kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace

2.4.2 Instrumentace

Fluorescenční spektrometr, který měří intenzitu emitovaného světla, se skládá z několika hlavních částí – zdroje světla, excitačního monochromátoru, měřicí cely, emisního monochromátoru a detektoru [30]. Jako zdroje světla se nejčastěji používají výbojky (xenonová nebo rtuťová) s dutou katodou. Budící světlo prochází excitačním monochromátorem, kde se vybere určitá vlnová délka, a poté dopadá na vzorek (kyveta s roztokem). Pro viditelnou oblast se používají skleněné kyvety, pro ultrafialovou se využívají kyvety křemenné. Část emitovaného světla prochází emisním monochromátorem, kde se vybere určitá vlnová délka, která dopadá na detektor [31]. Aby nedocházelo k ovlivnění intenzity emisního monochromátoru zdrojem světla, je uspořádání fluorimetru pravouhlé. U měření emisních fluorescenčních spekter je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Když se měří excitační spektra, je na pevnou vlnovou délku nastaven emisní monochromátor. Množství světla dopadajícího na detektor ovlivňuje šířka štěrbin monochromátoru, která je nastavitelná. Fluorescenční spektrometr musí být propojen s počítačem, který má nainstalovaný vhodný program pro vyhodnocování jednotlivých spekter (emisního i excitačního).



Obrázek 11: Schéma fluorescenčního spektrometru

2.4.3 Fluorescenční sondy

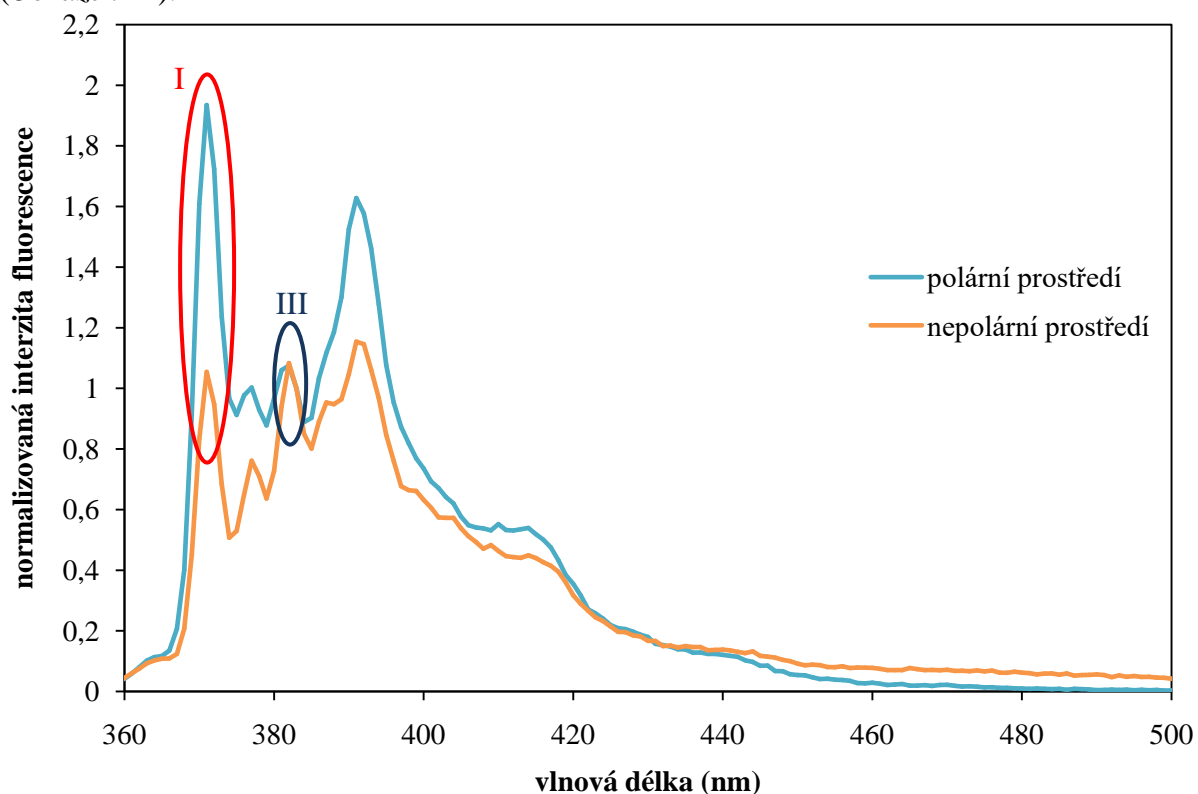
Fluorescenčními sondami se většinou studují fyzikálně-chemické, biologické nebo biochemické systémy. Fluorescenční sondy lze rozdělit do dvou skupin – vlastní (vnitřní) fluorofory a nevlastní fluorofory. Nevlastní fluorofory se přidávají k látce, která sama o sobě nefluoreskuje a lze je rozlišit podle typu vazby k dané molekule na kovalentně a fyzikálně vázané.

Vnitřní sondy jsou molekuly, které vykazují vlastní fluorescenci. Příkladem mohou být proteiny, které fluoreskují v UV oblasti. Z nich jsou hlavními fluorofory aromatické kyseliny jako je tryptofan, fenylalanin nebo tyrozin [32].

Kovalentně vázané nevlastní fluorofory se naváží na zkoumanou látku. Lze s nimi označit určitou molekulu, což umožní její následné zobrazení (lokaci v buňce, sledování určitých vlastností). Fotofyzikální chování fyzikálně vázaných nevlastních fluoroforů je závislé na prostředí, ve kterém se vyskytují (pH, polarita, iontová síla, teplota, tlak,...). Výběr vhodné sondy je klíčovou součástí experimentu [32].

2.4.3.1 Pyren

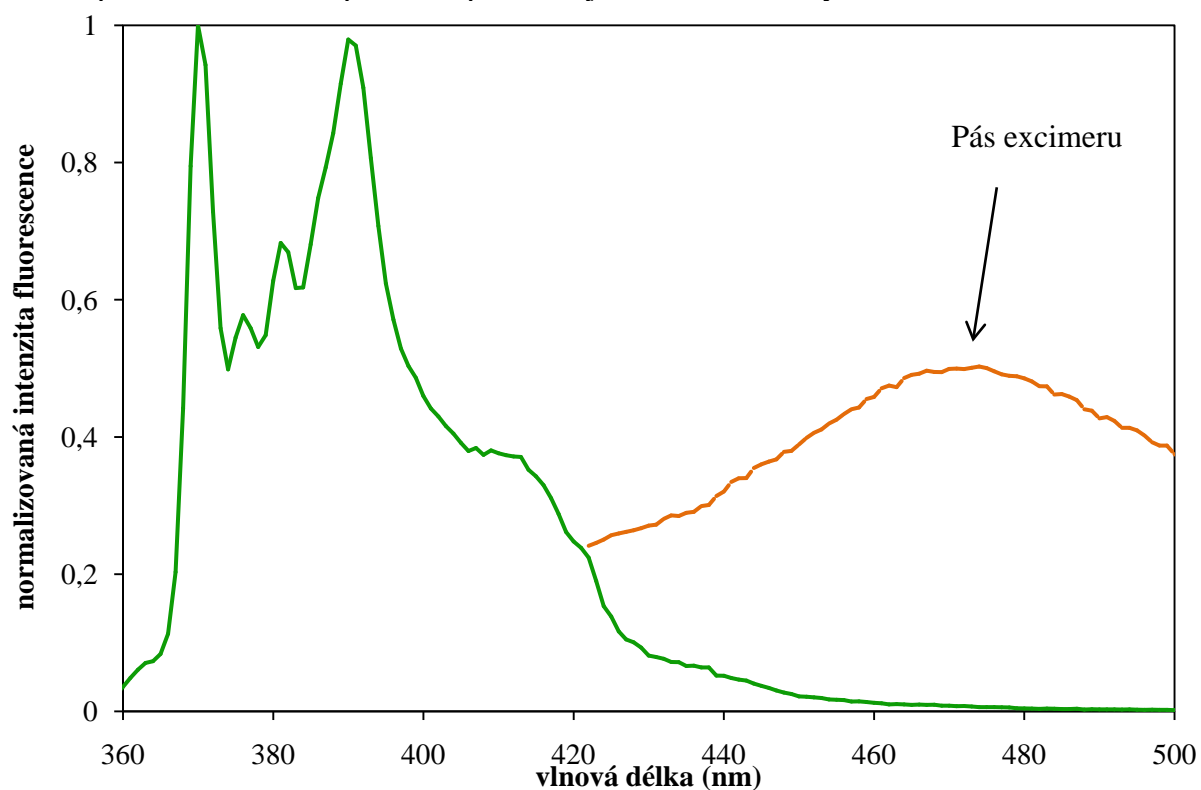
Pyren se řadí mezi polycyklické aromatické uhlovodíky. Díky jeho citlivosti na polaritu patří pyren v dnešní době mezi jednu z nejvíce využívaných sond pro studium hydrofobních oblastí (Obrázek 12).



Obrázek 12: Emisní spektra pyrenu v polárním a nepolárním prostředí

Při vyhodnocování se využívají hodnoty emisního (EmPI) a excitačního (ExPI) polaritního indexu pyrenu. Emisní spektrum tvoří 5 maxim, která přísluší jednotlivým vibračním přechodům. Nejdůležitější jsou hodnoty intenzity prvního (I) a třetího vibračního pásu (III). Přibližně u vlnové délky 373 nm se nachází první vibrační pás, jedná se o vibrační zářivý

přechod 0–0. Třetí vibrační pás, který odpovídá přechodu 0–2, se nachází kolem vlnové délky 383 nm. Podělením hodnot těchto dvou pásů se vypočítá emisní polaritní index (EmPI) 60[33]. Tento index udává informace o polaritě prostředí. V polárním prostředí je hodnota indexu přibližně 1,7 a v nepolárním prostředí je to okolo hodnoty 0,5.



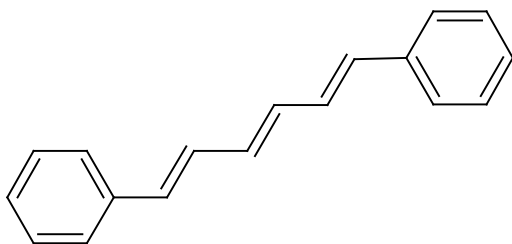
Obrázek 13: Znárodnění pásu excimeru v emisním spektru pyrenu

Dále se zaznamenává intenzita fluorescence při 470 nm, která odpovídá typickému maximu pro excimer (dimer excitované molekuly a molekuly v základním stavu). Vznik epimeru můžeme pozorovat v roztoku tenzidu po dosažení CMC (Obrázek 13). Tehdy je hodnota intenzity fluorescence pásu excimeru nejvyšší. Maximum excimeru následuje po překročení CMC a poté tato hodnota klesá, jelikož se snižuje pravděpodobnost jeho vzniku (dochází ke vzniku více micel a pyren je mezi ně rovnoměrně rozdělen) [33].

Excitační polaritní index (ExPI) se získá z excitačního spektra poměrem naměřené intenzity fluorescence při vlnových délkách 333 nm a 338 nm. Hodnota ExPI je opět vyšší pro polární prostředí než pro prostředí nepolární.

2.4.3.2 DPH

1,6-difenylohexa-1,3,5-trien (Obrázek 14) je válcovitá molekula, která je jednou z nejpoužívanějších anizotropních sond. Jeho podélná osa je rovnoběžná s emisním a absorpčním transmisním momentem, takže je polarizace fluorescence velmi citlivá ke změně orientace podélné osy. Se zvyšující se naměřenou anizotropií fluorescence DPH roste uspořádanost prostředí a klesá jeho fluidita. Tato sonda se využívá ke značení membrán, je nepolární a hydrofobní, takže ve vodě prakticky nefluoreskuje [34].

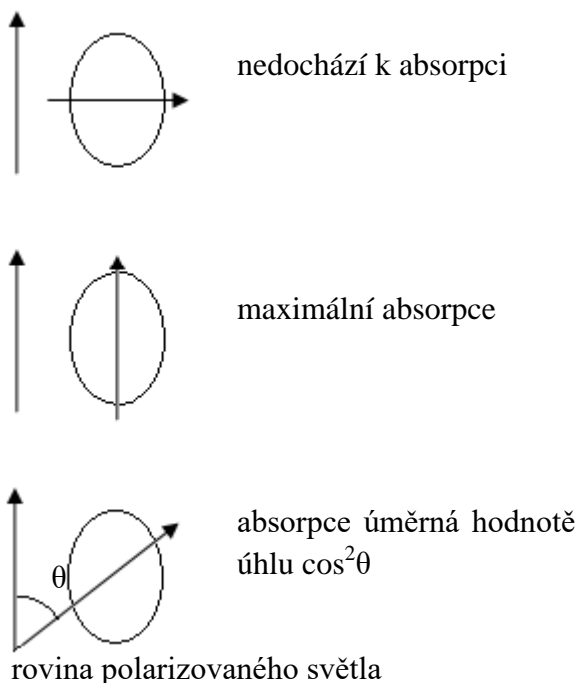


Obrázek 14: Struktura molekuly DPH

2.5 Anizotropie fluorescence

Měření ustálené (steady-state) a časově rozlišené (time-resolved) anizotropie fluorescence se využívá ke stanovení chemických a fyzikálních vlastností molekuly, jako je například informace o molekulární orientaci nebo pohyblivosti a procesech, které je modulují (např. fluidita membrán, interakce lipid-receptor, proteolýza, interakce protein-DNA, kontrakce svalů, aktivita proteokináz) [35].

Principem této metody je fotoselektivní excitace fluoroforu polarizovaným světlem. Pokud dojde k excitaci roztoku lineárně polarizovaným zářením, tak se přednostně excitují molekuly fluoroforu, které mají v rovině elektrického vektoru budícího záření orientovaný vektor absorpčního přechodového momentu. Shoda mezi elektrickým vektorem záření a absorpčním přechodovým momentem fluoroforu nemusí být přesná. Molekuly s nenulovým průmětem absorpčního momentu do směru polarizace záření mohou též excitovat. Pravděpodobnost absorpce fotonu je úměrná $\cos^2\theta$, kde θ je úhel, která svírá dipólový moment přechodu molekuly s rovinou polarizace excitujícího záření. Tento princip se nazývá fotoselekce (viz. Obrázek 15) [35].



Obrázek 15: Fotoselekce

Molekuly fluoroforů jsou v homogenním roztoku orientovány náhodně, takže po ozáření vzorku polarizovaným světlem dochází k selektivní excitaci. Vzniká částečně orientovaná

populace fluoroforů s absorpčními přechodovými momenty orientovanými podél elektrického vektoru polarizovaného záření [35].

Během doby života fluorescence vykonává molekula mnoho pohybů např. rotační vibrace, Brownův pohyb atd., které způsobí, že emitované záření není ve shodě s absorbovaným. Emitované záření je pootočené o určitý úhel a nastává částečná nebo úplná depolarizace. Tato změna je závislá na rozsahu a rychlosti rotační difúze, velikosti a tvaru molekuly. Pokud je molekula ve vysoce viskózním prostředí, které zpomaluje její pohyb, tak je míra depolarizace malá. V případě, kdy je molekula ve fluidním prostředí, bude nastávat úplná depolarizace a hodnota naměřené anizotropie se bude blížit k nule [35].

2.5.1 Polarizační stupeň

Polarizaci fluorescence lze vyjádřit polarizačním stupněm podle rovnice:

$$\bar{p} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}, \quad (2)$$

dle rovnic (4) a (2) existuje mezi polarizačním stupněm a anizotropií fluorescence přepočtení vztah:

$$\bar{r} = \frac{2\bar{p}}{3 - \bar{p}}. \quad (3)$$

2.5.2 Ustálená anizotropie

Ustálená anizotropie se měří při kontinuální excitaci, její hodnotu lze vyjádřit pomocí rovnice:

$$\bar{r} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}, \quad (4)$$

kdy I_{VV} , resp. I_{VH} udávají hodnoty naměřené intenzity emise při paralelní a kolmé orientaci emisního a excitačního polarizátoru. První index odpovídá orientaci excitačního a druhý index orientaci emisního polarizátoru (vertikálně-vertikálně, vertikálně-horizontálně) [35].

2.5.3 Časově rozlišená anizotropie

Pro měření časově rozlišené anizotropie se využívá pulzní excitace (délka pulzu je většinou kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku) nebo fázově modulované budící záření. Hodnotu časově rozlišené anizotropie fluorescence lze vypočítat podle vztahu:

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2 \cdot I_{VH}(t)}, \quad (5)$$

kde $I(t)$ je totální intenzita časově-rozlišené fluorescence. Intenzitu jednotlivých polarizovaných složek jako funkci času lze vypočítat pomocí rovnic:

$$I_{VV}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 + 2r(t)], \quad (6)$$

$$I_{VH}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 - r(t)]. \quad (7)$$

Mezi časově rozlišenou a ustálenou anizotropií existuje vztah:

$$\bar{r} = \frac{\int_0^{\infty} r(t) \cdot I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}. \quad (8)$$

2.5.4 Aditivní zákon anizotropie

Pro ustálenou i časově rozlišenou anizotropií platí, že celková anizotropie směsi je rovna součtu individuálních anizotropií jednotlivých složek. Lze to vyjádřit pomocí vztahu:

$$r = \sum_i f_i r_i, \quad (9)$$

kde index i charakterizuje jednotlivé složky, r_i je anizotropie jednotlivých složek a f_i je celková intenzita fluorescence frakcí [35].

Pokud mají jednotlivé složky směsi mono-exponenciální vyhasínací křivku fluorescence, tak lze hodnotu časově rozlišené fluorescence vypočítat z rovnice:

$$r(t) = \sum_i \frac{a_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right)}{I(t)} r_i(t), \quad (10)$$

kde τ_i je doba života fluorescence [35].

2.5.5 Fundamentální anizotropie

V případě, kdy dipólové momenty v základním a excitovaném stavu nejsou rovnoběžné, ale svírají úhel β , vzroste příspěvek I_{VH} . Fundamentální anizotropie je teoretická hodnota anizotropie při nulovém pohybu fluoroforu. Naměřená hodnota anizotropie (limitní anizotropie) je vždy o něco menší než vypočítaná teoretická hodnota pro daný fluorofor. Pro nehybnou molekulu platí vzorec:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (11)$$

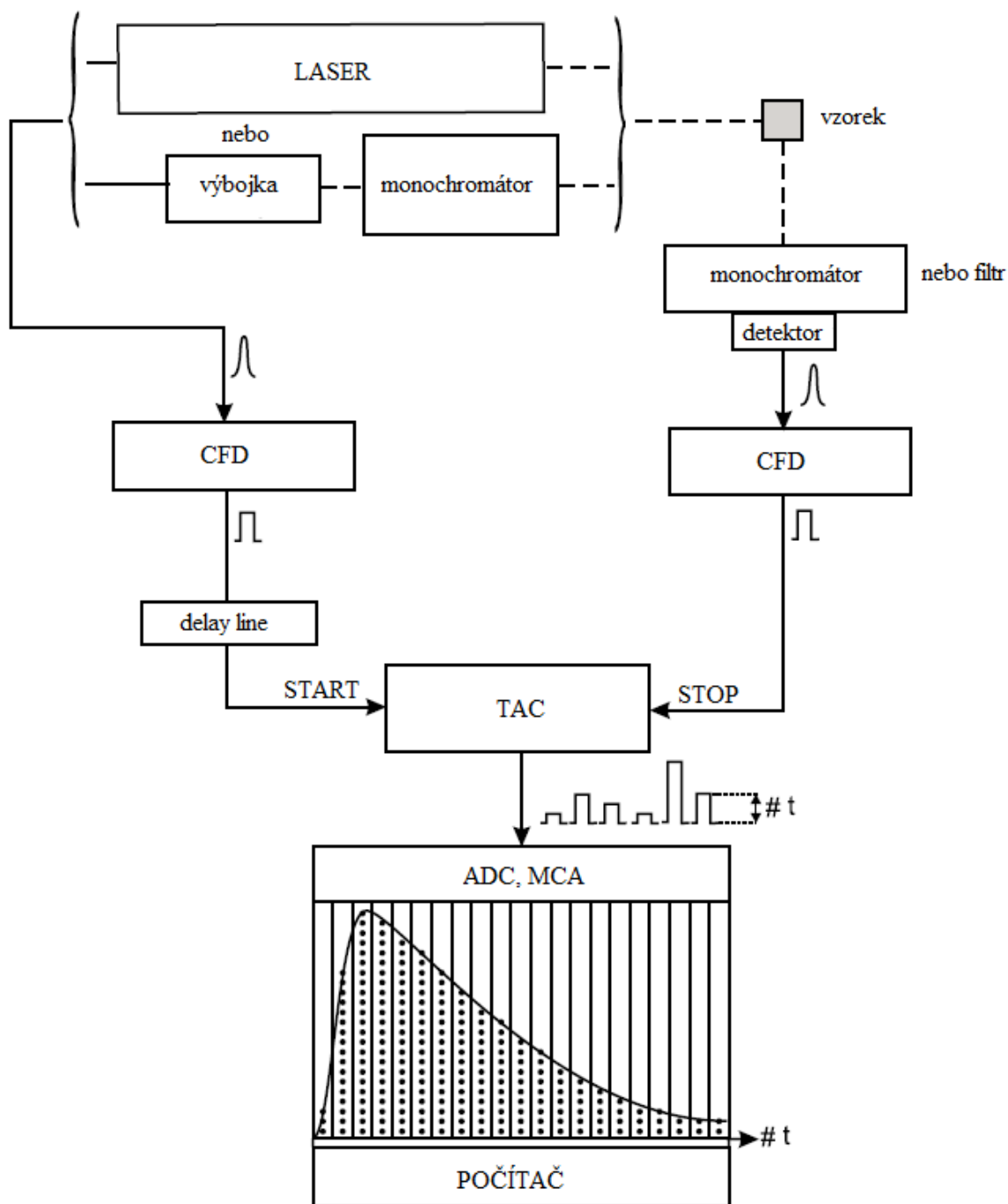
Pro $\beta = 0^\circ$ (souběžné přechodové momenty) nabývá r_0 maximální hodnoty – $r_0 = 0,4$ a pro $\beta = 90^\circ$ (kolmé přechodové momenty) minimální hodnoty – $r_0 = -0,2$ [35].

2.5.6 Princip měření časově rozlišené anizotropie – TCSPC metoda

Metoda TCSPC (time correlated single photon counting) je založena na časově korelovaném sčítání fotonu. Základní princip spočívá v tom, že pravděpodobnost detekce jediného fotonu v čase t po excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v tom čase. Po záznamu jednotlivých fotonů je vytvořena vyhasínací křivka intensity fluorescence [35].

Na *Obrázku 16* je znázorněno schéma zařízení. Budícím zdrojem může být buď výbojka, nebo laser. Excitační pulz posílá současně signál i elektronice prostřednictvím diskriminátoru CFD (constant function discriminator), který změří čas jeho příchodu. Poté signál putuje do převodníku TAC (time-to-amplitude convertor), kde spustí růst napětí v závislosti na čase. Mezitím je vzorek excitován a emituje fluorescenci. Přístroj je pomocí filtrů laděn tak, aby fotonásobič detekoval pouze jeden foton pro každý excitační puls. V diskriminátoru CFD se

určí přesný čas jejich dopadu. Z diskriminátoru jde signál do převodníku TAC, kde zastaví růst napětí. Výstupní signál (výsledné napětí) je úměrný časovému zpoždění mezi začátkem a zastavením pulzů. Napětí je pak v analogově-digitálním převodníku (ADC, analog-to-digital converter) převedeno na číselnou hodnotu. Převedené napětí je uloženo jako jedna událost s časovou prodlevou. Je zřejmé, že čím více událostí, tím přesnější budou vyhasínací křivky. Analýza je prováděna v MCA (multichannel analyzer). Tento proces se opakuje do dosažení určitého počtu detekovaných fotonů. Pro správné vyhodnocení poklesu intenzity fluorescence je potřeba minimálně 4 000 fotonů [35].



Obrázek 16: Schematické znázornění principu měření TCSPC [35]

2.6 Dynamický rozptyl světla

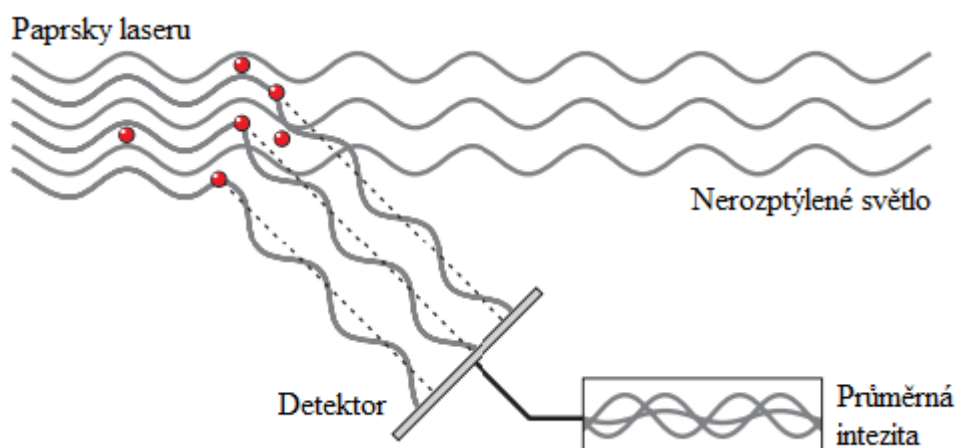
Dynamický rozptyl světla (DLS), který je rovněž nazýván jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS), je neinvazivní technika, která se využívá pro měření velikosti částic v submikronové oblasti. Základem je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje. DLS měří změnu intenzity rozptýleného světla v závislosti na pohybu molekul (Brownův pohyb). Čím jsou částice větší, tím pomalejší je Brownův pohyb. DLS se využívá pro přesné stanovení velikosti částic v suspenzích, charakterizaci emulzí, micel, liposomů a pigmentů.

2.6.1 Velikost částic

Velikost částice je definována Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad (12)$$

kde D_H je hydrodynamický ekvivalentní průměr, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní Kelvinova teplota, η je viskozita kapalného prostředí a D je translační difúzní koeficient [36].



Obrázek 17: Princip měření velikosti [37]

2.6.1.1 Instrumentace

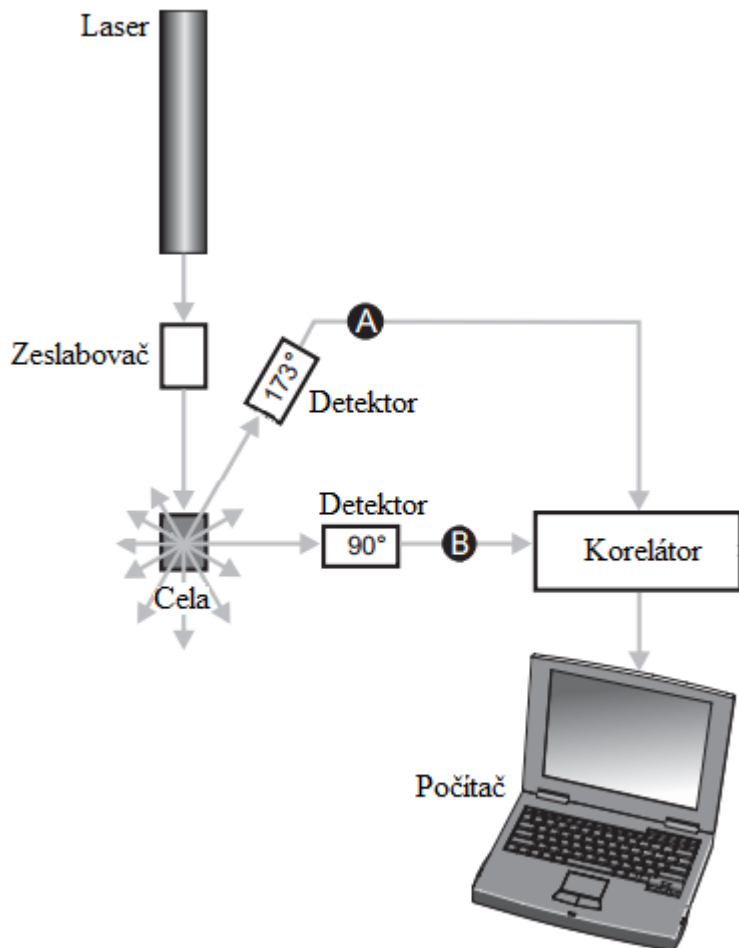
Zdrojem světla, které osvětluje částice vzorku uvnitř cely, je laser. Většina laserových paprsků prochází přes vzorek beze změny, ovšem některé jsou rozptýleny částicemi ve vzorku (viz. Obrázek 17). Pro měření intenzity rozptýleného světla se používá detektor, který by mělo být možné umístit do libovolné polohy, jelikož částice světlo rozptylují všemi směry. Nejčastější pozice umístění detektoru jsou 173° nebo 90° , záleží na modelu přístroje [37].

Intenzita rozptýleného světla musí být v určitém rozsahu, aby ji byl schopný detektor změřit. Pokud je intenzita příliš velká, může dojít k přetížení detektoru a pokud je intenzita příliš malá, nemusel by ji detektor zaznamenat. Zeslabovač (attenuator) podle potřeby snižuje intenzitu laseru a tím i intenzitu rozptylu [37].

Signál jde z detektoru do kolektoru, který digitálně zpracuje signál. Srovná intenzity rozptylu v po sobě jdoucích časových intervalech, tím se odvodí rychlost změny intenzity rozptýleného světla. Tato data jsou poté zpracována speciálním softwarem ZetaSizeru, který

z nich odvodí informaci o velikosti částic. Velikost částic je získána pomocí korelační funkce za použití několika algoritmů [37].

Distribuce velikosti částic lze vyjádřit jako závislost relativní intenzity rozptýleného světla částicemi na velikosti částic. Za použití optických parametrů lze vypočítat objemovou či početní distribuci velikosti částic [37].



Obrázek 18: Schéma zařízení pro měření velikosti částic pomocí metody DLS [37]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Campbell a kol. studovali účinek kationového lipidu DOTAP na fyzikální vlastnosti liposomu, jako je velikost a struktura membrány. Byla měřena teplota fázového přechodu, velikost a fluidita membrány směsi lipidů DOTAP/DPPC [38].

Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie byl zkoumán efekt DOTAP na teplotu fázového přechodu DPPC. Při nízkých koncentracích DOTAP ve směsi byl vliv na teplotu fázového přechodu minimální, ovšem s narůstající koncentrací DOTAP byl zaznamenán pokles teploty fázového přechodu. U čistého DPPC existují dvě fáze (gelová a fáze tekutých krystalů) blízko sebe (dělí je velmi malý rozsah teplot). Jak narůstá koncentrace DOTAP, tak narůstá i teplotní rozmezí, ve kterém může koexistovat gelová a krystalinická fáze. Při obsahu nad 20 mol.% DOTAP ve směsi tvoří směs pouze homogenní fázi kapalných krystalů [38].

Změna fluidity membrány byla měřena pomocí anizotropie fluorescence za použití sondy DPH. Bylo zjištěno, že DOTAP způsobuje větší fluiditu membrány pravděpodobně díky nenasyceným uhlovodíkovým řetězcům mastných kyselin. Dále bylo zjištěno, že při ekvimolárním množství DOTAP a DPPC směs existuje ve fázi tekutých krystalů a i při zvýšených teplotách je schopná si udržet svou strukturální integritu [38].

Dále byl studován vliv DOTAP na velikost samovolně se formujících liposomů. Bylo zjištěno, že DOTAP snižuje průměr liposomu. Největší změny byly pozorovány v rozsahu obsahu 0–20 mol% DOTAP ve směsi. Bylo zjištěno, že menší průměr liposomu souvisí s kladným nábojem na polární hlavě DOTAP, která elektrostaticky interaguje se zwitterionickým DPPC [38].

Regelin a kol. zkoumali biofyzikální parametry a transfekční vlastnosti DOTAP a jeho analogů s jedním kladným nábojem a různými uhlovodíkovými řetězci. Byla změřena stabilita, velikost a membránová fluidita liposomů a lipoplexů. Analogy DOTAP byly použity buď samotné nebo v kombinaci s pomocným lipidem DOPE nebo cholesterolem. Předpokládalo se, že stabilní liposomy vytvoří stabilní lipoplexy. Přídavek DOPE a cholesterolu by měl zlepšovat stabilitu [39].

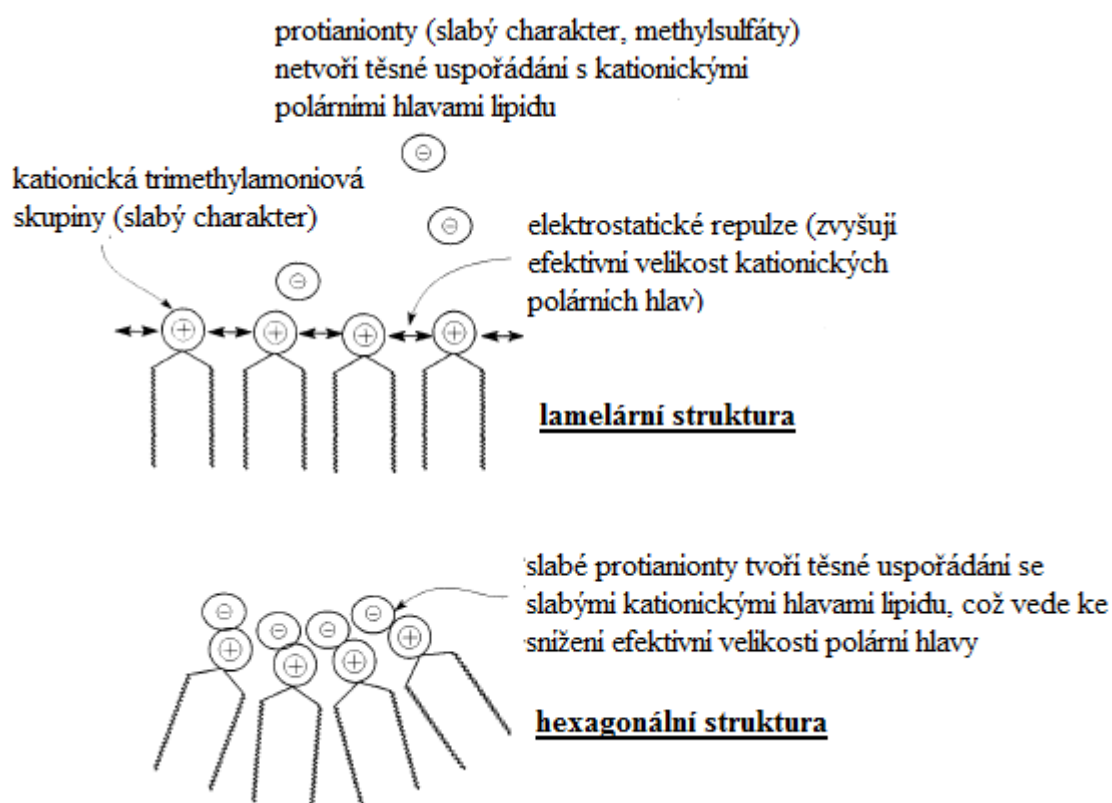
Bylo zjištěno, že kromě DOTAP žádný ze studovaných analogů netvoří při pokojové teplotě stabilní liposomy, během několika minut docházelo k vysrážení lipidických agregátů. Pokud však byly liposomy připraveny nad teplotou fázového přechodu příslušného analogu DOTAP (tyto teploty byly větší než běžná pokojová teplota) nebyla pozorována žádná agregace. Následné snížení teploty liposomových disperzí vedlo opět k tvorbě makroskopických lipidových agregátů. Po začlenění pomocného lipidu se stabilita agregátů zvýšila. Nízká teplota fázového přechodu DOTAP (5 °C) je způsobena jeho nenasyceným uhlovodíkovým řetězcem mastných kyselin [39].

Liposomy, které se skládaly z rozdílných lipidů, měly obecně průměr menší než 100 nm. Velikost liposomů tvořených čistě kationickými lipidy bez pomocných lipidů se pohybovala v rozmezí 23–58 nm. V přítomnosti DOPE byla velikost částic zhruba 20–160 nm a v přítomnosti cholesterolu přibližně 59–95 nm. Nebyla zjištěna žádná závislost mezi velikostí částic a délkou uhlovodíkových řetězců [39].

Anizotropie fluorescence byla v případě DOTAP sledována v rozsahu teplot 20–50 °C. Byla naměřena poměrně nízká hodnota anizotropie, která se s narůstající teplotou téměř neměnila. Po přidání pomocného lipidu DOPE a cholesterolu nenastala, na rozdíl od ostatních

lipidů, téměř žádná změna v hodnotách anizotropie. Samotný DOTAP a směsi DOTAP s pomocnými lipidy vykazovaly nejmenší hodnoty anizotropie ze všech zkoumaných systémů [39].

Jedním z důvodů nestability liposomů mohou být kladně nabitě polární hlavy lipidu. Stabilita může být vysvětlována jako preference lamelární fáze před hexagonální, jenomže s poklesem velikosti polárních hlav je upřednostňována právě fáze hexagonální, což by mohlo být důvodem nestability. Důvodem může být formace úzkých iontových párů mezi kationickými polárními hlavami a protianionty při a pod teplotou fázového přechodu. Elektrostatické repulze mezi polárními hlavami mohou být redukovány, což způsobí zmenšení velikosti polárních hlav a tím přechod do hexagonální fáze (viz. *Obrázek 19*) [39].



Obrázek 19: Model znázorňující interakce mezi analogy DOTAP a lipidovou dvojvrstvou [39]

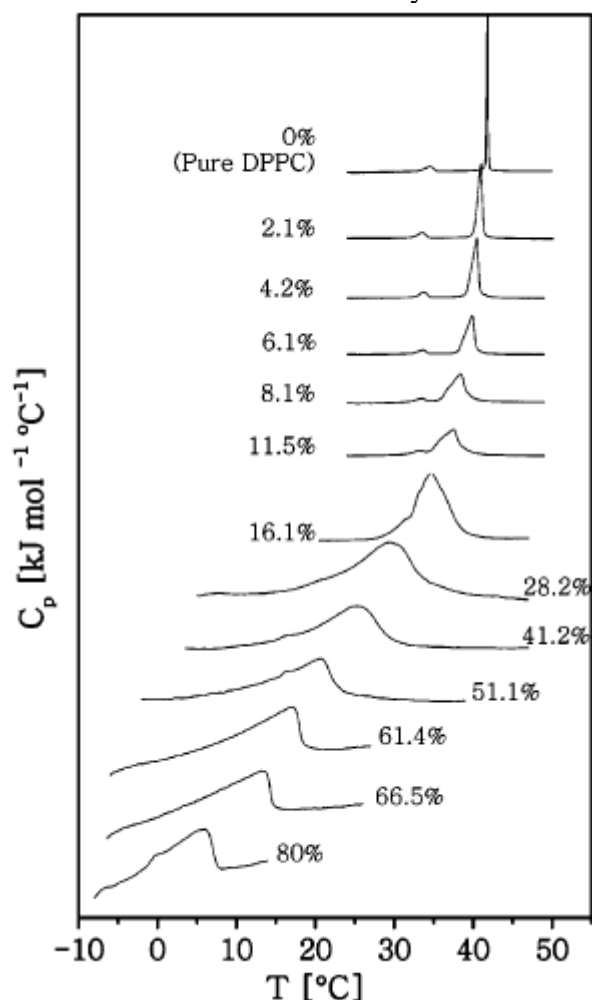
Bordi a kol. se zaměřili na časový vývoj agregačního chování komplexu kationických lipidů s polyelektrolytem pomocí dynamického rozptylu světla. Byl použit čistý DOTAP a směs DOTAP s DPPC v roztoku polyakrylátové sodné soli. V širokém rozmezí koncentrací byla zkoumána velikost a distribuce velikosti [40].

Bylo zjištěno, že směsi lipidů DOTAP/DPPC jsou si podobné. Průměr částic se pohyboval okolo 80 nm, tato hodnota byla konstantní i po několika týdnech. Dále bylo zjištěno, že čistý DOTAP a směs DOTAP/DPPC v přítomnosti polyelektrolytu (polyakrylátová sodná sůl) tvoří dva druhy agregátů, jejichž změna velikosti s časem je ovlivněna poměrem nábojů a molekulovou hmotností polyelektrolytu. Menší agregáty měly průměr kolem 100–500 nm a větší agregáty 1–5 μm [40].

V další publikaci se **Cinelli a kol.** věnovali účinku kationického DOTAP na termotropní chování a organizaci struktury vodného roztoku DPPC. Bylo zjištěno, že inkorporace

rostoucího množství DOTAP postupně snižuje teplotu fázového přechodu z gelové fáze na fázi tekutých krystalů [41].

Poté byl zkoumán vliv změny teploty fázového přechodu na velikost částic. Ve smíšených systémech DOTAP/DPFC je snížení teploty fázového přechodu doprovázeno snížením průměrné velikosti částic vznikajících v roztoku. Tato studie potvrzuje, že vložení kationových lipidů mezi lipidy zwitterionické fosfatidylcholinové dvojvrstvy usnadňuje tvorbu stabilních a relativně malých unilamelárních vezikul [41].



Obrázek 20: Kalorimetrické skeny vodných suspenzí směsí DOTAP/DPFC o koncentraci 5 mg/ml [41]

Briuglia a kol. studovali, jaké množství cholesterolu je vhodné přidat k lipidu, aby se vytvořila co nejstabilnější částice pro kontrolovatelné dodání léčiva. Tato studie se prováděla se třemi fosfolipidy DPPC, DMPC a DSPC, které byly smíchány v různých molárních poměrech s cholesterolem (100, 80/20, 70/30, 60/40 a 50/50). Měření byla prováděna při 2 teplotách po dobu 30 dní [42].

Bylo zjištěno, že cholesterol zlepšuje stabilitu a směs s ním tvoří organizovanější strukturu. Dále byl ověřen předpoklad, že směs lipid/cholesterol v poměru 70/30 dosahuje nejvyšší stability a flexibility, což zaručí kontrolovatelné a reprodukovatelné uvolnění léčiva s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a farmaceutickými aplikacemi [42].

Gómez Gaete a kol. charakterizovali morfologii, strukturu a supramolekulární uspořádání mikročástic, které vznikly rozprášením a usušením směsi DPPC a hyaluronanu. Pomocí

rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) bylo zjištěno, že mikročástice DPPC jsou malé a silně agregované, fosfolipidy byly organizované v lamelární struktuře. Podrobnější studium struktury ukázalo, že řetězce jsou tuhé, plně roztažené, nakloněné a orientované podle hexagonální mřížky uvnitř roviny dvojvrstvy. Časem se DPPC uvnitř dvojvrstvy reorganizuje do kosočtvercové struktury. Tato kombinace agregace a nestabilní supramolekulární organizace lipidové matrice je nepříznivá pro zapouzdření léčiva, jelikož schopnost uvolnění léčiva je silně závislá na agregaci a organizaci částic [43].

Bylo zjištěno, že přídavek HyA silně ovlivňuje morfologii a hustotu mikročástic DPPC, ale nemění supramolekulární organizaci fosfolipidů. Čím je HyA koncentrovější, tím jsou částice větší a méně agregované a dochází i ke změně morfologie (z hustých kuliček do dutých skořepin). Naproti tomu supramolekulární organizace zůstává nezávislá na koncentraci HyA, DPPC zůstává v lamelární fázi a HyA je většinou vložena mezi polární hlavy DPPC. Dále bylo zjištěno, že po přidání HyA se struktura DPPC časem nemění, HyA brání přeskupení fosfolipidů do kosočtvercové struktury. Tyto výsledky naznačují, že přídavek HyA zlepšuje stabilitu a fyzikální vlastnosti částic [43].

Další publikace **Gómez Gaete a kol.** pojednávala o supramolekulární organizaci mikročástic zapouzdřujících dexamethason (DXM), které byly připraveny sušením rozprášené směsi DPPC a hyaluronanu. Bylo studováno supramolekulární upořádání mikročástic a účinek excipientu na kinetiku uvolňování léčiva. Bez hyaluronanu došlo po přidání DXM k silné agregaci částic, která není pro aplikaci příznivá. V přítomnosti HyA (5 %–20 %) se agregační účinky DXM prakticky potlačí a vznikají spíše monodisperzní a dobře oddělené mikročástice [44].

Interakce mezi léčivem a excipienty byla studována pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a rentgenové difrakce. DSC ukázalo, že pouze malá část DXM interaguje s DPPC, zatímco rentgenová difrakce tuto interakci nezaznamenala. Tato interakce se liší v závislosti na přítomnosti HyA. V případě roztoku obsahujícího pouze lipid DPPC může být DXM částečně začleněn do dvojvrstev, zatímco u směsi DPPC/HyA se DXM na dvojvrstvách pouze adsorbuje. Studie *in vitro* uvolňování ukázala, že HyA nemění kinetiku uvolňování hydrofobního léčiva. Ve všech případech bylo během první hodiny zaznamenáno uvolnění DXM [44].

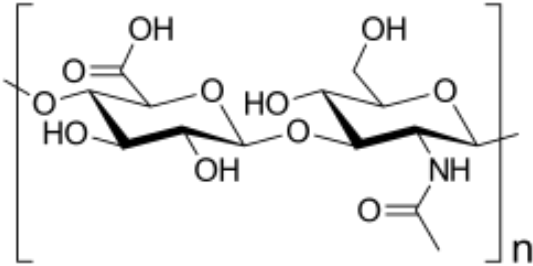
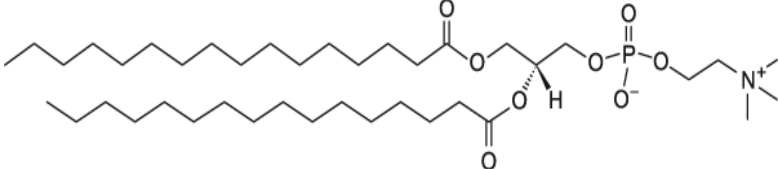
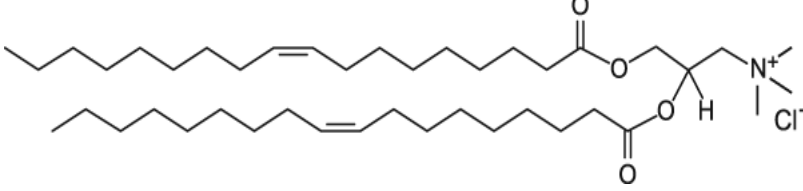
Gasperini a kol. se zabývali vztahem mezi nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou (16 kDa) a kationovými liposomy složenými z EPC, DOPE a DOTAP. U komplexů kationových liposomů a HyA byla určena struktura, průměrná velikost, zeta potenciál a morfologie. Bylo zjištěno, že sousední kationové liposomy se buď částečně „potáhnou“ nízkomolekulární HyA nebo zcela dispergují, ale nikdy netvoří multilamelární strukturu. Vysoké koncentrace HyA (více než 20 hmot.%) se ukázaly jako účinné pro potahování extrudovaných liposomů, což vede ke vzniku komplexů částic s velikostí v rozsahu nanometrů a záporným zeta potenciálem [45].

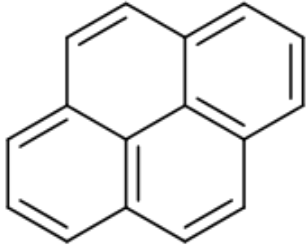
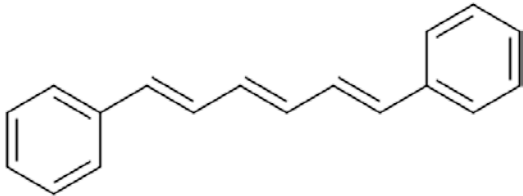
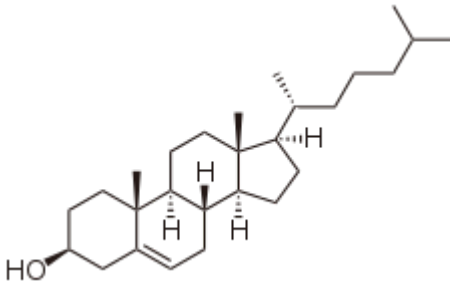
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro experimentální část byly vybrány lipidy DOTAP a DPPC. Pro měření kritických agregačních koncentrací (CAC) byly použity čistý DOTAP a směsi DOTAP/DPPC v poměru 50/50 a 25/75. CAC byly proměřeny jak pro samotné lipidy, tak pro lipidy v přítomnosti polymeru. Vzhledem ke kladně nabitým trimethylammoniovým skupinám na polární části DOTAP byl jako biopolymer zvolen záporně nabitý hyaluronan sodný.

Dále byl zjištěn parametr uspořádání lipidu, který byl vypočítán pomocí měření anizotropie fluorescence za použití sondy DPH. Měření nejprve proběhlo u směsi DOTAP/DPPC a poté byl ke směsím přidán cholesterol. Byly proměřeny i velikosti směsných liposomů pomocí měření rozptylu světla. Dále byly změřeny také teploty fázového přechodu u vybraných směsí.

4.1 Chemikálie

Polyaniont	<p>Kyselina hyaluronová, sodná sůl (HyA) 340 kDa, CPN spol. s.r.o, šarže: 213-6349</p> 
Lipidy	<p>DPPC, 1,2-dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-fosfocholin, CAS: 63-89-8, Avanti Polar Lipids, > 99 %, šarže: 160PC-315</p>  <p>DOTAP, 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan, CAS: 132172-61-3, Avanti Polar Lipids, šarže: 181TAP-158</p> 
Rozpouštědla	<p>superčistá voda (upravená systémem PURELAB flex) Chloroform, CAS: 67-66-3, Sigma-Aldrich, šarže: PP/2008/05926/0 Aceton, CAS: 67-64-1, Lach-Ner, šarže: PP/2013/03951</p>

Fluorescenční sondy	pyren, CAS: 1299-00-0, Fluka, puriss. p. a. for fluorescence, šarže: 430166/1 
	DPH, 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien, CAS: 1720-32-7, Fluka, ≥ 98%, šarže: 1054132 
Ostatní	Cholesterol, 5-Cholesten-3β-ol, CAS: 57-88-5, Sigma-Aldrich, ≥ 99%, šarže: 26732-25G-F 

4.2 Metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

4.2.1.1 Zásobní roztoky DOTAP a jeho směsí s DPPC

Zásobní roztoky DOTAP a směsí DOTAP s DPPC byly připraveny rozpuštěním příslušných množství lipidů v požadovaném poměru v 0,5 ml chloroformu. Chloroform byl poté v digestoři odpařen za sníženého tlaku. Vzniklý lipidový film byl hydratován v příslušném objemu superčisté vody a za postupného zahřívání na teplotu přibližně 50 °C sonifikován, dokud nebyl čirý a bez viditelných částic (zhruba 4–5 hodin). Po sonifikaci a vychladnutí na laboratorní teplotu byly zásobní roztoky ihned použity na přípravu koncentračních řad.

4.2.1.2 Zásobní roztoky DOTAP a jeho směsí s DPPC a cholesterolem

Zásobní roztoky DOTAP a jeho směsí s DPPC a cholesterolem byly připraveny rozpuštěním příslušných množství lipidů v požadovaném poměru (cholesterol byl ve směsi v množství 30 mol.%) ve 0,7 ml chloroformu, který byl poté v digestoři odpařen za sníženého tlaku. Vzniklý lipidový film byl hydratován v příslušném objemu superčisté vody a za postupného zahřívání na teplotu přibližně 50 °C sonifikován, dokud nebyly roztoky čiré (roztoky byly ponechány v ultrazvuku přes noc). Po sonifikaci a vychladnutí na laboratorní teplotu byly

zásobní roztoky ihned použity na přípravu koncentračních řad. Směsi lipidů s cholesterolem byly použity na měření anizotropie fluorescence, velikosti agregátů v roztoku a teploty fázového přechodu.

4.2.2 Příprava zásobních roztoků hyaluronanu

Zásobní roztoky hyaluronanu byly připraveny rozpuštěním navážky HyA a jejím rozmícháním v malém množství vody na magnetické míchačce. Po úplném rozpuštění HyA byl roztok doplněn vodou na přesný objem, aby měl požadovanou koncentraci (0,9 g/l). Všechny zásobní roztoky hyaluronanu byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

4.2.3 Příprava vzorků

4.2.3.1 Příprava koncentračních řad pro měření kritické agregační koncentrace

Byly připraveny 3 shodné koncentrační řady obsahující 18–22 vzorků se vzrůstající koncentrací lipidů. Do vialek bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu, aby výsledná koncentrace pyrenu ve vzorcích byla řádově 10^{-6} M. Aceton byl následně v digestoři odpařen. Poté bylo do vialek pipetováno příslušné množství daného zásobního roztoku lipidů a nakonec byly vzorky doplněny vodou na celkový objem 3 ml. Vzorky byly ponechány na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 17–24 hodin.

Roztoky s příměsí HyA byly připraveny obdobným způsobem, nejprve byl napipetován zásobní roztok pyrenu (ve výsledné koncentraci 10^{-6} M), aceton byl následně v digestoři odpařen. Do vialek bylo poté pipetováno příslušné množství daného zásobního roztoku lipidů, k němuž byl HyA pipetován v různých objemech, aby bylo v roztoku dosaženo jeho požadované koncentrace (5, 15 a 30 mg/l). Následně byly vzorky doplněny vodou na celkový objem 3 ml a ponechány na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 17–24 hodin.

4.2.3.2 Příprava vzorků pro měření anizotropie

Byly připraveny 3 shodné vzorky obsahující příslušnou směs lipidů o koncentraci 1 mM. Do vialek bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku DPH v acetonu, aby výsledná koncentrace DPH ve vzorcích byla řádově 10^{-6} M, vialky byly ponechány v digestoři, aby se aceton odpařil. Poté bylo do vialek pipetováno příslušné množství daného zásobního roztoku lipidů a nakonec byly vzorky doplněny vodou na celkový objem 3 ml. Vzorky byly ponechány na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 17–24 hodin.

4.2.3.3 Příprava vzorků pro měření velikosti liposomů

Byly připraveny vzorky obsahující příslušnou směs lipidů o koncentraci 1 mM. Do vialek byl nejdříve napipetován příslušný objem směsi lipidů ze zásobního roztoku a poté byly vzorky doplněny vodou na celkový objem 3 ml.

4.2.3.4 Příprava vzorků pro měření teploty fázového přechodu pomocí mikrokolorimetrie

Byly připraveny 2 vzorky směsi DOTAP/DPPC v poměru 50/50 (bez i s cholesterolem) a 25/75. Koncentrace směsi lipidů ve vzorcích byla 2 mM v celkovém objemu 2 ml.

4.2.4 Měření a zpracování výsledků

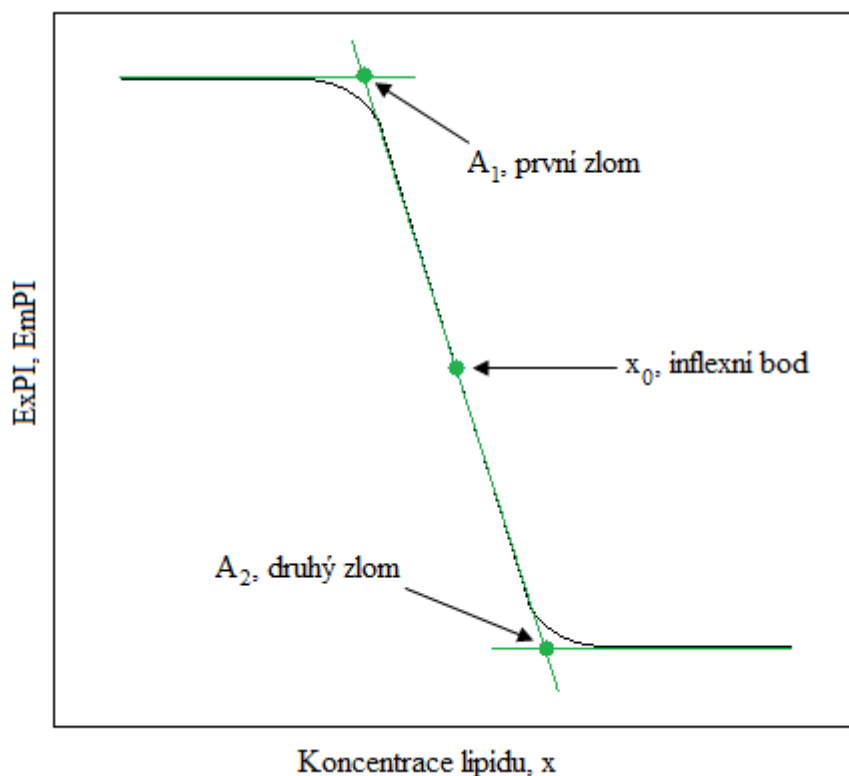
4.2.4.1 Měření kritické agregační koncentrace

Pomocí přístroje Aminco Bowman Series 2 byly proměřeny emisní a excitační spektra. Monochromátory byly pro emisní sken nastaveny s excitační vlnovou délkou 335 nm a štěrbinou 4 nm, pro excitační sken s emisní vlnovou délkou 392 nm a štěrbinou též 4 nm. Citlivost detektoru přístroje byla nastavena na 700 V. Emisní sken byl měřen v rozsahu 360–510 nm a excitační v rozsahu 320–340 nm s rychlostí snímání $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$. Z emisního skenu byla zaznamenávána intenzita fluorescence prvního (373 nm) a třetího (383 nm) vibračního pásu a intenzita pásu excimeru (při 470 nm). Emisní polaritní index (EmPI) byl získán podělením intenzit fluorescence prvního a třetího pásu. Hodnoty Ex:Mo získány podělením intenzit fluorescence pásu excimeru a monomeru (první vibrační pás). Z excitačního skenu byl získán excitační polaritní index (ExPI) podělením intenzit fluorescence při 333 nm a 338 nm. Měření bylo prováděno vždy třikrát a naměřená data byla zprůměrována.

Do grafů byly vyneseny hodnoty ExPI a EmPI na koncentraci lipidů v logaritmickeém měřítku. Získané závislosti měly charakter S-křivky, a proto byly v programu Origin proloženy Boltzmannovou závislostí (viz. Rovnice (13), *Obrázek 21*).

$$ExPI, EmPI = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2, \quad (13)$$

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



Obrázek 21: Znárodnění Boltzmannovy závislosti

4.2.4.2 Určení anizotropie fluorescence DPH

Na měření časově-rozlišené anizotropie fluorescence DPH byl použit přístroj Fluorocube. Vzorky lipidů byly v křemenné kyvetě excitovány nanoLED diodou s vlnovou délkou 372 nm. Pro měření vyhasínacích křivek fluorescence, které jsou potřebné pro vyhodnocení časově rozlišené anizotropie fluorescence, byl emisní monochromátor nastaven na 426 nm, Coaxial delay 95 ns, TAC range 200 ns, RT preset 0 s, Peak preset 0 counts, Repetition Rate 1 MHz a Sync delay 115 ns.

U každého vzorku bylo také provedeno měření G-faktoru s nastavením emisního monochromátoru odpovídajícímu fluorescenční sondě DPH. Prompt (signál lampy) byl stanoven za použití roztoku Ludox (suspenze koloidního křemíku) s emisním monochromátorem nastaveným na vlnovou délku použité diody (372 nm).

K analýze dat získaných měření časově-rozlišené fluorescence byl použit program DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software, přičemž byla použita metoda rekonvoluční analýzy. V programu DAS6 můžou být naměřená data proložena 1–5 exponenciální matematickou funkcí, jejíž základní rovnice je:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right), \quad (14)$$

kde A je fitovací parametr, B_i představuje před-exponenciální funkci, t reprezentuje čas a τ_i je příslušná doba života.

Nejprve je nutné analyzovat „sumu“ naměřených poklesů fluorescence pomocí funkce, jejímž obecným základem je rovnice (14). Pro pokles fluorescence DPH se používá dvou-exponenciální model (15):

$$I(t) = R(\text{inf}) + B_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + B_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right), \quad (15)$$

$$R(0) = R(\text{inf}) + B_1 + B_2.$$

$R(\text{inf})$ udává rovnovážnou (infinitní) hodnotu anizotropie fluorescence, $R(0)$ je hodnota počáteční anizotropie fluorescence, B_1 a B_2 představují před-exponenciální funkce a τ_1 a τ_2 jsou příslušné rotační kolmační doby.

Poté je vypočítán G-faktor jako průměrná hodnota fluorescence (16), aby se minimalizovaly důsledky odlišného přenosu polarizované složky světla monochromátory.

$$G = \frac{I_{\text{HV}}(t)}{I_{\text{HH}}(t)}. \quad (16)$$

Za použití vypočítané hodnoty G-faktoru byla vypočítána anizotropie fluorescence DPH v daném roztoku směsi lipidů pomocí rovnice (17):

$$r(t) = \frac{I_{\text{VV}}(t) - GI_{\text{VH}}(t)}{I_{\text{VV}}(t) + 2GI_{\text{VH}}(t)} = \frac{I_{\text{VV}}(t) - \frac{I_{\text{HV}}(t)}{I_{\text{HH}}(t)} \cdot I_{\text{VH}}(t)}{I_{\text{VV}}(t) + 2 \frac{I_{\text{HV}}(t)}{I_{\text{HH}}(t)} \cdot I_{\text{VH}}(t)}. \quad (17)$$

4.2.4.3 Výpočet parametru uspořádání

Parametr uspořádání lipidu (S) a efektivní parametr uspořádání lipidu (S_{eff}) byly vypočítány z hodnot anizotropie fluorescence DPH následovně:

$$S = \left(\frac{r}{r_0} \right)^{1/2}, S_{\text{eff}} = \left(\frac{r}{0,4} \right)^{1/2}, \quad (18)$$

kde r je vypočítaná hodnota anizotropie a r_0 je počáteční hodnota anizotropie molekuly. Častěji se setkáme s výpočtem efektivního parametru uspořádání lipidu, kdy je v případě DPH hodnota r_0 rovna 0,4.

4.2.4.4 Měření velikosti agregátů

Velikost připravených agregátů byla proměřena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji ZetaSizer Nano ZS, každý vzorek byl proměřen třikrát. Měření probíhalo ve skleněných kyvetách při konstantní teplotě (25 °C). Byla nastavena doba ekvilibrace na 50 s, jelikož vzorky byly skladovány při laboratorní teplotě. Poloha v kyvetě, při které laser snímal rozptyl částic vzorků, byla pro každý vzorek volena automaticky. Výsledkem byla závislost intenzity rozptýleného světla na velikosti částic.

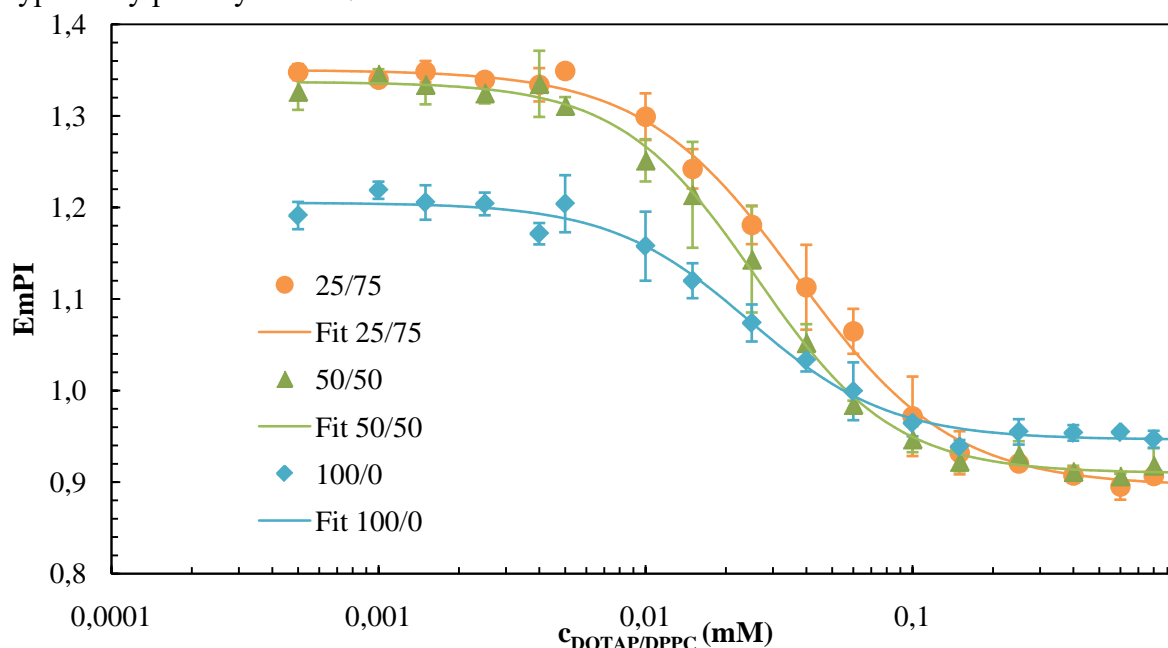
4.2.4.5 Měření teploty fázové přechodu

Teploty fázového přechodu byly studovány pomocí přístroje TAM III (thermal activity monitor), kdy byly připravené roztoky lipidu nebo lipidové směsi zváženy (váhy jednotlivých roztoků se pohybovaly v rozmezí 1,6–1,9 gramů) a umístěny do ampulí s těsnícím krytem. Vzorky byly kalibrovány do rovnovážného stavu při teplotě 15 °C po dobu 2 hodin. Rychlost skenování byla nastavena na 2 °C/h. Veškeré teplo, které vznikalo nebo bylo vzorkem absorbováno, se nepřetržitě po dobu měření zaznamenávalo. Měření bylo provedeno v rozsahu teplot 15–50 °C.

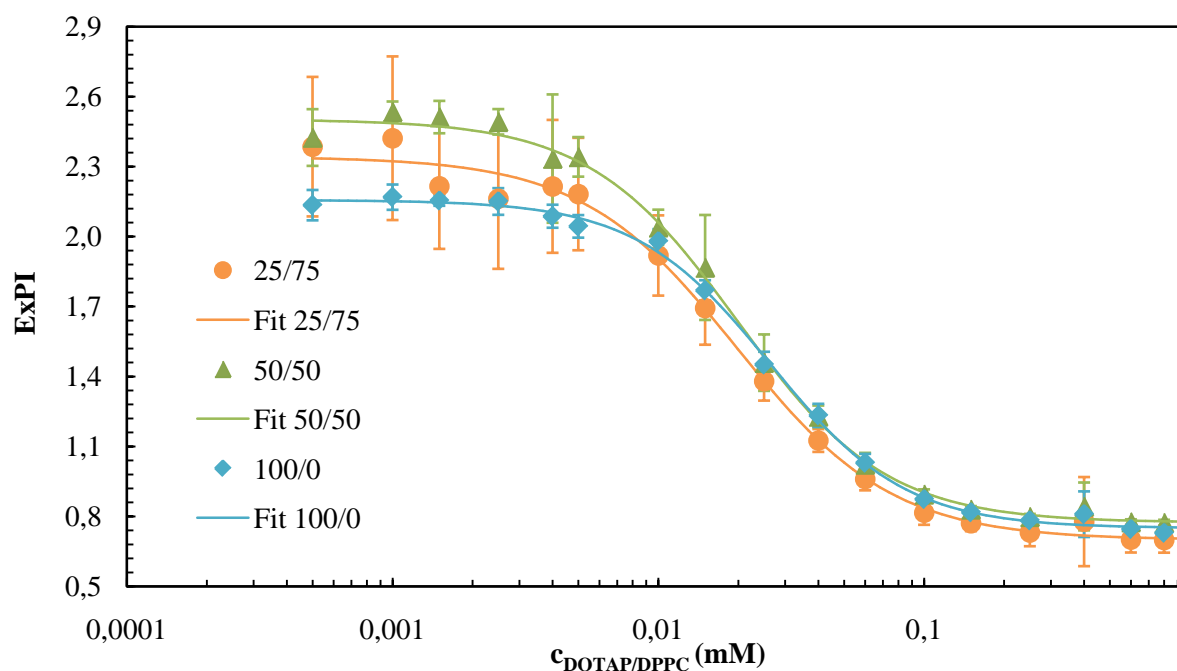
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Studium agregace DOTAP a jeho směsí s DPPC

V této části byl zkoumán vliv poměru směsi lipidů na agregační chování namícháním 3 řad roztoků vzorků se vzrůstající koncentrací lipidů ve vodě. Byly studovány směsi DOTAP/DPPC v poměru 100/0, 50/50, 25/75. U směsí byly vypočítány emisní i excitační polaritní indexy a byly sestaveny jejich závislost na koncentraci směsi lipidů. Dále byly také vypočítány poměry Ex:Mo.



Obrázek 22: Znárodnění závislosti $EmPI$ na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při různých poměrech lipidů ve směsi



Obrázek 23: Znárodnění závislosti $ExPI$ na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při různých poměrech lipidů ve směsi

Na *Obrázku 22* jsou vyobrazeny závislosti EmPI na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při různých poměrech lipidů ve směsi. Byly zaznamenány kompletní sigmoidní závislosti, proto byla data proložena Boltzmannovou křivkou a hodnoty CAC byly získány jako koncentrace DOTAP nebo směsi lipidů v inflexním bodu.

Závislost ExPI pyrenu na koncentraci lipidů znázorněna na *Obrázku 23* byla také proložena Boltzmannovou křivkou, pomocí které byly vypočítány hodnoty CAC, které jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Hodnoty CAC pro směsi DOTAP a DPPC v různých poměrech lipidů ve směsi

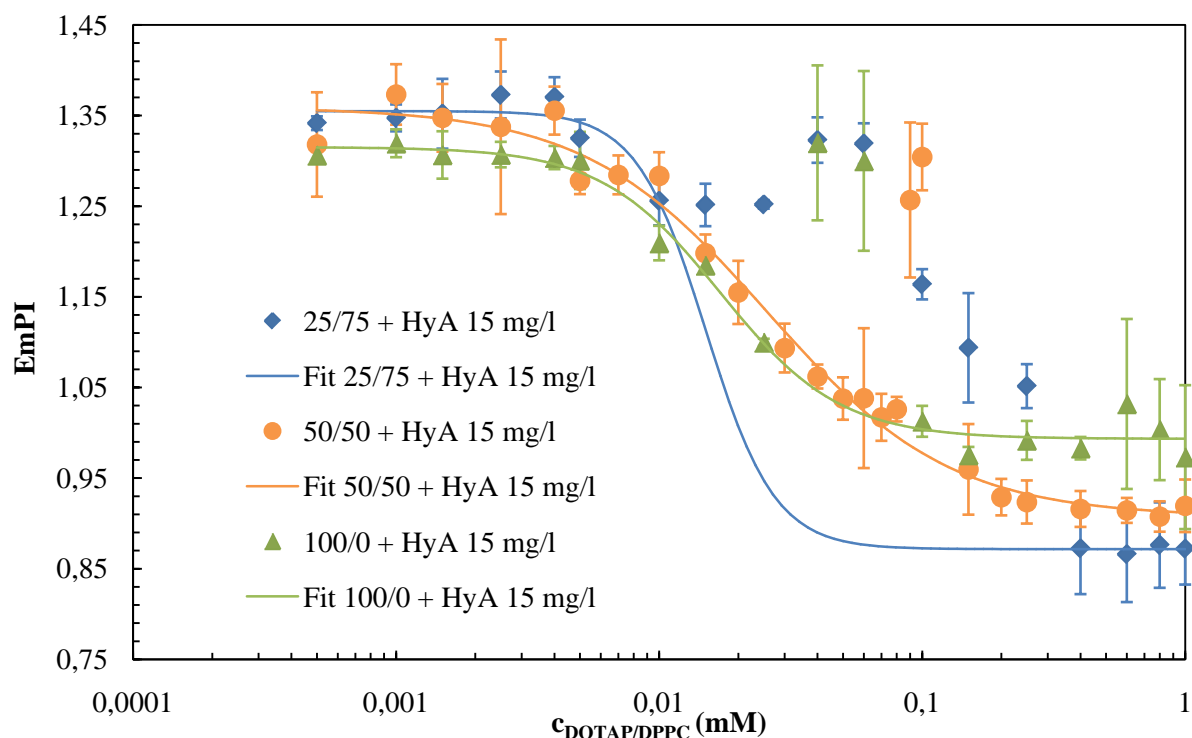
DOTAP/DPPC	CAC [μM]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	30,89	18,85
	2. řada	39,29	11,72
	3. řada	42,69	24,78
	průměr	32,01	27,06
	odchylka	1,06	3,03
50/50	1. řada	20,33	15,78
	2. řada	31,31	22,60
	3. řada	26,65	21,16
	průměr	26,10	19,85
	odchylka	5,51	3,59
100/0	1. řada	25,65	23,29
	2. řada	22,78	22,78
	3. řada	24,87	21,99
	průměr	24,43	22,69
	odchylka	1,48	0,66

5.2 Agregace DOTAP a jeho směsí s DPPC v přítomnosti hyaluronanu

Pro studium agregace lipidů v přítomnosti hyaluronanu byly připraveny směsi DOTAP/DPPC v poměrech 100/0, 50/50 a 25/75. K čistému DOTAP a ke směsi DOTAP/DPPC byl přidán hyaluronan ve 3 různých koncentracích (5, 15 a 30 mg/l). K ekvimolární směsi lipidů byl přidán hyaluronan pouze v koncentraci 15 mg/l.

5.2.1 Směsi lipidů v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 15 mg/l

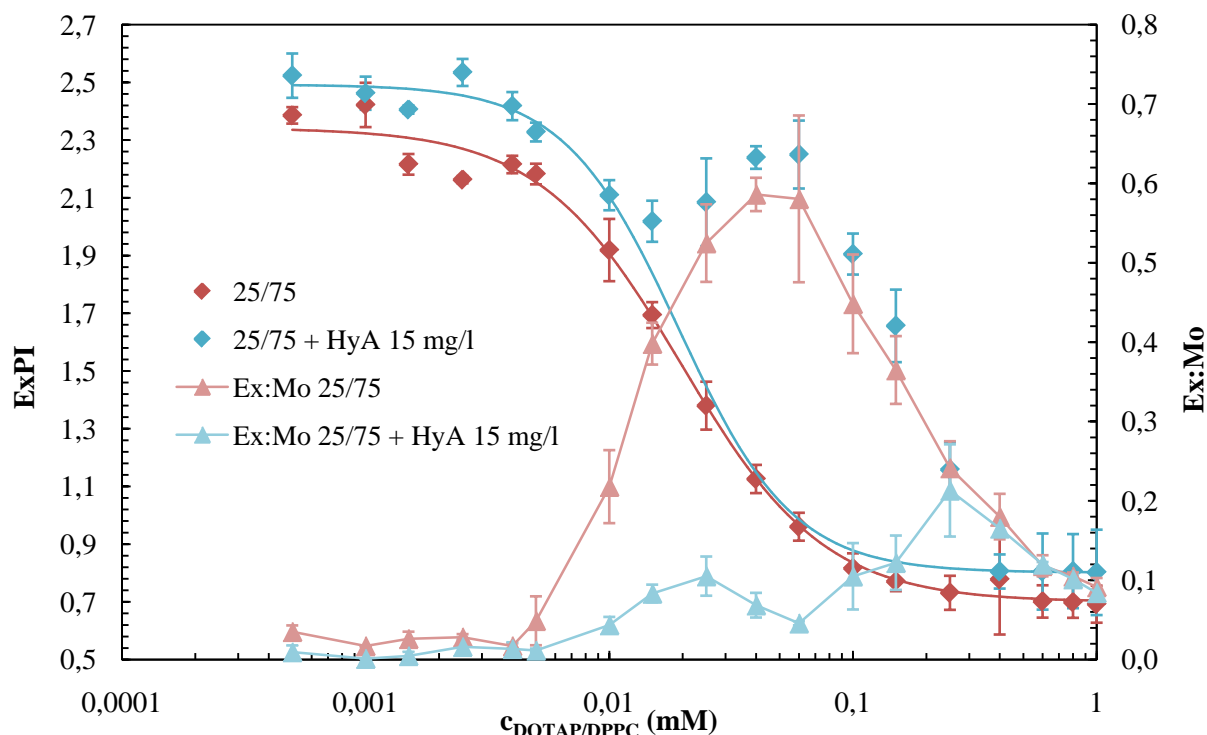
Na *Obrázku 24* je vyobrazena závislost EmPI pyrenu na koncentraci lipidů ve směsi po přidání HyA o koncentraci 15 mg/l. Bylo zjištěno, že přídavek HyA o této koncentraci ovlivňuje hodnotu CAC, což potvrzuje interakci systému s HyA. Dále po přidání HyA docházelo, zejména u vyšších koncentrací, ke tvorbě sraženin, což pravděpodobně způsobilo i větší odchylky, které jsou vyznačené v grafu pomocí chybových úseček. Hodnoty CAC pro jednotlivé směsi jsou uvedeny v *Tabulce 2*.



Obrázek 24: Znárodnění závislosti $EmPI$ pyrenu na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při poměru lipidů ve směsi 25/75 a s přísávkem 15 mg/l hyaluronanu

Tabulka 2: Hodnoty CAC pro směsi DOTAP a DPPC při různých poměrech lipidů ve směsi, v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 15 mg/l

DOTAP/DPPC	CAC [μM]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	19,59	18,54
	2. řada	25,13	17,13
	3. řada	22,38	14,96
	průměr	22,37	16,88
	odchylka	2,26	1,80
50/50	1. řada	26,73	18,55
	2. řada	27,08	19,73
	3. řada	23,86	21,69
	průměr	25,89	19,99
	odchylka	1,77	1,58
100/0	1. řada	18,30	17,05
	2. řada	17,28	14,86
	3. řada	17,91	15,42
	průměr	17,83	15,77
	odchylka	0,52	1,14

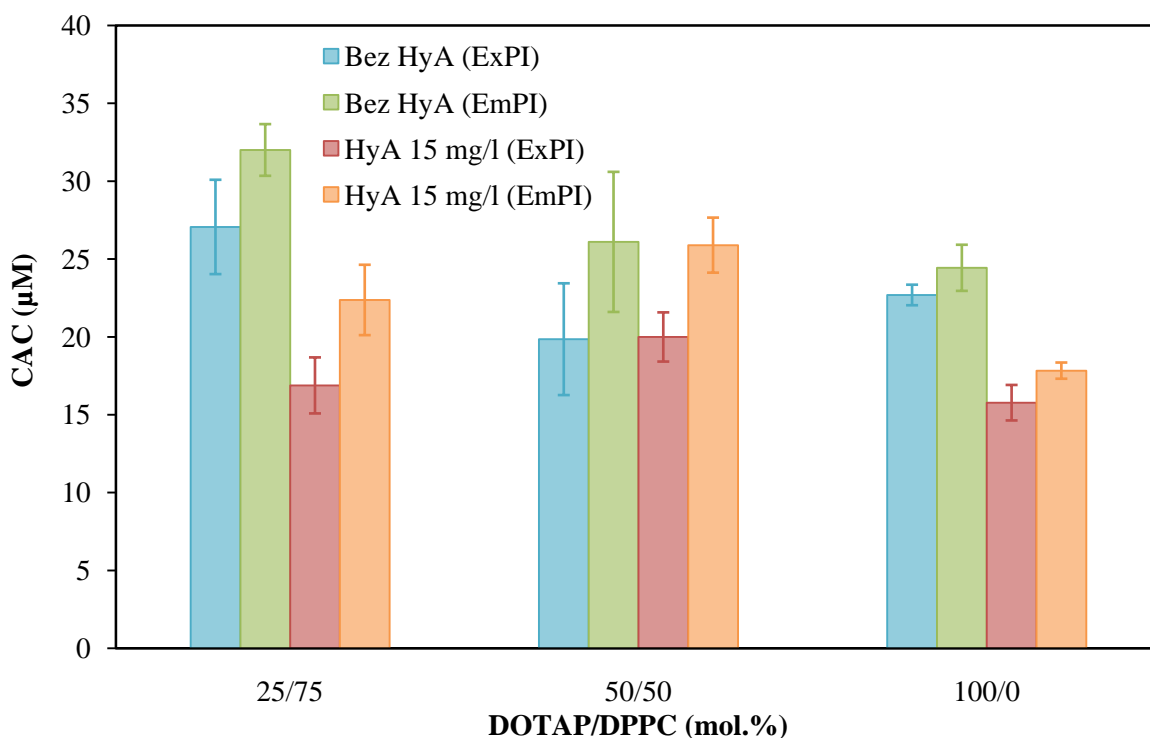


Obrázek 25: Závislost ExPI a poměru Ex:Mo pyrenu na koncentraci směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75

Na Obrázku 25 je znázorněna závislost ExPI a poměru Ex:Mo na koncentraci směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75. Před přidáním HyA systém nevykazuje žádné výrazné změny, pozorujeme jednoduchou sigmoidní závislost, pouze jsou v oblasti nižších koncentrací směsi lipidů patrné vyšší odchylky. Po přidání HyA dochází k nárůstu ExPI pyrenu a poklesu poměru Ex:Mo v oblasti koncentrací 0,025–0,6 mM lipidů, přičemž byla pozorována slabá tvorba sraženin na stěnách vialek, což může naznačovat dostatečnou koncentraci DOTAP pro vytvoření většího množství kladných nábojů, které by mohly interagovat s řetězcem HyA. Dále mohou tyto změny naznačovat vznik více druhů agregátů, kdy po vytvoření agregátu DOTAP/DPPC by mohlo docházet ještě k interakcím mezi jednotlivými molekulami DPPC, které jsou ve směsi v nadbytku a s hyaluronanem interagují neochotně. Neochota interakce DPPC s HyA je pravděpodobně způsobena rozložením nábojů na povrchu liposomu, kde se střídají kladně nabitě skupiny obsahující kvarterní amoniový dusík s disociovanými fosfátovými skupinami, jež nesou záporný náboj.

Tabulka 3: Poměr koncentrace lipidů DOTAP a HyA, při kterých bylo dosaženo nejvyšší hodnoty ExPI/EmPI při jejich opětovném nárůstu

poměr lipidů DOTAP/DPPC	C_{HyA} (mg/l)	$C_{\text{DOTAP+DPPC}}$ (mM)	c_{DOTAP} (mM)	c_{DOTAP} (mg/l)	poměr DOTAP/HyA
50/50		0,09	0,045	31,4	2,1:1
25/75	15	0,06	0,015	10,5	0,7:1
100/0		0,04	0,040	27,9	1,9:1



Obrázek 26: Porovnání hodnot CAC pro jednotlivé směsi bez i s přidavkem HyA

Z Obrázku 24 je zřejmé, že při ekvimolárním poměru lipidů je opětovný nárůst EmPI pyrenu viditelný při vyšších koncentracích, než je tomu u čistého DOTAP a jeho směsi s DPPC v poměru 25/75. Ovšem jak zobrazuje Obrázek 26, hodnota CAC pro ekvimolární směs zůstala po přidání HyA stejná, přestože byla vizuálně potvrzena slabší interakce směsi lipidu s HyA (Obrázek 27), jelikož docházelo k fázové separaci, které byla vidět ve formě sraženin na stěnách vialky. Vznik sraženin byl doprovázen i opětovným nárůstem EmPI pyrenu ve směsi a poklesem hodnot Ex:Mo.

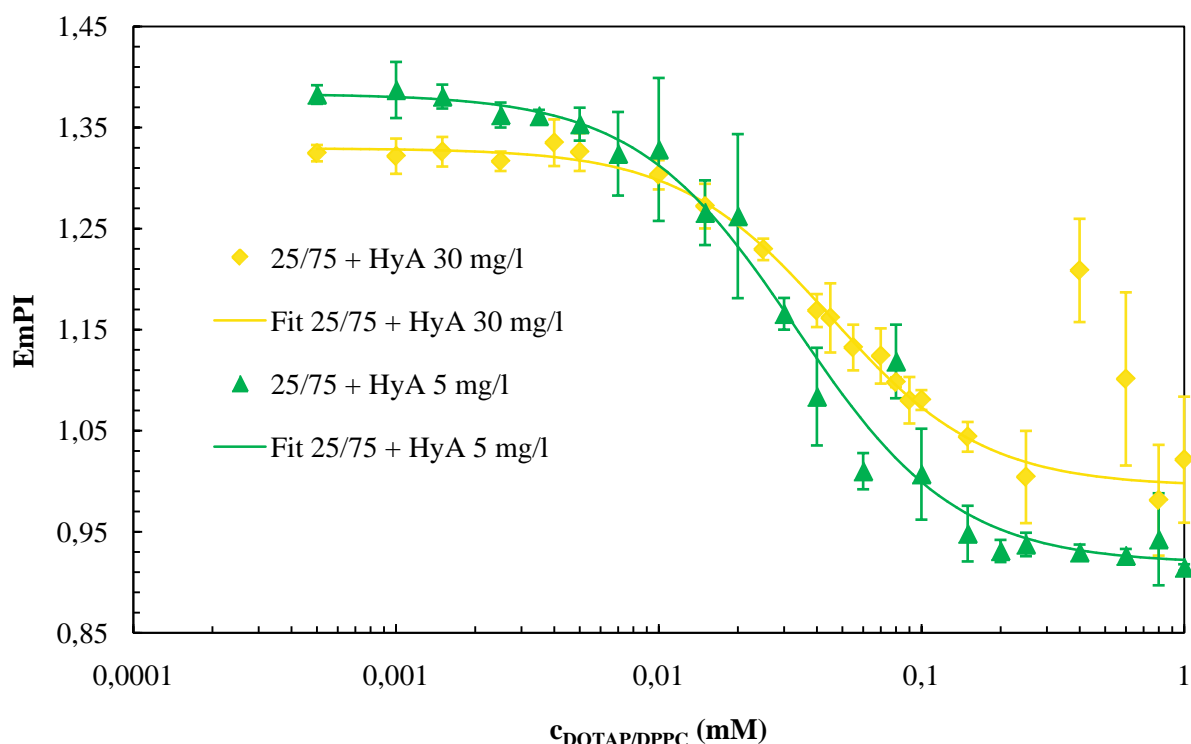
U směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 způsobil přidavek HyA pokles CAC, pravděpodobně díky dostatečné koncentraci lipidů DOTAP ve směsi. Také u této směsi nastává opětovný nárůst hodnot ExPI/EmPI u nejnižšího poměru lipidů DOTAP/HyA (viz. Tabulka 3). U této směsi mohlo docházet ke vzniku více druhů agregátů, jelikož DPPC s hyaluronanem interaguje neochotně. U lipidů DOTAP dochází po přidání HyA k poklesu hodnot CAC.



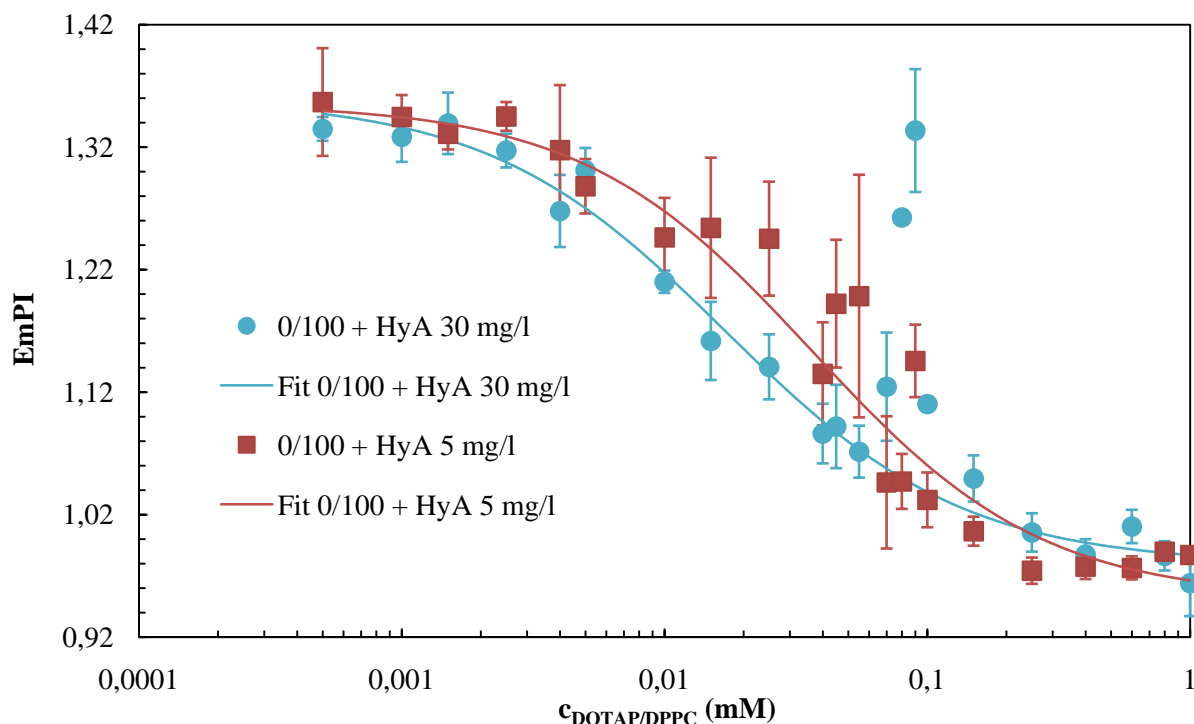
Obrázek 27: Vzorčky se směsí lipidů DOTAP/DPPC v poměru 50/50 po přidání HyA

5.2.2 Směsi lipidů v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 5 mg/l a 30 mg/l

Na *Obrázku 28* a *Obrázku 29* je vyobrazena závislost $EmPI$ pyrenu na koncentraci směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 a lipidů DOTAP po přidání HyA o koncentraci 5 mg/l a 30 mg/l. Z měření vyplývá, že přídavek HyA o těchto koncentracích ovlivňuje hodnotu CAC jen v malé míře. Dále po přidání HyA docházelo, zejména u vyšších koncentrací lipidů a HyA, k tvorbě sraženin, což pravděpodobně způsobilo chybové úsečky, které jsou vyznačené v grafu. Se zvýšením koncentrace HyA také pozorujeme posun opětovného zvýšení $EmPI$ k vyšším koncentracím směsi lipidů. Stejně jako v případě směsi s přídavkem HyA o koncentraci 15 mg/l, i zde byly vyhodnoceny poměry DOTAP a HyA, při kterých bylo pozorováno maximum $EmPI$ v oblasti vyšších koncentrací lipidů (*Tabulka 5*). Tento poměr dosahoval v tomto případě hodnoty 2,8 (při koncentraci HyA 5 mg/l) a 2,3 (HyA o koncentraci 30 mg/l). Zároveň tedy vidíme, že se hodnoty tohoto poměru podobají (s výjimkou směsi DOTAP/DPPC 25/75 s HyA o koncentraci 15 mg/l).



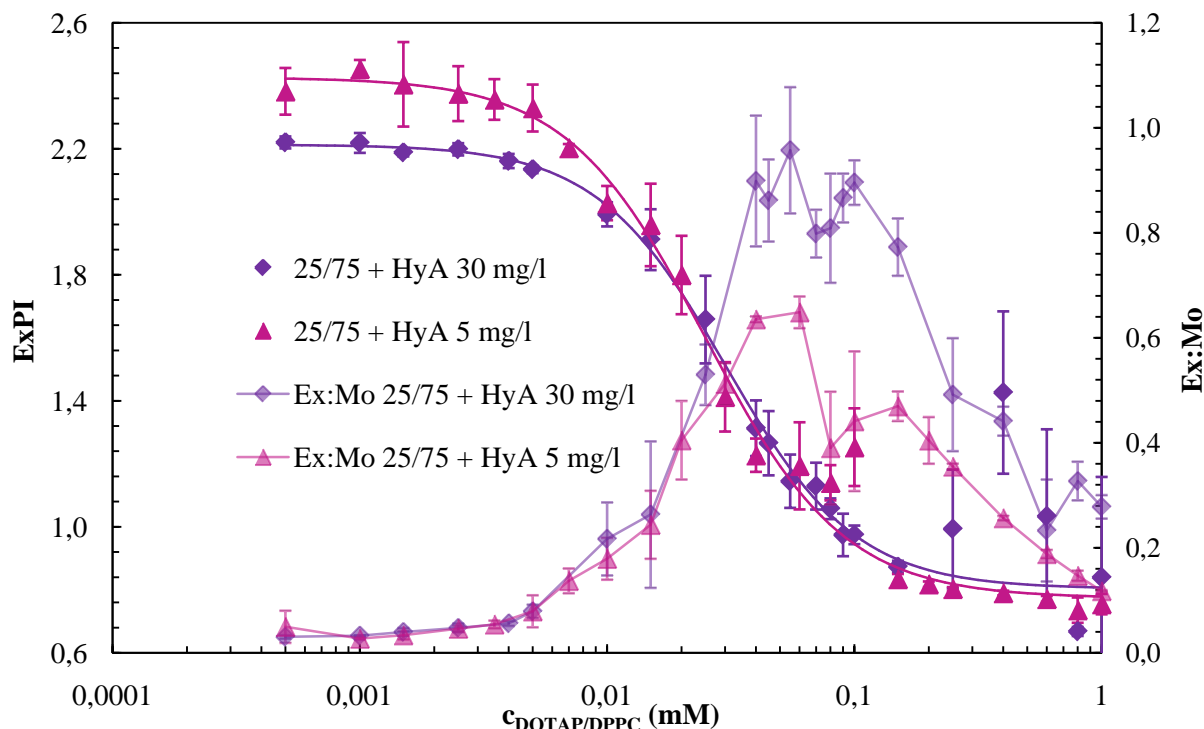
Obrázek 28: Znárodnění závislosti $EmPI$ pyrenu na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při poměru lipidů ve směsi 25/75 a s přídavkem hyaluronanu o různých koncentracích



Obrázek 29: Znárodnění závislosti $EmPI$ pyrenu na koncentraci lipidu DOTAP s přidavkem hyaluronanu o různých koncentracích

Tabulka 4: Jednotlivé hodnoty CAC pro DOTAP a směs lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 v přítomnosti hyaluronanu o různých koncentracích

poměr	c_{HyA} [mg/l]	CAC [μ M]	závislost		c_{HyA} [mg/l]	CAC [μ M]	závislost	
			EmPI	ExPI			EmPI	ExPI
25/75	30	1. řada	47,08	29,68	5	1. řada	35,41	23,03
		2. řada	48,28	31,75		2. řada	35,65	28,16
		3. řada	41,29	30,00		3. řada	29,30	22,87
		průměr	45,55	30,47		průměr	33,46	24,69
		odchylka	3,732	1,11		odchylka	3,59	3,00
100/0	30	1. řada	17,80	11,57	5	1. řada	22,67	20,86
		2. řada	18,80	9,57		2. řada	21,18	20,85
		3. řada	14,64	11,98		3. řada	22,67	21,76
		průměr	17,08	11,04		průměr	22,17	21,15
		odchylka	2,17	1,28		odchylka	0,86	0,52



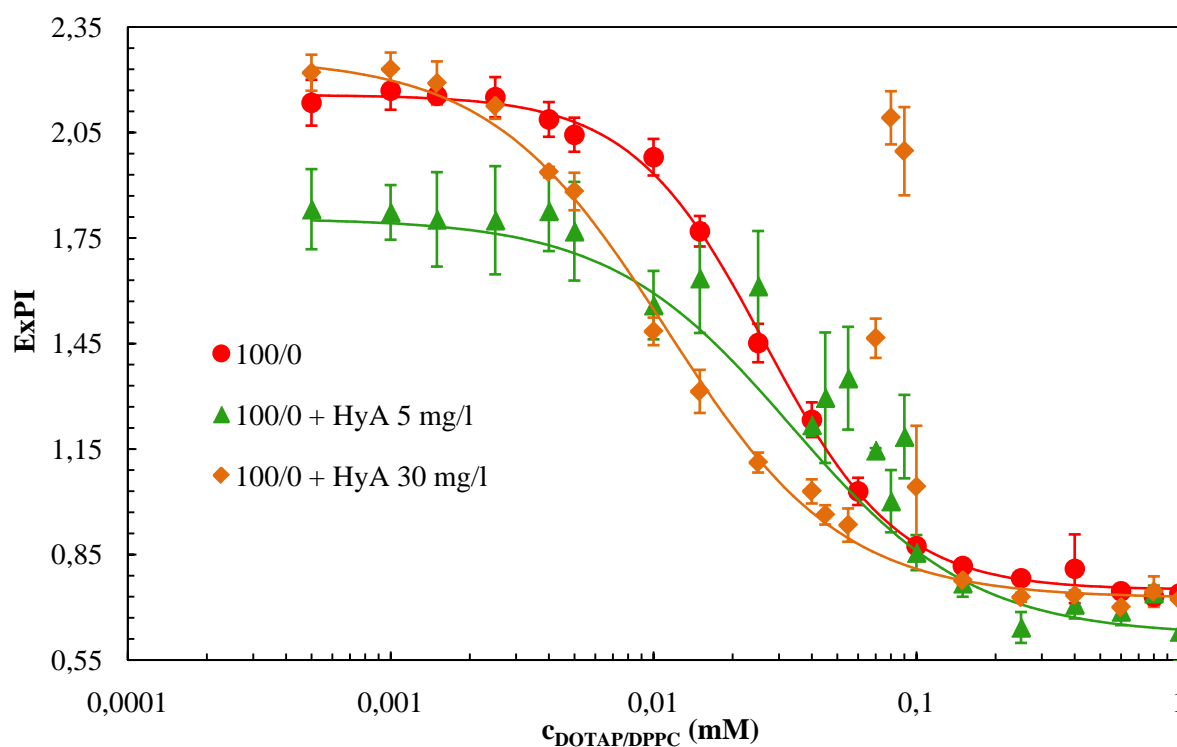
Obrázek 30: Zobrazení ExPI pyrenu a poměru Ex:Mo v závislosti na koncentraci směsi DOTAP a DPPC při poměru lipidů ve směsi 25/75 a v přítomnosti HyA o koncentraci 5 a 30 mg/l

Z Obrázku 30 vyplývá, že k největším změnám dochází při vysokých koncentracích lipidů s přidavkem HyA o koncentraci 30 mg/l, kde je také vidět opětovný nárůst a pokles hodnot ExPI pyrenu. Pokles hodnot ExPI je doprovázen změnami v hodnotách Ex:Mo a poměrně velkými chybovými úsečkami, které jsou pravděpodobně způsobeny vznikem sraženin v roztoku. Při těchto koncentracích také došlo k výrazné fázové separaci, která je vyfocena na Obrázku 31. Zajímavé je, že roztoky, u kterých došlo k nárůstu ExPI pyrenu sice obsahují sraženiny, ale jsou čiré. Zatímco dva poslední roztoky z koncentrační řady kromě vzniku sraženiny vykazují také mírné zakalení. Tento jev může být vysvětlen tím, že v oblasti nárůstu ExPI se interakce s HyA a tvorby sraženiny účastní všechny liposomy, zatímco u posledních dvou roztoků se nachází i neinteragující liposomy.

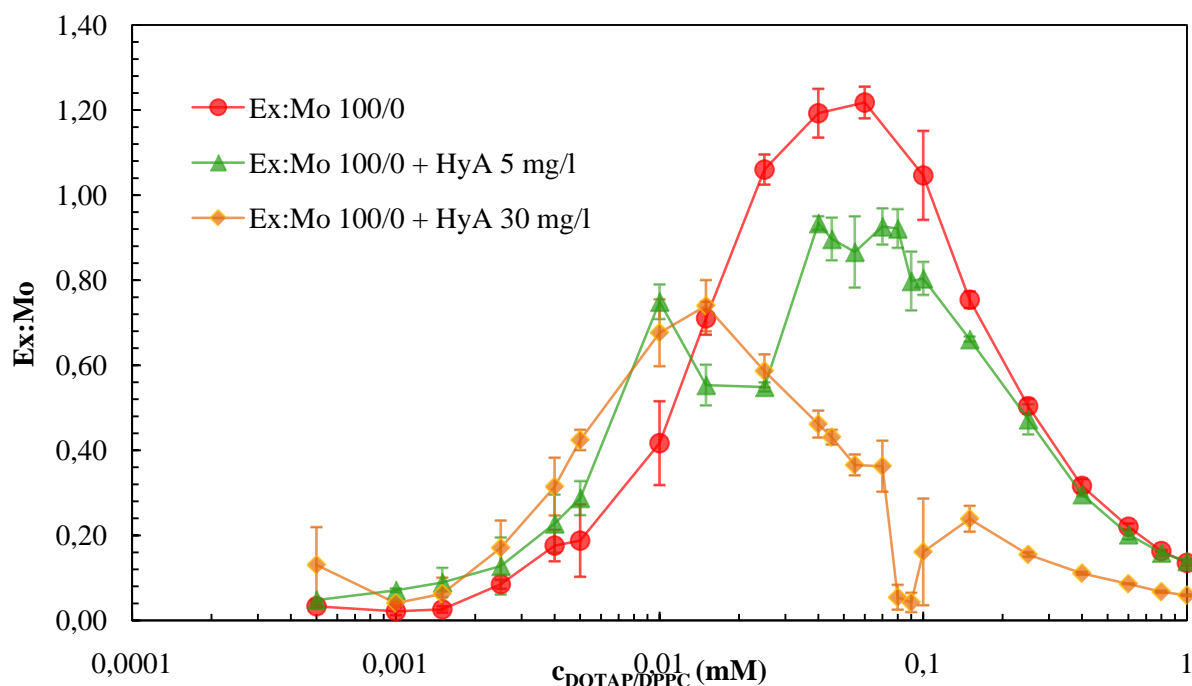
Při koncentraci 5 mg/l HyA v roztoku také došlo k nárůstu ExPI pyrenu a poklesu hodnot Ex:Mo, ovšem u koncentrace směsi lipidů o něco nižší, než tomu bylo v předchozím případě. Také nebyla zaznamenána tak výrazná tvorba sraženin, byla pouze vytvořena slabší sraženina ve tvaru obroučky po obvodu vialky a také byla pozorována opalescence roztoků.



Obrázek 31: Směs lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 s přídavkem hyaluronanu 30 mg/l



Obrázek 32: Zobrazení ExPI pyrenu v závislosti na koncentraci lipidů DOTAP i v přítomnosti HyA o koncentraci 5 a 30 mg/l



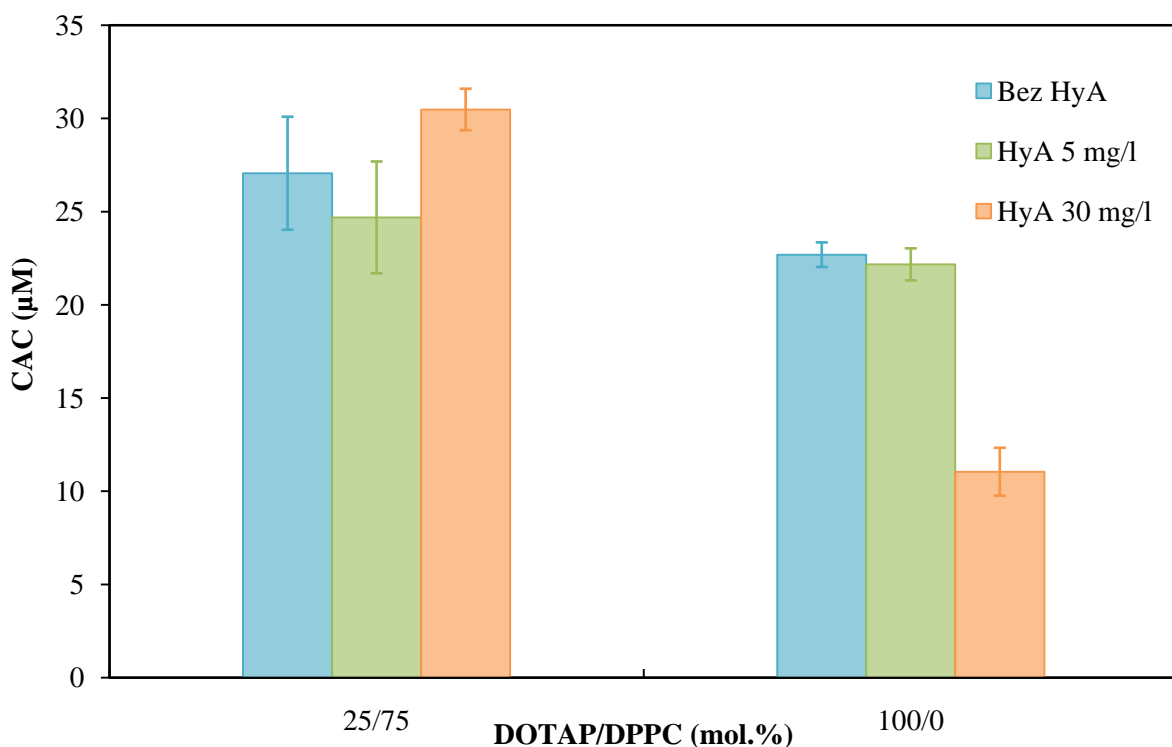
Obrázek 33: Zobrazení poměru Ex:Mo pyrenu v závislosti na koncentraci lipidů DOTAP a směsi lipidů s HyA o koncentraci 5 a 30 mg/l

Obrázek 32 vykresluje závislost ExPI pyrenu na koncentraci lipidů DOTAP pro čistý DOTAP a jeho směsi s HyA o koncentracích 5 mg/l a 30 mg/l. Z grafu je zjevný nárůst ExPI pyrenu doprovázený poklesem hodnot Ex:Mo (viz. Obrázek 33) v oblasti koncentrací DOTAP 0,07–0,1 mM při koncentraci HyA 30 mg/l. Tento jev byl doprovázen tvorbou sraženin v roztoku (viz. Obrázek 35), které byly viditelné hlavně při rozvření roztoku a naznačují, že v dané oblasti koncentrace DOTAP dochází k interakci s hyaluronanem vedoucí k fázové separaci.

Při koncentraci HyA 5 mg/l dochází k poklesu hodnot ExPI a poměru Ex:Mo v porovnání se samotným roztokem DOTAP. V koncentrační řadě je první pokles hodnoty ExPI patrný už při koncentraci 0,01 mM DOTAP, který je potvrzen nárůstem Ex:Mo. Tento nárůst poměru Ex:Mo potvrzuje vznik hydrofobních domén. Tento pokles byl následován nárůstem hodnot ExPI a poklesem hodnot Ex:Mo, což značí, že je lipid spotřebováván na tvorbu sraženin. Přestože výsledky naznačují, že v roztocích k tvorbě sraženiny dochází, ve vialkách sraženina nebyla pozorována. Lze tedy předpokládat, že nevznikly dostatečně provázané struktury liposomů a HyA, aby došlo k tvorbě fázově separovaného systému. Dalším důvodem výkyvů hodnot EmPI i ExPI u vyšších koncentracích lipidů by mohla být nestabilita systému.

Tabulka 5: Poměr koncentrace lipidů DOTAP a HyA, při kterých bylo dosaženo nejvyšší hodnoty ExPI/EmPI při jejich opětovném nárůstu

poměr lipidů	c_{HyA} (mg/l)	c (mM)	c_{DOTAP} (mM)	c_{DOTAP} (mg/l)	poměr DOTAP/HyA
25/75	5	0,080	0,020	14,0	2,8:1
	30	0,400	0,100	69,9	2,3:1
100/0	5	0,015	0,015	10,4	2,1:1
	30	0,090	0,090	62,9	2,1:1



Obrázek 34: Porovnání hodnot CAC pro jednotlivé směsi lipidů DOTAP a DPPC i s přidavkem HyA

Na Obrázku 34 jsou vidět změny hodnot CAC získaných pomocí ExPI po přidání jednotlivých koncentrací HyA buď k samotnému DOTAP nebo směsi lipidů DOTAP a DPPC v poměru 25/75. Poměry koncentrací lipidů DOTAP a HyA, u kterých docházelo k nejvyššímu opětovnému nárůstu hodnot ExPI/EmPI, jsou vypsány v Tabulce 5. Hodnoty CAC získané z měření EmPI vykazují stejný trend, jako hodnoty uvedené na Obrázku 34. U samotného lipidů DOTAP nedošlo při koncentraci HyA 5 mg/l téměř k žádným změnám v hodnotě CAC, což se vzhledem k nízké koncentraci HyA dalo očekávat. U směsi lipidů DOTAP/DPPC i u směsi v přítomnosti HyA o koncentraci 5 mg/l je vidět poměrně velká odchylka. Z toho důvodu nelze přesně určit míru ovlivnění CAC směsi lipidů hyaluronanem o této koncentraci. Hodnota CAC se nejvíce změnila při koncentraci HyA 30 mg/l. U směsi lipidů lze pozorovat její mírný nárůst. Směs lipidů DOTAP a hyaluronanu vykazuje úplně odlišné chování, jelikož byl zaznamenán poměrně velký pokles hodnoty CAC.



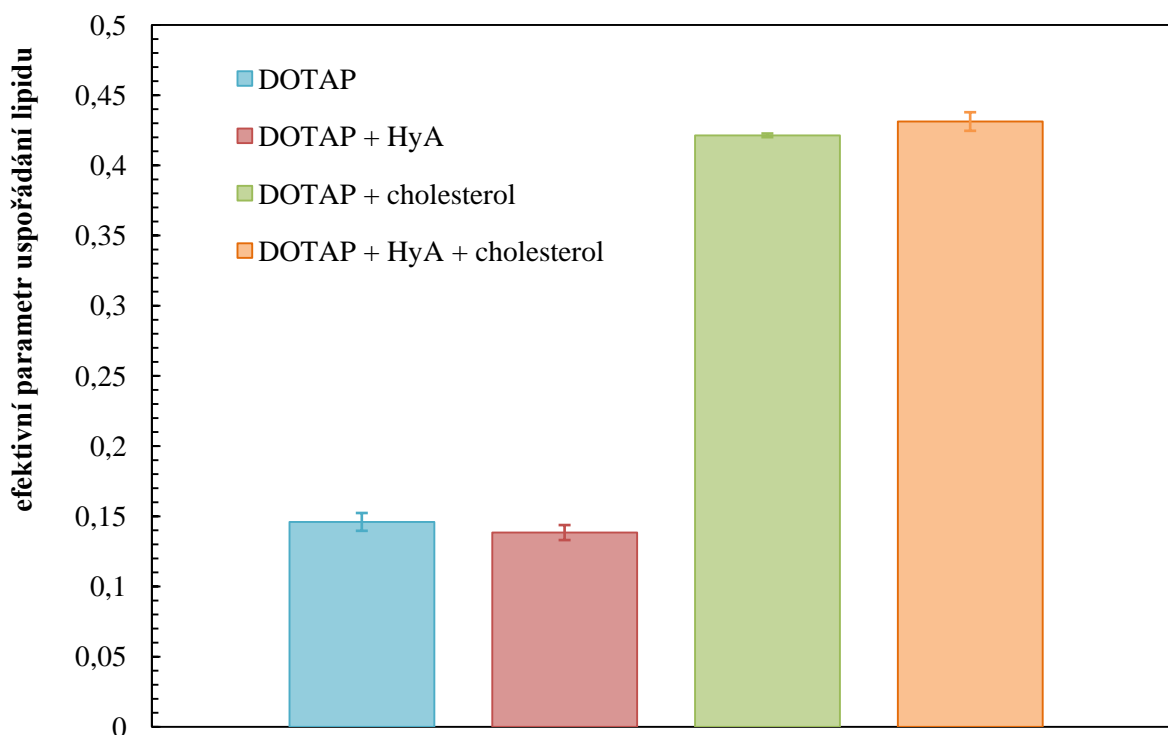
Obrázek 35: Vzorok roztoků lipidů DOTAP s koncentrací hyaluronanu 30 mg/l

5.3 Parametr uspořádání lipidu a velikost částic

Změny uspořádání lipidové membrány jsou vyjádřeny parametrem uspořádání lipidu (S) a efektivním parametrem uspořádání lipidu (S_{eff}), které byly určeny pomocí anizotropie fluorescence DPH. Měření anizotropie DPH bylo prováděno vždy na 3 vzorcích lipidu DOTAP nebo směsi lipidů DOTAP/DPPC o koncentraci 1 mM. Byly proměřeny směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75, 50/50 a 100/0, ke kterým byl poté přidán cholesterol (30 mol.%) a hyaluronan o koncentraci 15 mg/l.

Předpokladem bylo, že přidavek cholesterolu ke směsím obsahujícím lipid DOTAP ve větším molárním poměru bude způsobovat nárůst anizotropie fluorescence DPH a tím i parametru uspořádání. Naopak u směsi obsahujících spíše lipid DPPC by měl přidavek cholesterolu způsobit pokles uspořádanosti. Hyaluronan by neměl mít na uspořádání lipidů ve směsi značný vliv.

5.3.1 Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání DOTAP přidavkem cholesterolu a hyaluronanu



Obrázek 36: Změna efektivního parametru uspořádání lipidů DOTAP o koncentraci 1 mM po přidání cholesterolu a hyaluronanu

Na Obrázku 36 je zobrazena závislost efektivního parametru uspořádání lipidů DOTAP o koncentraci 1 mM s přidavky cholesterolu a HyA. U samotného lipidů byly naměřeny nízké hodnoty anizotropie DPH, což znamená, že sonda v lipidové dvojvrstvě téměř neomezeně rotuje. Důvodem může být přítomnost dvojné vazby v řetězci mastných kyselin DOTAP. Dvojná vazba může způsobit „zahnutí“ uhlovodíkového řetězce, takže nevzniká tolik intramolekulárních vazeb mezi jednotlivými řetězci jako v případě liposomů tvořených z řetězců nasycených mastných kyselin. Také by mohlo v hydrofobních oblastech docházet ke vzniku kavit (dutin). Tím dojde ke snížení organizovanosti struktury a zvýší se fluidita

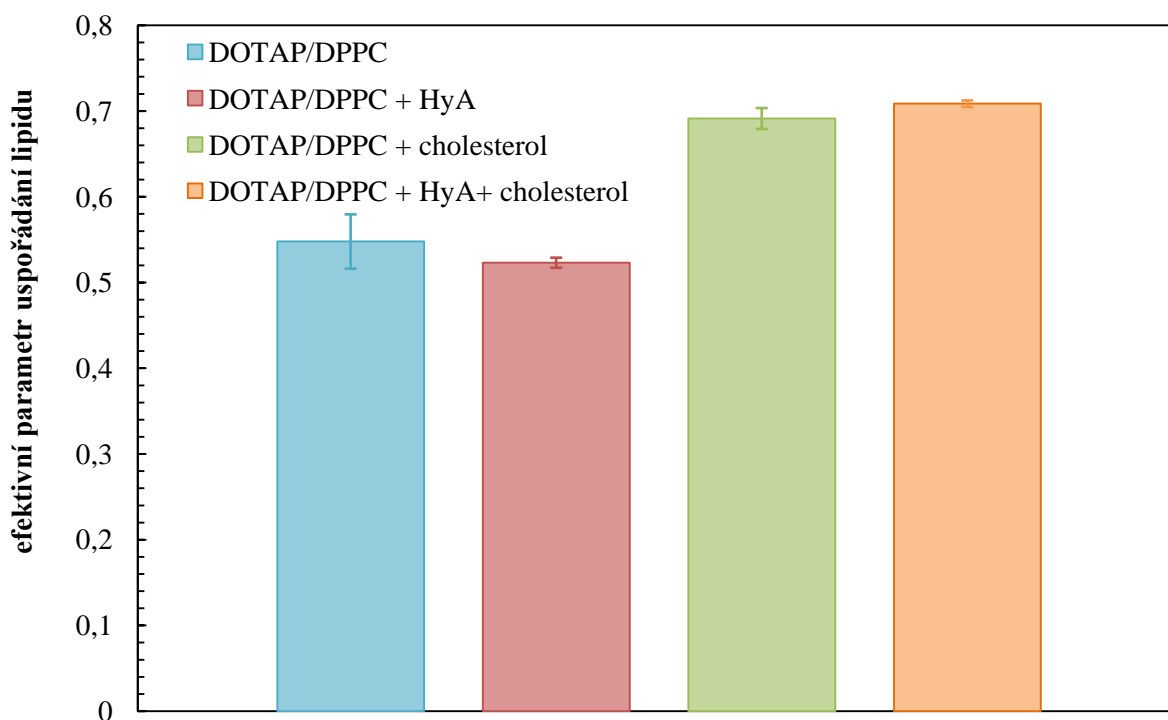
liposomů. Dalším důvodem můžou být odpuzivé interakce mezi kladně nabitými polárními hlavami lipidů, které zvyšují mezery mezi jednotlivými lipidy tvořící liposom. Přídavek cholesterolu způsobí celkový nárůst parametru uspořádání, jelikož cholesterol zaplní mezery vzniklé zahnutím řetězce obsahujícího dvojnou vazbu, čímž se struktura stane pevnější a uspořádanější. Po přidání HyA k lipidu dochází k minimálním změnám uspořádání.

Tabulka 6: Ovlivnění velikosti částic lipidu DOTAP o koncentraci 1 mM přídavkem cholesterolu a hyaluronanu

Měření č.	DOTAP				DOTAP + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	117,2	100,0	–	–	153,8	99,1	4365,0	0,9
2	117,3	100,0	–	–	155,2	98,8	4523,4	1,2
3	118,0	100,0	–	–	153,7	97,5	4425,8	2,5
průměr	117,5	100,0	–	–	154,2	98,5	4438,1	1,5
odchylka	0,4	0,0	–	–	0,8	0,9	79,9	0,9
Měření č.	DOTAP + cholesterol				DOTAP + cholesterol + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	197,4	100,0	–	–	725,9	65,8	108,2	34,2
2	197,7	100,0	–	–	746,0	79,3	167,2	20,7
3	198,5	100,0	–	–	714,4	81,5	145,8	18,5
průměr	197,9	100,0	–	–	728,8	75,5	140,4	24,5
odchylka	0,6	0,0	–	–	16,0	8,5	29,9	8,5

V Tabulce 6 jsou vypsané velikosti částic jednotlivých systémů obsahujících lipid DOTAP. Z výsledků vyplývá, že velikost částic je závislá na přítomnosti polyelektrolytu nebo cholesterolu ve směsi. Po přidání polyelektrolytu byl zaznamenán nárůst velikosti částic, který může být způsobem interakcí hyaluronanu s částicemi DOTAP, nebo jako větší útvary mohly být detekovány řetězce hyaluronanu. Přídavek cholesterolu také způsobil svým začleněním do částic DOTAP nárůst velikosti vzniklých částic.

5.3.2 Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání směsi DOTAP/DPPC v poměru 50/50 přidávkem cholesterolu a hyaluronanu



Obrázek 37: Změna efektivního parametru uspořádání směsi lipidů DOTAP a DPPC v poměru 50/50 o koncentraci 1 mM po přidání cholesterolu a hyaluronanu

Obrázek 37 vykresluje změnu efektivního parametru uspořádání u směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 50/50 s cholesterolem a hyaluronanem. Po přidavku cholesterolu dochází u ekvimolární směsi lipidů DOTAP/DPPC, podobně jako u lipidu DOTAP, k nárůstu parametru uspořádání. V agregátech se pravděpodobně díky náboji polárních hlav střídají molekuly DOTAP s molekulami DPPC, jejichž řetězce jsou tvořeny nasycenou mastnou kyselinou. To způsobí, že mezery vzniklé zahnutím řetězce DOTAP v důsledku dvojné vazby jsou menší. Také jsou díky střídavému uspořádání kationického lipidu DOTAP a amfoterního DPPC odstíněny repulze mezi kladně nabitými hlavami DOTAP, což zvýší míru uspořádání samotné směsi lipidů. Přídavek cholesterolu touto uspořádanost ještě navýší, jelikož vyplní mezery, vzniklé zahnutým řetězcem a tím sníží fluiditu membrány. Po přidavku hyaluronanu opět nebyly zaznamenány změny ve stupni uspořádání membrán. To mohlo být způsobené například sraženinami, které se utvořily na stěnách vialek a většina HyA by mohla být spotřebována na tvorbu sraženin. Porovnáním s hodnotami naměřenými pro čistý DOTAP zjistíme, že míra uspořádání v tomto směsném systému DOTAP/DPPC je výrazně vyšší, než v případě čistého DOTAP.

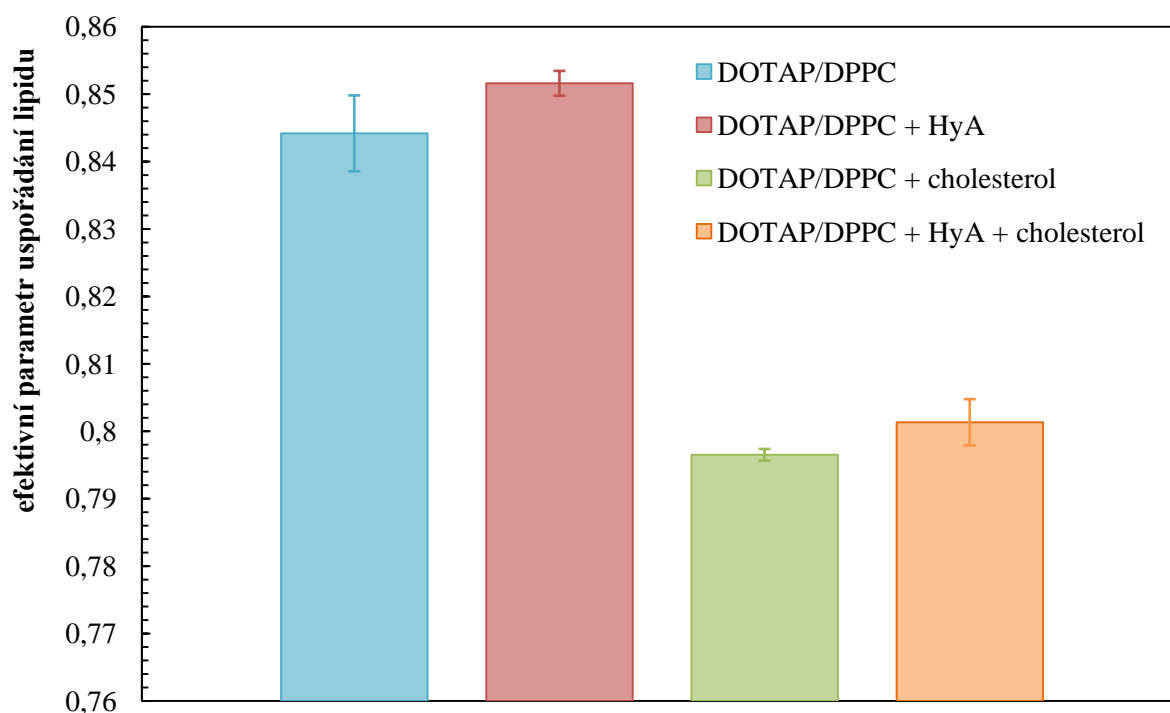
V Tabulce 7 jsou vypsány velikosti částic ve směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 50/50 a koncentraci 1 mM po přidání cholesterolu a hyaluronanu do směsi. Nejmenší velikost vykazuje směs tvořená pouze samotnou směsí lipidů DOTAP a DPPC. U této směsi byl naměřen pouze jeden pík, což naznačuje tvorbu jenom jednoho druhu agregátů. Po přidání cholesterolu a HyA je patrný nárůst velikosti částic. U směsi s cholesterolem může být tento nárůst způsoben jeho začleněním do vznikajícího agregátu. U směsi s hyaluronanem byly naměřeny dva píky o různých velikostech, přičemž druhý větší pík byl pouze v malém

zastoupení. Je možné, že veškeré množství HyA bylo spotřebováno na tvorbu sraženin, které vznikaly po obvodu vialky při vysoké koncentraci lipidů s přidavkem HyA.

Tabulka 7: Ovlivnění velikosti částic směsi lipidů DOTAP a DPPC v poměru 50/50 o koncentraci 1 mM přidavkem cholesterolu a hyaluronanu

Měření č.	DOTAP/DPPC				DOTAP/DPPC + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	131,9	100,0	–	–	303,0	95,4	1880,0	4,6
2	136,7	100,0	–	–	291,6	95,6	2390,0	4,4
3	137,2	100,0	–	–	285,1	93,4	2045,0	6,6
průměr	135,3	100,00	–	–	293,2	94,8	2105,0	5,2
odchylka	2,9	0	–	–	9,1	1,2	260,2	1,2
Měření č.	DOTAP/DPPC + cholesterol				DOTAP/DPPC + cholesterol + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	102,0	100,0	–	–	162,1	96,4	1419,0	3,6
2	100,8	100,0	–	–	162,3	98,3	1461,0	1,7
3	101,4	100,0	–	–	167,2	97,2	1456,0	2,8
průměr	101,4	100,0	–	–	163,9	97,3	1445,3	2,7
odchylka	0,6	0	–	–	2,9	1,0	22,9	1,0

5.3.3 Ovlivnění velikosti částic a parametru uspořádání směsi DOTAP/DPPC v poměru 25/75 přidavkem cholesterolu a hyaluronanu



Obrázek 38: Změna efektivního parametru uspořádání směsi lipidů DOTAP a DPPC v poměru 25/75 o koncentraci 1 mM po přidání cholesterolu a hyaluronanu

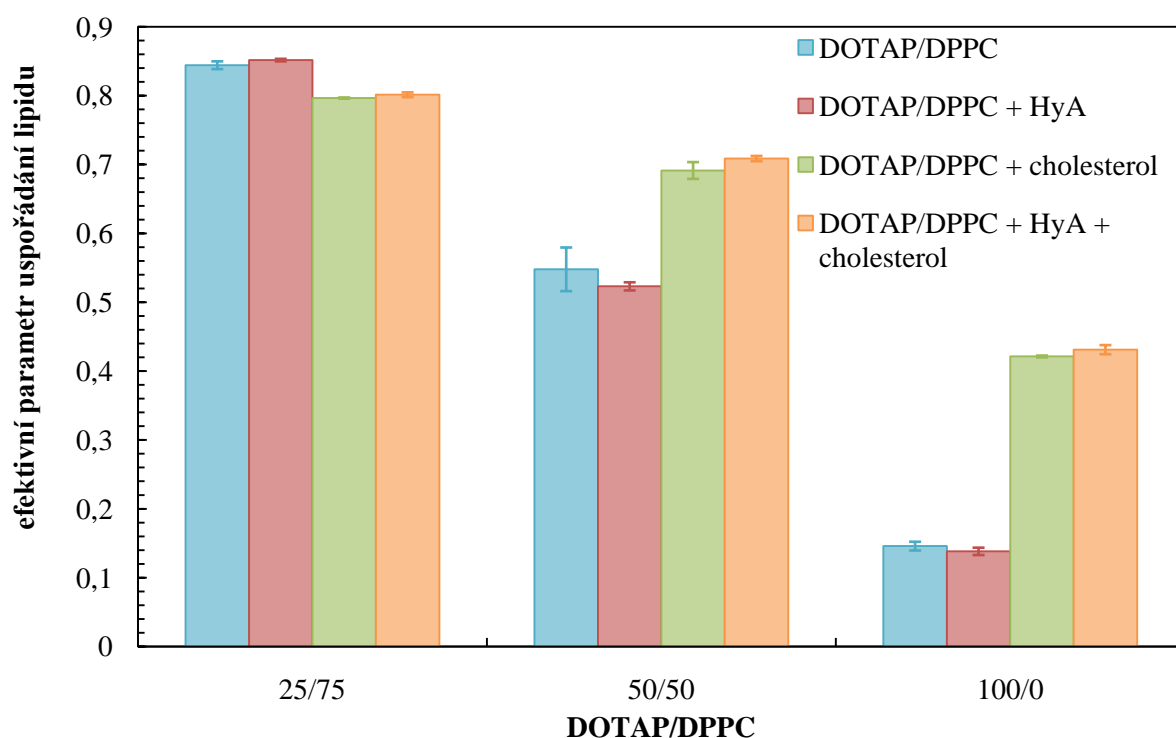
Obrázek 38 zobrazuje změnu efektivního parametru uspořádání směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 po přidání cholesterolu a HyA. Směs obsahuje převážně lipid DPPC obsahující nasycené řetězce mastných kyselin, proto je efektivní parametr uspořádání poměrně vysoký. Řetězce nasycených mastných kyselin jsou v liposomu uspořádané a vzniká mezi nimi více intramolekulárních vazeb. Přídavek cholesterolu k této směsi parametr uspořádání sníží, jelikož po navázání cholesterolu se zvýší vzdálenosti mezi řetězci a tím se sníží uspořádanost liposomu. Jelikož docházelo ke vzniku sraženin, které byly pravděpodobně tvořené hyaluronanem a směsí lipidů, tak nelze jeho ovlivnění parametru uspořádání lipidů přesně určit.

Tabulka 8: Ovlivnění velikosti částic směsi lipidů DOTAP a DPPC v poměru 25/75 o koncentraci 1 mM přídavkem cholesterolu a hyaluronanu

Měření č.	DOTAP/DPPC				DOTAP/DPPC + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	68,7	100,0	–	–	84,9	100,0	–	–
2	69,2	100,0	–	–	86,2	99,6	3670,0	0,4
3	69,0	100,0	–	–	85,5	98,9	3751,0	1,2
průměr	69,0	100,0	–	–	85,5	99,5	3710,5	0,8
odchylka	0,3	0,0	–	–	0,7	0,6	57,3	0,6
Měření č.	DOTAP/DPPC + cholesterol				DOTAP/DPPC + cholesterol + HyA			
	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%	1. pík [nm]	%	2. pík [nm]	%
1	74,8	97,9	–	–	98,5	94,6	4973,0	5,4
2	74,7	94,5	–	–	95,4	96,1	4756,0	3,9
3	74,5	96,0	–	–	97,6	98,8	4954,0	1,2
průměr	74,7	96,1	–	–	97,2	96,5	4894,3	3,5
odchylka	0,2	1,7	–	–	1,6	2,1	120,2	2,1

Tabulka 8 obsahuje velikosti částic směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 přídavkem cholesterolu a HyA. Byl zaznamenán stejný trend ve změnách velikosti částic, jak u ekvimolární směsi těchto lipidů. Ovlivnění hyaluronanem je díky vzniku sraženin v roztoku neprůkazné, jelikož většina HyA byla spotřebována na tvorbu sraženin a v roztoku jej zbylo málo. Cholesterol zvýšil velikosti částic svým začleněním více než u směsi v ekvimolárním poměru lipidů, což může být způsobeno tím, že svým začleněním způsobuje i vznik mezer v jinak uspořádaných nasycených řetězcích mastných kyselin.

5.3.4 Ovlivnění parametru uspořádání poměrem DOTAP/DPPC



Obrázek 39: Porovnání hodnot efektivního parametru uspořádání pro jednotlivé směsi lipidů DOTAP/DPPC o koncentraci 1 mM s přísadky cholesterolu a HyA

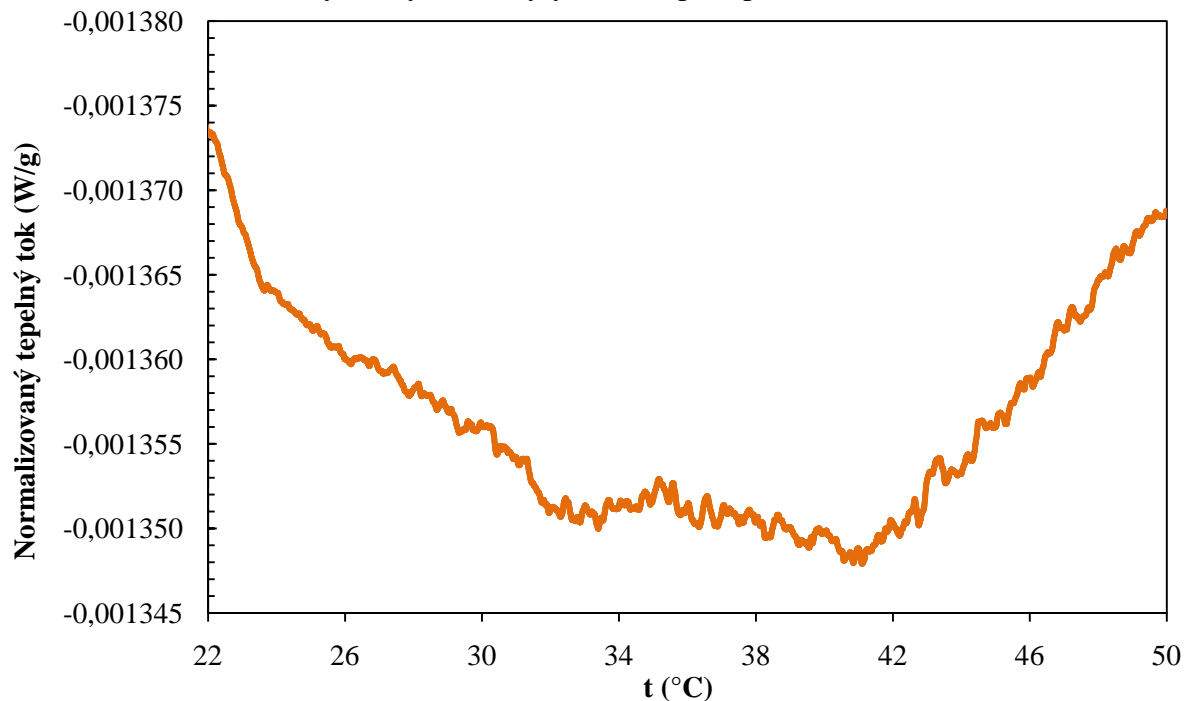
Nejmenší hodnoty S_{eff} byly zjištěny v případě lipidu DOTAP, což je pravděpodobně způsobeno přítomností dvojných vazeb na řetězci mastných kyselin. Dvojně vazby způsobí zlomy na řetězci a tím se vytvoří mezery mezi nepolárními řetězci tvořící liposom. Nejvyšší hodnoty S_{eff} byly pro samotou směs vypočítány u směsi DOTAP/DPPC v poměru 25/75, což bylo předpokládáno kvůli většímu poměru lipidu DPPC ve směsi, který obsahuje nasycené mastné kyseliny, díky čemuž byla struktura stabilnější.

Po přidání cholesterolu dochází u DOTAP a ekvimolárního poměru lipidů DOTAP/DPPC ke zvýšení uspořádanosti, jelikož cholesterol vyplňuje mezery mezi nenasycenými řetězci mastných kyselin tvořící liposom. U ekvimolárního poměru DOTAP/DPPC je změna uspořádání menší oproti DOTAP, protože se ve struktuře vyskytují lipidy obsahující řetězce nasycených mastných kyselin. U směsi DOTAP/DPPC v poměru 25/75 se po přidání cholesterolu uspořádání snižuje. Směs obsahuje větší množství lipidu DPPC s nasycenými řetězci mastné kyseliny, které tvoří uspořádanou strukturu. Cholesterol svým začleněním mezi uspořádané řetězce mastné kyseliny vytvoří mezery, čímž celkové uspořádání membrány sníží.

Přidání hyaluronanu vyvolává u vyšších koncentrací minimální změny uspořádání. Ovšem tento výsledek může být způsoben použitím sondy DPH. Tato sonda je hydrofobní a nachází se v nepolárních řetězcích liposomu, zatímco hyaluronan interaguje s polárními hlavami liposomu.

5.4 Teplota fázového přechodu

Teplota fázového přechodu byla proměřena u směsi lipidu DOTAP/DPPC v poměrech 25/75, 50/50 a 50/50 s přidavkem cholesterolu. Ve své práci uvádím pouze hodnoty pro ekvimolární poměr lipidů s přidavkem cholesterolu. Poměr 50/50 a 25/75 neuvádím, jelikož se nepodařilo získat dostatečně dobré výsledky, které byly vhodné pro zpracování.



Obrázek 40: Závislost normalizovaného tepelného toku na teplotě pro směs lipidů DOTAP/DPPC v poměru 50/50 v přítomnosti cholesterolu

Na Obrázku 40 je zobrazena závislost normalizovaného tepelného toku na teplotě. V bodě nejvyššího tepelného toku nastává teplota fázového přechodu. U směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 50/50 a 25/75 nebyla zaznamenána teplota fázového přechodu. Důvodem mohla být buď moc nízká teplota fázového přechodu stanovovaných směsí, nebo mírné zakalení vzorků po sonifikaci, které mohlo měření ovlivnit. Pro směs DOTAP/DPPC v ekvimolárním poměru s cholesterolem byl zaznamenán velmi pomalý fázový přechod kolem teploty 40 °C

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši na téma směsných lipidů a jejich interakcí s biopolymery. Na jejím základě byly jako vhodné lipidy vybrány fosfolipid 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin (DPPC) a kationický lipid 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) a jako zástupce biopolymeru kyselina hyaluronová. Interakce byly zkoumány pomocí fluorescenční spektroskopie. Jako fluorescenční sondy byly použity pyren a 1,6-difenylohexa-1,3,5-trien (DPH).

V první části experimentální práce byly připraveny zásobní roztoky směsí lipidů DOTAP/DPPC ve třech poměrech (100/0, 50/50, 25/75) a zásobní roztok hyaluronanu. Pro měření agregačního chování byly nachystány koncentrační řady lipidů s pyrenem. Byly určeny kritické agregační koncentrace směsi lipidů DOTAP a DPPC a dále se studovaly jejich změny po přidání hyaluronanu. Jelikož závislosti emisních a excitačních polaritách indexů na koncentraci lipidů či směsí lipidů vykazovaly sigmoidní průběh, bylo je možné prokládat Boltzmannovou závislostí.

Nejprve byla ke směsím lipidů přidána HyA o koncentraci 15 mg/l, která způsobila změnu CAC v případě všech studovaných směsí DOTAP/DPPC. Taktéž byly vypočítány poměry lipidů DOTAP a HyA, při kterých dochází k největší změně EmPI/ExPI pyrenu. U poměru směsi lipidů 50/50 a samotného lipidů DOTAP ku HyA byl tento poměr přibližně 2:1, zatímco při poměru směsi lipidů DOTAP/DPPC 25/75 ku HyA byl přibližně 1:1. Odchytky měření byly pravděpodobně způsobeny vznikem sraženin.

Vzhledem k neobvyklému průběhu závislosti ExPI/EmPI na koncentraci směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 byla změna CAC této směsi změřena i s přídatkem HyA o koncentracích 5 a 30 mg/l. Při koncentraci HyA 5 mg/l byly zaznamenány nepatrné změny CAC a největší opětovný nárůst ExPI/EmPI pyrenu byl při poměru lipidů DOTAP/HyA přibližně 3:1. Koncentrace HyA 30 mg/l měla na změnu CAC u jednotlivých směsí jiný vliv. V poměru lipidů 25/75 došlo ke zvýšení CAC, zatímco u samotného lipidů DOTAP k poklesu. Poměry DOTAP/HyA, u kterých byl zaznamenán největší opětovný nárůst ExPI a EmPI pyrenu, byl přibližně 2:1.

Dalším cílem práce bylo prostudovat vliv cholesterolu na fluiditu liposomů vzniklých z lipidů DOTAP a DPPC. Bylo zjištěno, že cholesterol zvyšuje uspořádání a tím snižuje fluiditu částic tvořených lipidem DOTAP nebo ekvimolární poměr DOTAP/DPPC. Důvodem jsou pravděpodobně kavity v membránách, které jsou tvořeny dvojnou vazbou na řetězci mastných kyselin lipidů DOTAP. Cholesterol tyto mezery zaplní, takže sonda DPH nemůže v hydrofobní části liposomu volně rotovat. Na směs lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 měl přídatkem cholesterolu opačný vliv, jelikož směs hlavně tvoří uspořádané nasycené řetězce DPPC, které jsou vázány silnějšími intramolekulárními vazbami. Začlenění cholesterolu mezi řetězce způsobí porušení intermolekulárních vazeb mezi mastnými kyselinami DPPC, takže sonda DPH může více rotovat. Bylo zjištěno, že přídatkem HyA nemá na fluiditu liposomů velký vliv, což mohlo být způsobeno spotřebováním většiny HyA na tvorbu sraženin.

Při měření velikosti vznikajících částic bylo zjištěno, že přídatkem HyA i cholesterolu vede k větším průměrům částic. Po přidání HyA byly také u směsí zaznamenány dvě velikosti částic, přičemž ta druhá o větším průměru byla v malém zastoupení. Pro získání

relevantnějších výsledků by bylo potřeba směs opakovaně proměřit, jelikož přidavkem HyA vznikají sraženiny, které mohou měření ovlivnit.

Teploty fázového přechodu byly změřeny pouze pro směsi lipidů, jelikož pro samotný lipid DOTAP je teplota fázového přechodu známá (5 °C) a příliš nízká, aby ji byl přístroj schopný zaznamenat. Byla proměřena směs lipidů DOTAP/DPPC 25/75 a 50/50 bez i s cholesterolem. Výsledky pro směsi lipidů DOTAP/DPPC v poměru 25/75 a 50/50 nebyly získány v dostatečné kvalitě, aby je bylo možné vyhodnotit. Pro směs lipidů v poměru 50/50 s cholesterolem byl zaznamenán pomalý fázový přechod kolem teploty 40 °C.

Co se využití systému ve farmacii týče, nabízí se využití liposomů jako nosičů léčiv pro transdermální použití. Tyto systémy by samozřejmě musely být lépe charakterizovány. Bylo by potřeba změřit stabilitu liposomů (například pomocí měření zeta potenciálů). Zároveň proměřit teploty fázových přechodů daných systému, a to buď optimalizací již v práci provedeného mikrokolorimetrického měření, nebo pomocí anizotropie fluorescence s využitím laurdanu jako fluorescenční sondy. Také by bylo potřeba změřit průchod liposomu pokožkou a jeho možnosti cíleného uvolnění léčiva.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. U připravených směsných lipidů byla studována jejich agregace a fluidita pomocí fluorescenčních metod. Dále byl studován vliv kyseliny hyaluronové a cholesterolu na tyto agregáty. Zároveň bylo zhodnoceno potenciální využití těchto systémů ve farmaceutickém průmyslu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KODÍČEK, M. Lipidy. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2016-10-23]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=lipidy
- [2] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: Harperova biochemie. 3. vyd. Jinočany: H&H, 1998. 872 s. ISBN: 80-85787-38-5.
- [3] Klasifikace a struktura lipidů [online]. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Klasifikace_a_struktura_lipid%C5%AF
- [4] VOET, D., VOETOVÁ, J. G.: Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing a.s., 1995. 1 362 s. ISBN 80-85605-44-9
- [5] Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y., Barenholz, Y.: DOTAP (and Other Cationic Lipids): Chemistry, Biophysics and Transfection. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2014, r. 21, č. 4, s. 257–317 [cit. 2017- 01-24]. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638468>
- [6] Junglas, M., Danner, B., Bayerl, T. M.: Molecular Order Parameter Profiles and Diffusion Coefficients of Cationic Lipid Bilayers on a Solid Support. *Langmuir*, 2003, r. 19, č. 4, s. 1914–1917. DOI: 10.1021/la026468s
- [7] Ohvo-Rekilä, Ramstedt, B., Leppimäki, P.: Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in lipid research*, 2002, r. 41, č. 1, s. 1914–1917. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0.
- [8] Přírodní látky - Lipidy. *Biochemie - vzdělávací portál* [online]. Praha: PŘF UK v Praze, 2013 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_lipidy.html#C
- [9] Lautenschlager, H.: Liposomes in dermatological preparations. *Journal of applied cosmetology*, 1990, r. 8, č. 1. S. 89-96. ISSN 0392-8543.
- [10] Liposome: Biology. *Encyclopædia Britannica* [online]. Londýn: Encyclopædia Britannica, 2007 [cit. 2017-01-24]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/liposome>
- [11] HADGIIVANOVA, Radina. *Aggregation of Amphiphilic Molecules in Solution: Thermodynamics, Metastability, and Kinetics*. Izrael, 2009. Disertace. Tel Aviv Univeristy. Vedoucí práce Prof. Haim Diamant.
- [12] LINDMAN, Björn a Paschalis ALEXANDRIDIS. *Amphiphilic block copolymers: selfassembly and applications*. 1st ed. New York: Elsevier, 2000, xii, 435 p. ISBN 04-448-2441-3.
- [13] Balazs, Daniel A. a WT. Godbey. Liposomes for Use in Gene Delivery [online]. [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1155/2011/326497. ISBN 10.1155/2011/326497.
- [14] ARAJO LOPES, Svía Caldeira de, Cristiane dos SANTOS GIUBERTI, Talita Guieiro RIBEIRO, Digo dos SANTOS FERREIRA, Elaine AMARAL LEITE a Mnica CRISTINA. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. *Cancer Treatment- Conventional and Innovative Approaches*. Rijeka: InTechOpen, 2013, s. 89. DOI: 10.5772/55290.

- [15] Hadašová, Eva. Lipozomální léčivé formy. *Remedia* [online]. 2006, (4), 433-437 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>
- [16] Hargittai, István a Magdolna Hargittai. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, r. 19, č. 5, s. 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3.
- [17] Nečas, J., Bartošíková, L., Brauner, P., Kolár, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Prague)*, 2008, r. 53, no. 8, p. 397–411.
- [18] GARG, Harry a Charles HALES. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. [cit. 2017-11-03]. ISBN 00-804-4382-6.
- [19] Atkins, E. D. T. a J. K. Sheehan. Structure for Hyaluronic Acid. *Nature New Biology*. 1972, r. 235, č. 60, s. 253-254. DOI: 10.1038/newbio235253a0.
- [20] Hascall, V. C., Laurent, T. C.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties [online]. 1997, poslední revize 15.12.1997 [citováno 2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [21] Kogan, G., Šoltés L., Stern R. a Gemeiner, P. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications* [online]. [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [22] Rah, Marjorie J. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry - Journal of the American Optometric Association* [online]. 2011, r. 82, č. 1, s. 38-43 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1016/j.optm.2010.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1529183910005129>
- [23] Hyaluronát sodný – kyselina hyaluronová [online]. [cit. 2017-19-03]. Dostupné také z: <http://www.cocky-kontakti.cz/kyselina-hyaluronova.html>.
- [24] DUNG, P. a kolektiv: *Ortopedie: 2., přepracované a doplněné vydání*. 2. Vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014, s. 1 681. ISBN 978-80-247-4357-8.
- [25] ATALA, A., LANZA, R., NEREM, R., THOMSON, J. A.: *Principles of regenerative medicine*. Boston: Elsevier Academic Press, 2011. 1 472 s. ISBN 978-0-12- 369410-2.
- [26] PAVELKA, K.: *Intraartikulární léčba kyselinou hyaluronovou*. Farmakoterapie revmatických onemocnění. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. Kapitola 17, s. 183–194. ISBN: 80-247-0459-8.
- [27] Shah, K., Crowder D., Overmeyer J., Maltese W. a Yun Y. Hyaluronan drug delivery systems are promising for cancer therapy because of their selective attachment, enhanced uptake, and superior efficacy. *Biomedical Engineering Letters*. 2015, r. 5, č. 2, s. 109-123. DOI: 10.1007/s13534-015-0180-4.
- [28] Longnotti, C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: A review. *Burns Trauma*. 2014, r. 2, č. 4, s. 162-168. DOI: 10.4103/2321-3868.142398.
- [29] Brown, MB a SA Jones. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005, r. 19, č. 3, s. 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.

- [30] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [31] NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody I.: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997, 166 s. ISBN 80-718-4365-2
- [32] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications* [online]. New York: Wiley-VCH, c2002 [cit. 2017-04-05]. ISBN 35-272-9919-X.
- [33] Bains, G., Patel, A. B. a Narayanaswami, V. Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules* [online]. 2011, r. 16, č. 12, s. 7909-7935 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.3390/molecules16097909. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/9/7909/>
- [34] Other Nonpolar and Amphiphilic Probes, section 13.5: DPH and DPH Derivatives. *Life technologies* [online]. [cit. 2017-04-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-lipids-and-membranes/other-nonpolar-and-amphiphilic-probes.reg.us.b2bcmgt.html#head2>
- [35] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications* [online]. New York: Wiley-VCH, 2002 [cit. 2017-04-06]. ISBN 35-272-9919-X.
- [36] PABST, W., GREGOROVÁ, E. *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT Praha. 2007.
- [37] Malvern Instruments Ltd.: Zetasizer Nano Series: User Manual. Worcestershire, 2004.
- [38] Campbell, R. B., Balasubramanian, S. V. a Straubinger, R. M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2001, r. 1512, č. 1, s. 27-39 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00290-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273601002905>
- [39] Regelin, A. E., Fankhaenel, S., Güttesch, L., Prinz, C., Kiedrowski, G. a Massing, U. Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2000, r. 1464, č. 1, s.151-164 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00126-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273600001267>
- [40] Bordi, F., Cametti, C., Gili, T., Gaudino, D., Sennato, S. Time evolution of the formation of different size cationic liposome–polyelectrolyte complexes. *Bioelectrochemistry*. 2003, r. 59, č. 1, s. 99-106. DOI: 10.1016/S1567-5394(03)00007-0.
- [41] Cinelli, S., Onori, G., Zuzzi, S., Bordi, F., Cametti, C., Sennato, S., Diciaiuti, M.. Properties of Mixed DOTAP–DPPC Bilayer Membranes as Reported by Differential Scanning Calorimetry and Dynamic Light Scattering Measurements. *The Journal of Physical Chemistry*. 2007, r. 111, č. 33, s. 10032-10039. DOI: 10.1021/jp071722g.

- [42] Briuglia, Maria-Lucia, Rotella, C., McFralane, A., Lamprou, D. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015, vol 5, č. 3, s. 231-242. DOI: 10.1007/s13346-015-0220-8.
- [43] Gomez Gaete, C., Tsapis, N., Silva, L., Bourgaux, C., Fattal, E. Morphology, structure and supramolecular organization of hybrid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine–hyaluronic acid microparticles prepared by spray drying. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2008, r. 34, č. 1, s. 12-21. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.02.003.
- [44] Gomez Gaete, C., Tsapis, N., Silva, L., Bourgaux, Besenard, M., Bochot, A., Fattal, E. Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, r. 70, č. 1., s. 116–126 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.04.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641108001513>
- [45] Gasperini, A., Ximena, A. X., Puentes-Martinez, E., Balbino, T. A., et al. Association between Cationic Liposomes and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid. *Langmuir* [online]. 2015, vol 31, č. 1, s. 3308–3317 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1021/la5045865. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la5045865>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

ADC	analog-to-digital convertor (analogově-digitální konvertor)
CAC	kritická agregační koncentrace
CFD	constant function discriminator (diskriminátor konstantní funkce)
DLS	dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
DMPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DPH	1,6-difenylhexa-1,3,5-trien
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DSC	diferenciální sknovací kalorimetrie
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
DXM	dexamethason
EmPI	emisní polaritní index
EPC	vaječný fosfatidylcholin
excimer	excitovaný dimer
ExPI	excitační polaritní index
HyA	hyaluronan
LUV	large unilamellar vesicles (rozsáhlé unilamelární vezikuly)
MCA	multichannel analyzer
MLV	multilamellar large vesicles (rozsáhlé multilamelární vezikuly)
mM	mmol·dm ⁻³
QELS	quasi elastic light scattering (kvazi elastický rozptyl světla)
S ₀	základní stav molekuly
SEM	rastovací skenovací mikroskop
SUV	small unilamellar vesicles (malé unilamelární vezikuly)
S _x	excitovaný singletový stav molekuly
TAC	time-to-amplitude convertor (konvertor času na amplitudu)
TCSPC	time-correlated single photon counting (metoda časově korelovaného počítání fotonů)
T _x	excitovaný tripletový stav molekuly
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického spektra
μM	μmol·dm ⁻³

8.2 Seznam symbolů

P	„packing parametr“
\bar{P}	polarizační stupeň
I_{VH}	intenzita fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
I_{VV}	intenzita fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
$I_{VH}(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při kolmé orientaci polarizátorů
$I_{VV}(t)$	časový vývoj intenzity fluorescence při paralelní orientaci polarizátorů
\bar{r}	ustálená (průměrná) hodnota anizotropie fluorescence
f_i	frakční intenzita fluorescence
r_i	frakční anizotropie
τ_i	doba života fluorescence
$I(t)$	totální intenzita časově-rozlišené fluorescence
r_0	fundamentální anizotropie
D_H	hydrodynamický ekvivalentní průměr
k	Boltzmannova konstanta
T	teplota
η	dynamická viskozita
D	translační difuzní koeficient
$r(t)$	časově-rozlišená fluorescence
r	anizotropie fluorescence
β	uhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly
c	koncentrace
A	y-ová souřadnice zlomu nebo fitovací parametr
x	nezávisle proměnná
x_0	nezávisle proměnná v inflexním bodu
dx	gradient
B_i	před-exponenciální funkce
t	čas
$R(\text{inf})$	rovnovážná hodnota anizotropie fluorescence
$R(0)$	počáteční anizotropie fluorescence
G	G-faktor
S	parametr uspořádání
S_{eff}	efektivní parametr uspořádání