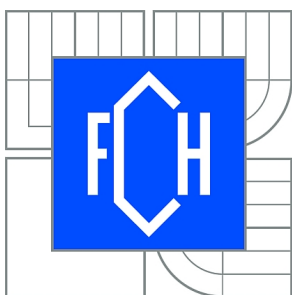


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

IONOKOMPLEXY HYALURONANU PRO KOSMETICKÉ A FARMACEUTICKÉ ÚČELY

HYALURONAN IONOCOMPLEXES FOR COSMETIC AND FARMACEUTICAL APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA CIMALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0508/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Jana Cimalová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Ionokomplexy hyaluronanu pro kosmetické a farmaceutické účely

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití nových biologicky přijatelných kationaktivních tenzidů (transfektantů) pro komplexaci s hyaluronanem.
2. Seznámit se stanovením agregačních vlastností tenzidů pomocí fluorescenční spektroskopie a navrhnout vhodnou metodu pro sledování agregací.
3. Provést základní experimenty studia agregace těchto nových tenzidů v různých prostředích a vliv koncentrace a molekulové hmotnosti hyaluronanu.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití těchto nových komplexů v kosmetice a farmacii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

Jana Cimalová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium systému kationaktivní tenzid – hyaluronan. Pomocí fluorescenční spektrometrie byla stanovena kritická micelární koncentrace karbethopendeciniumbromidu (Septonex) ve třech prostředích – voda, 0,15 M NaCl, pufr PBS, se třemi fluorescenčními sondami – pyren, perylen, nilská červeň. Bylo zjištěno, že fyziologické prostředí (pufr a NaCl) snižují hodnotu CMC o řád. Při experimentech s nativním hyaluronanem došlo k vytvoření sraženin a tvorbě gelu. V další části bylo studováno agregační chování nového biologicky přijatelného amfoterního tenzidu tetradecylfosfocholinu (TPC) v prostředí vody a NaCl v závislosti na rostoucí molární molekulové hmotnosti hyaluronanu. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen. Tato měření prokázala, že molární molekulová hmotnost ani změna iontové síly nemá vliv na hodnotu CMC a nedochází tak k interakcím s hyaluronanem. Posledním studovaným tenzidem byl 1, 2-dihexadekanoyl- 3- dimetylammonium- propan (DPTAP), který je však nerozpustný ve vodě. DPTAP je rozpustný v chloroformu, avšak po odpaření chloroformu a po přidání hyaluronanu došlo k jeho srážení.

Získané výsledky zatím potvrdily, že z hlediska studia agregace pomocí fluorescenční spektroskopie nové kationaktivní tenzidy TPC a DPTAP nejsou vhodné pro komplexaci s hyaluronanem.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the study of a system of cationic surfactant – hyaluronan. Using fluorescent spectroscopy the critical micellar concentration of Carbethopendecinium bromide (Septonex) was determined in three environments – water, 0,15 M NaCl, and buffer PBS, with three fluorescent probes – pyrene, perylene, and nile red. It was found that the physiological environments (buffer and NaCl) reduce the value of CMC about one order. During the experiments with native hyaluronan, precipitate and gel formation were observed. The following part dealt with aggregate behaviour of the new biologically acceptable amphoteric surfactant tetradecylfosfocholine (TPC) in the environment of water and NaCl according to the increasing molar molecular weight of hyaluronan. As a fluorescent probe perylene was used. These measurements showed that the molar molecular weight or a change of ionic force has no effect on the value of CMC and therefore there are no interactions with hyaluronan. The last surfactant to study was 1,2-dihexadecanoyl-3-dimetylammonium-propan (DPTAP), which is water insoluble. DPTAP is soluble in chloroform, but after evaporation of chloroform and after addition of hyaluronan, it precipitated.

The results so far, have confirmed that in terms of research of aggregation by fluorescence spectroscopy the new cationic surfactants TPC and DPTAP are not suitable for complexation with hyaluronan.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hyaluronan, pyren, perylen, nilská červeň, DPH, tenzidy, fluorescenční spektroskopie

KEY WORDS

Hyaluronan, pyrene, perylene, nile red, DPH, surfactants, fluorescence spectroscopy

CIMALOVÁ, J. *Ionokomplexy hyaluronanu pro kosmetické a farmaceutické účely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 42 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., konzultantovi Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a také Ing. Tereze Halasové za odborné rady a cenné připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kyselina hyaluronová.....	8
2.1.1	Historie	8
2.1.2	Výskyt	8
2.1.3	Vlastnosti a použití	9
2.1.3.1	Chemické a fyzikální vlastnosti.....	9
2.1.3.2	Biologické vlastnosti.....	9
2.1.3.3	Použití.....	9
2.2	Luminiscence.....	10
2.2.1	Fosforescence	10
2.2.2	Fluorescence	11
2.2.2.1	Vnitřní filtrační efekt.....	12
2.2.3	Neradiační přechody	12
2.2.3.1	Vibrační relaxace	12
2.2.3.2	Vnitřní konverze	12
2.2.3.3	Mezisystémový přechod.....	12
2.2.4	Anizotropie fluorescence.....	12
2.2.5	Fluorescenční sondy.....	14
2.2.5.1	Pyren	14
2.2.5.2	Perylen.....	15
2.2.5.3	Nilská červeň	15
2.2.5.4	1,6-difenylohexa-1,3,5-trien (DPH).....	16
2.3	Asociativní koloidy	16
2.4	Tenzidy.....	16
2.4.1	Struktura tenzidů.....	16
2.4.1.1	Kationaktivní tenzidy	17
2.4.2	Základní vlastnosti micel.....	17
2.4.2.1	Kritická micelární koncentrace.....	17
2.4.2.2	Struktura micel.....	18
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
4.1	Použité chemikálie	21
4.1.1	Polysacharidy.....	21
4.1.2	Fluorescenční sondy.....	22
4.1.3	Tenzidy.....	23

4.1.4	Další chemikálie	23
4.2	Pracovní postupy.....	24
4.2.1	Zásobní roztoky fluorescenčních sond.....	24
4.2.2	Zásobní roztok pufru PBS	24
4.2.3	Zásobní roztoky HyA.....	24
4.2.4	Zásobní roztoky tenzidů	24
4.2.5	Příprava vzorků.....	24
4.2.6	Měření	25
4.2.6.1	Nastavení přístroje	25
4.2.6.2	Stanovení CMC Septonexu ve vodě; 0,15 M NaCl a pufru PBS	25
4.2.6.3	Zjišťování agregačního chování Septonexu a HyA ve vodě	25
4.2.6.4	Stanovení CMC tetradecylfosfocholinu TPC	25
4.2.6.5	Stanovení agregačního chování TPC a HyA ve vodě a 0,15 M NaCl	26
4.2.6.6	Měření anizotropie	26
4.2.7	Vyhodnocení dat	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	Výsledky měření Septonexu	28
5.1.1	Stanovení CMC s pyrenem.....	28
5.1.2	Stanovení CMC s perylenem.....	29
5.1.3	Stanovení CMC s nilskou červení	30
5.1.4	Studium agregace Septonexu s hyaluronanem ve vodě.....	32
5.2	Výsledky měření TPC	33
5.2.1	Stanovení CMC tetradecylfosfocholinu ve vodě a NaCl	33
5.2.2	Agregační chování systému TPC – hyaluronan.....	34
5.2.3	Měření anizotropie	37
5.3	Výsledky měření DPTAPu	37
6	ZÁVĚR	38
7	POUŽITÁ LITERATURA	39
8	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	41
9	PŘÍLOHY	42

1 ÚVOD

Rychlé životní tempo a moderní způsob života přispěl k rozšíření civilizačních chorob, jako je rakovina. Podle statistického průzkumu bylo zjištěno, že v roce 2007 zemřelo na rakovinu jen v Evropě 1,7 miliónů lidí a lékaři zaznamenali 3,2 miliónů nových případů. Tato hrozivá čísla vedou vědce z celého světa k výzkumu nových léčiv. I přes převratné pokroky v medicíně se stále nepodařilo vyvinout léčivo, které by zbytečně nezasahovalo celý organismus postiženého člověka a nemělo vedlejší účinky, jako je vypadávání vlasů a celkové oslabení organismu.

Lidské tělo je ze 70 % tvořeno vodou a většina současných léčiv je ve vodném prostředí nerozpustná. Další nevýhodou léčiv je jejich rychlé vyloučení z organismu a nutnost opakovaného dodávání, což může vést k vytvoření odolnosti proti účinným látkám nebo chronické toxicitě. Jednou z nadějí výzkumu cílených léčiv je kyselina hyaluronová. Tento nenápadný biopolymer v sobě ukrývá vlastnosti, které by mohly vývoj cílených léčiv výrazně ovlivnit. Kyselina hyaluronová je tělu vlastní látka, nachází se v očním sklivci, kůži, svalech a je součástí synoviální tekutiny a extracelulární matrix. V hojné míře se nachází v nádorových buňkách. Postižené buňky využívají kyselinu hyaluronovou k vytváření vláken, které po určité době vytvoří síť, díky které je nádorová buňka dokonale vyživována a může se dále rozšiřovat i do jiných částí těla. Nádorové buňky obsahují receptory CD44 a RHAMM, které interagují s kyselinou hyaluronovou. Proto se předpokládá, že by cílené léčivo s kyselinou hyaluronovou mohlo zabezpečit distribuci a uvolnění léčiva přímo do nádorové buňky. Samotná kyselina hyaluronová to nedokáže, potřebuje na sebe navázat látku, která bude v sobě mít zabudované léčivo.

Takovou látku představují například kationaktivní tenzidy tvořící kulovité částice zvané micely, které ve svém středu mají opačné prostředí, než ve kterém jsou rozpuštěny. To znamená, že ve vodě je vnitřní prostředí micely hydrofobní a dokáže v sobě rozpustit látky ve vodě nerozpustné, v našem případě hydrofobní léčivo. Tenzid by měl být schopen navázat se na disociované karboxylové skupiny hyaluronanu a tím vytvořit komplex cíleného nosiče léčiva. Teorie zní velice jednoduše, ale realita je trochu jiná. K tomu, aby bylo vytvořeno ideální léčivo, se musíme o interakcích hyaluronanu a kationaktivních tenzidech mnohé dozvědět.

Následující práce se zabývá studiem agregací kationaktivních tenzidů v různých prostředích pomocí fluorescenční spektroskopie. Pro práci byly vybrány tři kationaktivní tenzidy: Septonex, DPTAP a TPC. Jako nástřel byly prováděny experimenty Septonexu s pyrenem, perylenem a nilskou červení. Experimenty byly prováděny ve třech prostředích: voda, 0,15 M roztok NaCl a fosfátový pufr PBS jako fyziologické prostředí. Pro omezené množství nových tenzidů DPTAP a TPC, kdy na všechny experimenty musel vystačit 1 g, byla vybrána jako fluorescenční sonda perylen v prostředí vody a 0,15 M NaCl. Dále bylo studováno chování tenzidů v závislosti na koncentraci a rostoucí molární molekulové hmotnosti hyaluronanu. Výchozí koncentrace kyseliny hyaluronové ve vzorcích byla 1 g/l a molární molekulová hmotnost byla 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Historie

Kyselinu hyaluronovou objevil v roce 1934 Karl Mayer a John Palmer v očním sklivci skotu. Její název je odvozen od řeckého slova *Hyalos* (sklo) a uronové kyseliny. V té době tito dva pánové určitě netušili, že substance, kterou objevili, se stane jednou z nejzajímavějších přírodních makromolekul. Kyselina hyaluronová se v medicíně poprvé použila v padesátých letech 20. století v oční chirurgii jako náhrada očního sklivce [1]. Z počátku byla izolována z pupeční šňůry a později z kohoutích hřebců.

V roce 1986 se do podvědomí dostává název hyaluronan, protože kyselina hyaluronová se v organismu nachází jako sodná či draselná sůl. Postupem času se izolace kyseliny hyaluronové vyvíjela a byla získávána i z jiných zdrojů. Vlastnosti této bílé substance byly studovány v mnoha laboratořích po celém světě. Kyselina hyaluronová je látkou, která nedala a nedá spát mnoha vědcům a její vlastnosti nás ještě mohou zajímavě překvapit.

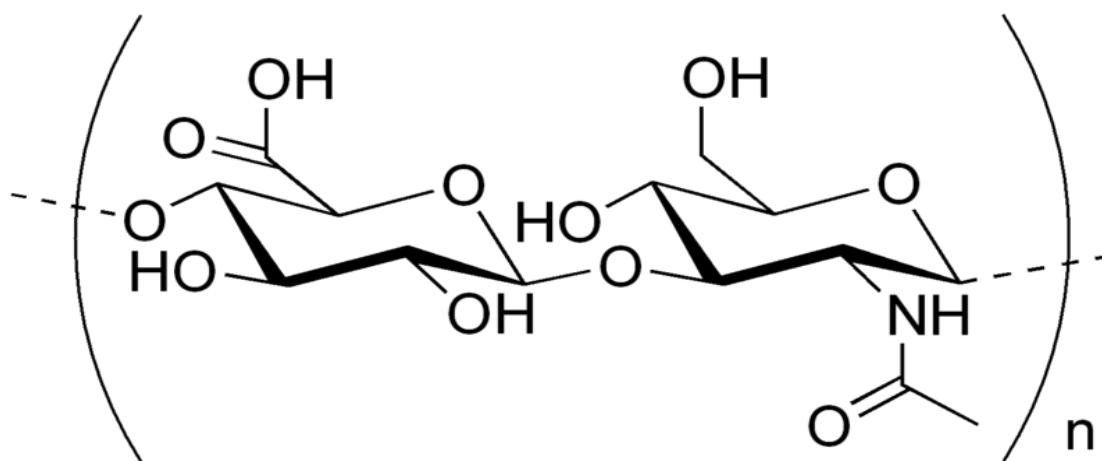
2.1.2 Výskyt

Hyaluronan je přírodní polysacharid a nachází se v živých organismech. Je součástí pojivových, epitelových a nervových tkání. Největší zastoupení má v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži [4]. Dále se nachází v pupeční šňůře a tvoří slizovité obaly vajíček některých organismů. Značné množství HyA bylo objeveno také v plicích, ledvinách, mozku a svaích. Moderní způsob výroby je založen na speciálně modifikovaných streptokokách, ze kterých je HyA izolovaná o vysoké molekulární hmotnosti a čistotě.

2.1.3 Vlastnosti a použití

2.1.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid s velkou molekulovou hmotností (Obr. 1). Skládá se z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu spojených střídavě glykosidickými vazbami β (1,4) a β (1,3). Počet monomerů v molekule HyA může dosahovat až 10 000 a více [3]. Molekulová hmotnost se pohybuje okolo 4 mil. $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (každá disacharidová jednotka cca $400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Axiální atomy vodíku tvoří nepolární hydrofobní část, zatímco odvrácený řetězec tvoří hydrofilní část, čímž dojde k vytvoření spirálové konfigurace, která je velmi stabilní [1]. Hyaluronan agreguje ve vodě pomocí specifických interakcí a vytváří síťované struktury i při velice nízkých koncentracích. Hyaluronan se ve vodě rozpouští za vzniku vysoce viskózního roztoku při vysoké molekulové hmotnosti [2]



Obr. 1 Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové

2.1.3.2 Biologické vlastnosti [5]

- váže na sebe vodu (pojme až tisícinásobek své hmotnosti)
- brání ukládání kolagenu a tím podporuje bezjizvé hojení
- má analgetický účinek
- působí jako antioxidant
- v kloubní tekutině slouží díky svým viskoelastickým vlastnostem jako lubrikant a tlumič nárazů

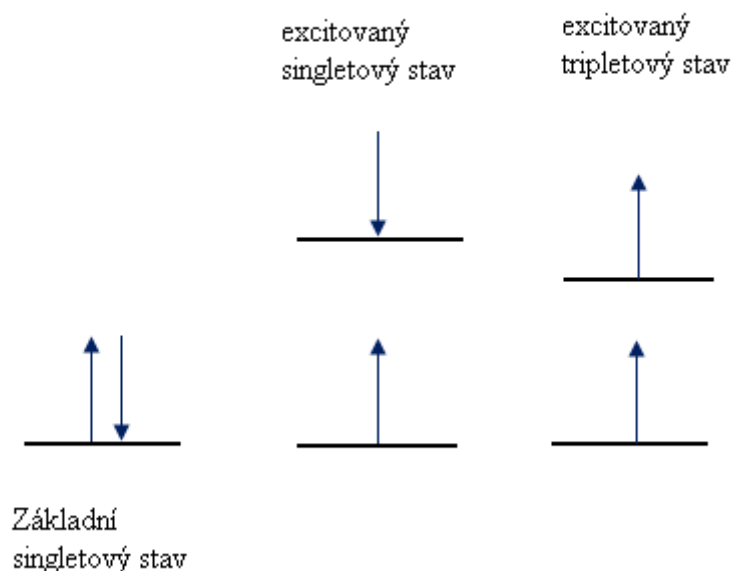
2.1.3.3 Použití

Díky svým unikátním hydratačním a elastickým vlastnostem má HyA široké spektrum využití jak v kosmetice, tak farmacii. Ve farmacii je to zejména příprava léčiv pro kloubní onemocnění a některé druhy rakoviny [4], dále se používá v oční chirurgii a hojení jizev. V kosmetice se využívá k přípravě krémů a gelů proti vráskám a stárnutí pleti.

2.2 Luminiscence

K luminiscenci dojde pouze tehdy, pokud látka absorbuje světlo o určité vlnové délce λ a tím přejde do excitovaného stavu. Absorpce trvá $1 \cdot 10^{-5}$ s a doba trvání excitovaného stavu se pohybuje okolo $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-9}$ s.

Luminiscence je jev, při kterém dojde k emisi ultrafialového, viditelného nebo infračerveného světla látkou. Emise nastává při návratu elektronu na základní hladinu z vyšší energetické hladiny (excitovaného stavu) na základní hladinu. Elektronové stavy většiny organických molekul se dělí na singletové (spárovaný spin) nebo tripletové stavy (stejný spin). Podle typů přechodů, které v molekule probíhají, dělíme luminiscenci na **fosforescenci** a **fluorescenci** [6].



Obr. 2 Typy přechodů při excitaci – šipky znázorňují orientaci spinů při jednotlivých přechodech. Tripletová hladina leží níže než singletová

Absorpce energie je spojena s přechodem vazebných, popřípadě nevazebných elektronů v molekule do protivazebných molekulových orbitalů. Singletový excitovaný stav – elektrony mají antiparalelní spin, přechod je povolený a intenzita absorpce je vysoká. Tripletový excitovaný stav – elektrony mají stejný spin, přechod je zakázaný = méně pravděpodobný, poskytuje pásy s nižší intenzitou.

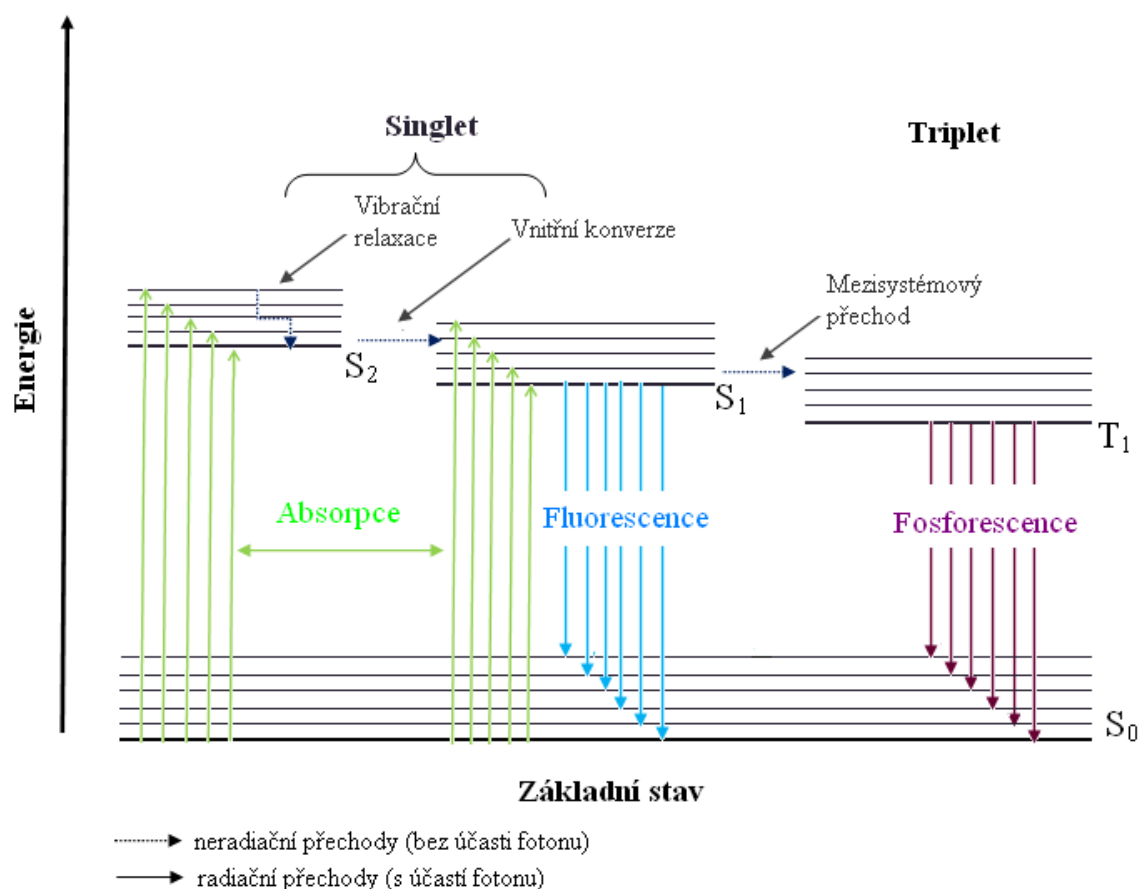
2.2.1 Fosforescence

Elektron po absorpci určité vlnové délky λ přejde nezářivým přechodem z excitovaného stavu S_1 na T_1 , protože přechod z S_0 na T_1 je zakázaný nebo málo pravděpodobný. Fosforescence je emise fotonů z tripletového stavu T_1 na základní hladinu S_0 . Doba života elektronu ve stavu T_1 je $10^{-4} - 10^2$ s.

2.2.2 Fluorescence

Fluorescence je jev, kdy látka po excitaci elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce při návratu do základního stavu S_0 vyzáří energii ve formě fotonu o nižší energii (tzn. při normální jednofotonové excitaci vyzáří světlo o stejné nebo delší vlnové délce než excitační záření). V některých případech může docházet i k jevu, který nazýváme **zpožděná fluorescence**. Je to jev, při kterém dojde k přechodu elektronu z tripletové hladiny T_1 na S_1 a teprve potom dojde k fluorescence. Doba dosvitu je delší než normální fluorescence.

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů. **Srážkové neboli dynamické zhášení** nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášeče. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny. Při **statickém zhášení** dojde po kontaktu fluoroforu a zhášeče k vytvoření nefluorescenčního komplexu. **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným, nastává při jeho vysokých koncentracích [7]. Mezi nejčastější zhášeče fluorescence patří molekulární kyslík O_2 a vlivem vnitřní konverze zháší fluorescenci halogeny, zejména bróm a jód. Na Obr. 3 jsou znázorněny všechny typy přechodů elektronu po absorpci elektromagnetického záření.



Obr. 3 Jablonského diagram

Mírou intenzity fluorescence je kvantový výtěžek, který vyjadřuje poměr počtu kvant látkou emitovaných k počtu kvant absorbovaných za jednotku času. Kvantový výtěžek je vyjádřen vztahem:

$$Q_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \cdot \tau_S \quad (1.)$$

Q_F – kvantový výtěžek

k_r^S – rychlostní konstanta pro přechod ze stavu S_1

k_{nr}^S – rychlostní konstanta zahrnující neradiační přechody

τ_S – doba trvání excitovaného stavu

2.2.2.1 Vnitřní filtrační efekt

Intenzita fluorescence je závislá na optické hustotě vzorku, geometrii měření a osvětlení. Nejběžnější používaná geometrie pro měření fluorescence je pravoúhlé uspořádání, kdy dochází k detekci fluorescence ze středu kyvety. Pokud je optická hustota vzorku nízká, paprsek prochází středem kyvety a pokles intenzity fluorescence je minimální. Jestliže je optická hustota vzorku vysoká nebo je-li vzorek silně zakalen, dochází k rozptylu světelného paprsku a intenzita fluorescence je výrazně ovlivněna [8], [9].

2.2.3 Neradiační přechody

2.2.3.1 Vibrační relaxace

Je velice rychlý přechod bez účasti fotonu. Dochází pouze k vyzařování tepelné energie. Po excitaci na jednu z vibračních hladin dochází k přechodu na nejnižší vibrační hladinu nejnižšího excitovaného stavu.

2.2.3.2 Vnitřní konverze

Jde o přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou S_1 na nejvyšší vibrační hladinu nejnižšího singletového stavu S_0 . Vibrační hladiny těchto dvou stavů jsou velice blízko u sebe, a proto elektron může přecházet bez výrazné změny energie.

2.2.3.3 Mezisystémový přechod

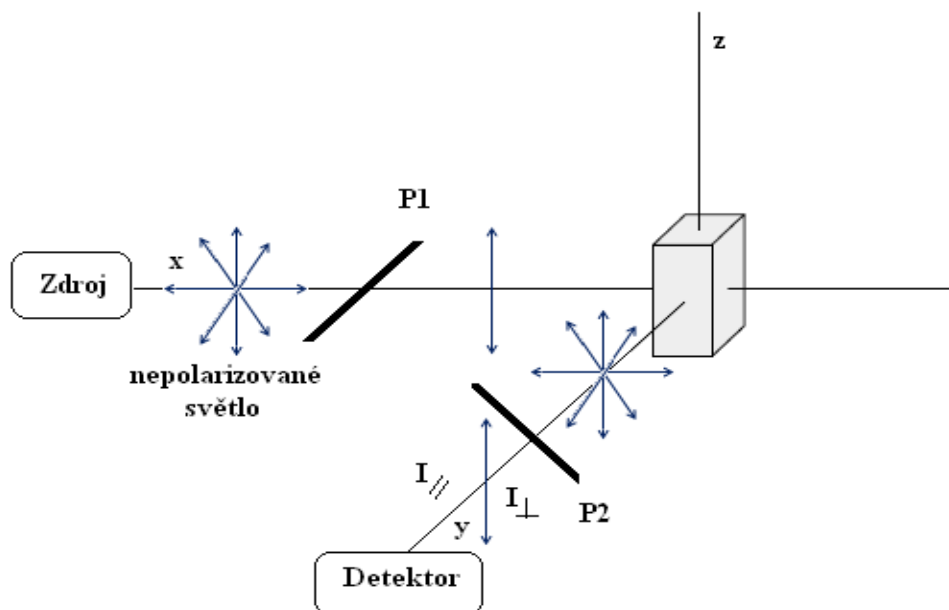
Dochází k přechodu elektronu ze stavu S_1 do vyššího vibračního stavu T_1 a pak následně vibrační kaskádou do stavu T_1^0 . Tento proces zahrnuje změnu spinu elektronu a je málo pravděpodobný.

2.2.4 Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie se hojně využívá v biochemii ke studiu fluidity membrán, velikosti a tvarů biomolekul.

Měření anizotropie je založeno na fotoselektivním buzení fluoroforu polarizovaným světlem. Přednostně se excitují ty fluorofory, které mají vektor absorpčního tranzitního momentu v rovině polarizace [12]. Tranzitní moment molekuly má definovanou orientaci s ohledem na osy v molekule. V izotropním roztoku je náhodné uspořádání fluoroforu. Po excitaci polarizovaným světlem dochází k excitaci jen těch molekul fluoroforu, které mají tranzitní dipól molekuly ve stejném směru jako elektrický vektor polarizovaného světla. Tato

fotoselektivní excitace vede k částečné orientaci molekul fluoroforu a k částečné polarizaci emise fluorescence [9]. Na Obr. 4 je znázorněno klasické rozvržení při měření fluorescenční anizotropie.



Obr. 4 Schematické znázornění měření anizotropie – ze zdroje vychází nepolarizované světlo, které projde polarizátorem P_1 a tím vznikne polarizovaný paprsek, který kmitá v jedné rovině. Tento paprsek dopadá na kyvetu se vzorkem. Interakcí vzorku s paprskem může dojít k jeho depolarizaci. Míra depolarizace je určena měřením intenzity fluorescence rovnoběžně a kolmo na příchozí rovinu světla polarizovaného polarizátorem P_2 [18].

Fluorescenční anizotropie r je definována následujícím vztahem:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.)$$

$I_{||}$ – excitační a emisní polarizátor nastaven horizontálně

$I_{\perp}$ – emisní polarizátor horizontálně a excitační polarizátor vertikálně

Pro vyhodnocení výsledků je potřeba znát hodnotu fundamentální anizotropie r_0 , která udává hodnotu anizotropie při nulovém pohybu molekuly fluoroforu. Tato teoretická hodnota dosahuje maxima 0,4 a pokud jsou absorpční a přechodové momenty molekuly k sobě kolmé může nabývat i záporných hodnot [12]. Závislost anizotropie na viskozitě prostředí vyjadřuje Perrinova rovnice:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{R \cdot T \cdot \tau}{V \cdot \eta} \quad (3.)$$

R – univerzální plynová konstanta; T – termodynamická teplota; τ – doba života fluoroforu; V – hydrodynamický objem sondy; η – viskozita

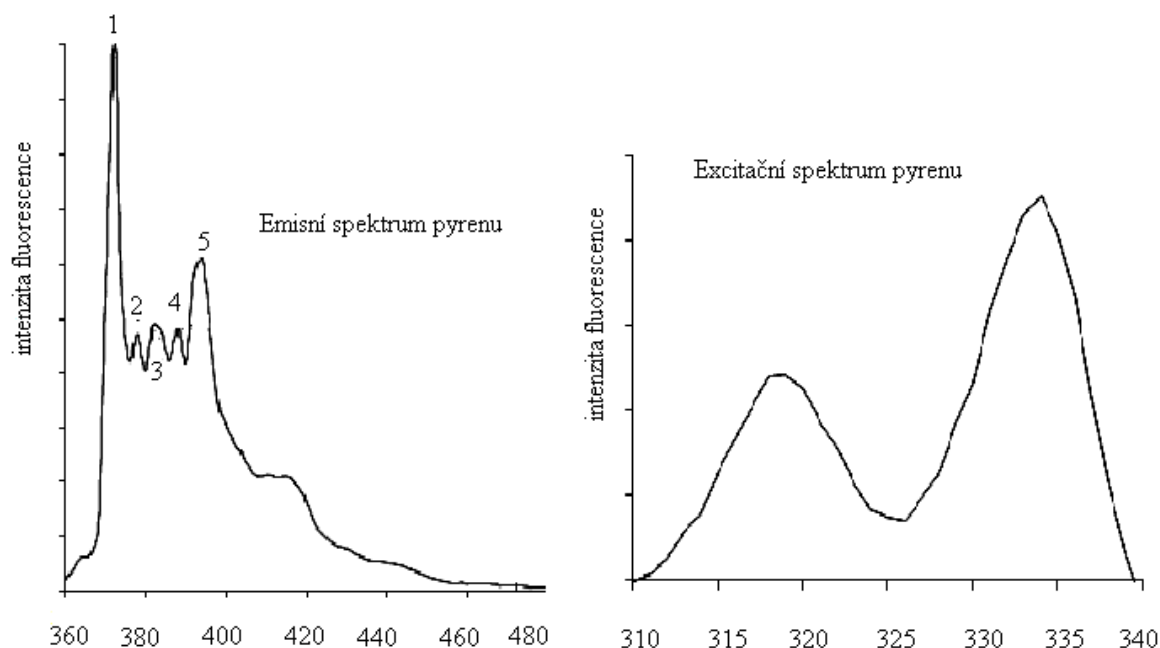
2.2.5 Fluorescenční sondy

Zdaleka ne všechny molekuly fluoreskují po absorpci UV-VIS. Fluorescenci vykazují tzv. fluorescenční sondy a značky, ke kterým řadíme některé organické látky se systémem dvojných konjugovaných vazeb, polovodičové nanočástice či fluorescenční proteiny [11]. Fluorescenční sondy nesou označení ty molekuly, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentní vazbou. Naopak fluorescenční značky se vážou vazbami kovalentními [7].

2.2.5.1 Pyren

Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík, jehož molekula se skládá ze čtyř spojených benzenových jader. Pyren je symetrický a citlivý na polaritu svého okolí. Vibrační struktura emisního spektra pyrenu je v koloidních roztocích skoro vždy dobře rozlišena. Na Obr. 4 jsou vyznačeny jednotlivé přechody. Přechody 2,4,5 jsou zaznamenány jen v čistém rozpouštědle. Nejdůležitějšími přechody jsou 1 a 3, dále označovány jako I_1 a I_3 . Přechod I_1 je lokalizován při 373 nm a je závislý na polaritě okolí. Přechod I_3 při 384 nm [12]. Při vlnové délce 470 nm je hodnota intenzity fluorescence I_E charakteristická pro tvorbu excimeru pyrenu. Jedná se o stechiometrický komplex molekul a tvoří se interakcí excitované molekuly s molekulou v základním stavu: $M^* + M \rightarrow D^*$. Pro stanovení CMC se používá poměr intenzity fluorescence emisního spektra EmPI (poměr I_1/I_3). V polárním prostředí má poměr hodnotu cca 1,7 a v nepolárním 0,5. Při koncentrační závislosti lze poměr EmPI vynést na logaritmu koncentrace a proložit Boltzmanovou S-křivkou. Z níže uvedené rovnice pak vypočítáme hodnotu CMC – maximum, minimum, inflexní bod (x_0), gradient (Δx):

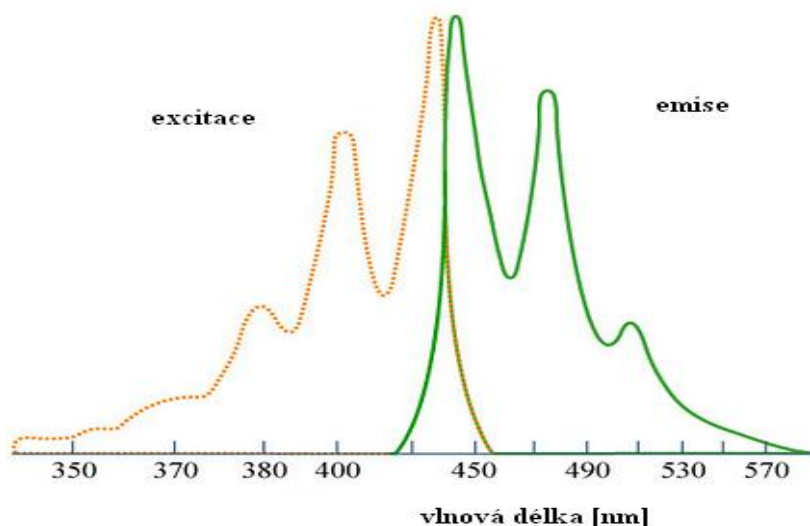
$$EmPI = \frac{\max - \min}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + \min \quad (4.)$$



Obr. 5 Emisní a excitační spektrum pyrenu a naznačení vibračních přechodů

2.2.5.2 Perylen

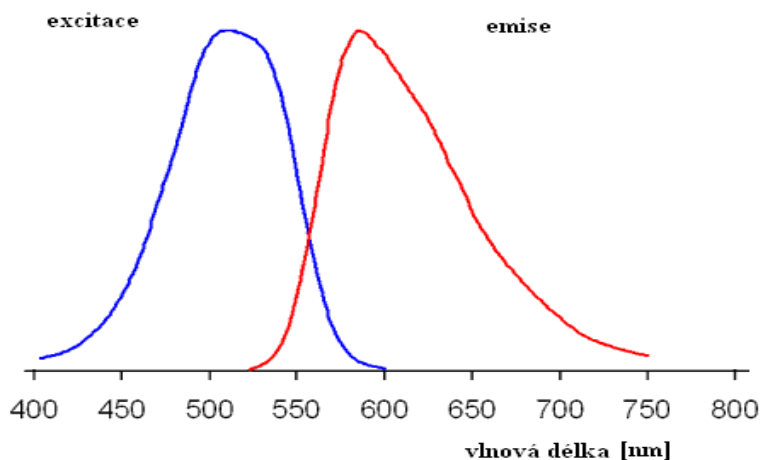
Patří také do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků a je tvořen ze dvou molekul naftalenu spojených vazbou C-C v polohách 1 a 8 obou molekul. Ve vodném prostředí nedochází k detekci intenzity fluorescence. Zvyšování intenzity fluorescence je způsoben přítomností hydrofobního prostředí (micely, agregáty). Perylen je vhodnou sondou pro stanovení CMC a agregačního chování systémů. Perylen má absorpční maximum okolo 438 nm a emituje okolo 440 nm.



Obr. 6 Emisní a excitační spektrum perylenu

2.2.5.3 Nilská červen

Další hojně používanou fluorescenční sondou citlivou na polaritu svého okolí je nilská červen. Se zvyšující se polaritou klesá intenzita fluorescence a maximum vlnové délky emisního spektra se posouvá k vyšším hodnotám. V polárním prostředí se maximum pohybuje okolo 640-650 nm, v nepolárním prostředí maximum klesá až na 610 nm.



Obr. 7 Emisní a excitační spektrum nilské červeně v glycerolu

2.2.5.4 1,6-difenylohexa-1,3,5-trien (DPH)

Je malá organická molekula podávající informace o svém mikrookolí, jako je polarita a viskozita. Tato sonda má praktické využití ve značení membrán, je nepolární a ve vodě prakticky nerozpustná, tudíž veškerá fluorescence pochází z nepolárního prostředí. Excitační maximum nastává při vlnové délce 360 nm a emisní maximum při 430 nm [19].

2.3 Asociativní koloidy

Ve vhodném rozpouštědle poskytují některé nízkomolekulární látky ve velkém zředění pravé roztoky, ale při určité koncentraci asociují jejich molekuly do té míry, že vytvářejí částice koloidních rozměrů (1-1000 nm). Tyto útvary se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, označujeme jako **micelární** neboli **asociativní koloidy**.

Micelární koloidní roztoky vznikají samovolným rozpouštěním tenzidů v daném rozpouštědle. Vlastnosti těchto roztoků a vlastnosti micel (tvar, velikost, struktura) závisí na okamžitých fyzikálních podmínkách (tlak, teplota) a na vlastní koncentraci a koncentraci přidaných látek. K micelárním koloidům rozpustným ve vodě patří mýdla, syntetická smáčedla, které známe pod označením **detergenty**, **surfaktanty** nebo **tenzidy** [10].

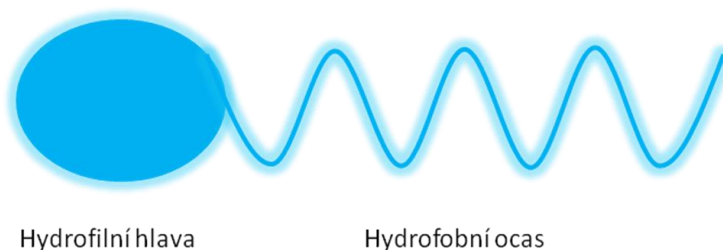
2.4 Tenzidy

Termínem tenzidy se označují skupiny organických látek, jejichž společnou vlastností je, že při nízké koncentraci v soustavě jsou schopny hromadit se na mezifázovém rozhraní a tak snižovat jeho povrchové napětí. Pojem fázové rozhraní je myšlena plocha, která odděluje dvě fáze. Těmito fázemi mohou být kapalina/kapalina, kapalina/pevná látka nebo kapalina/plyn. K hromadění molekul tenzidu na fázovém rozhraní dochází tak, že molekuly tenzidu difundují na povrch kapalně fáze (rozpouštědla), kde se adsorbují na rozhraní dvou fází a vytvoří monomolekulární vrstvu. Zvyšováním koncentrace rozpuštěného tenzidu bude docházet ke snížení povrchového napětí [13].

2.4.1 Struktura tenzidů

Molekula tenzidu musí být amfifilní (obojetná), tj. musí se skládat z části lyofilní, která má tendenci rozpouštět se v daném prostředí, a z lyofobní části, která je v témže prostředí nerozpustná. Pokud je rozpouštědlem voda, nazýváme tyto části hydrofobní a hydrofilní.

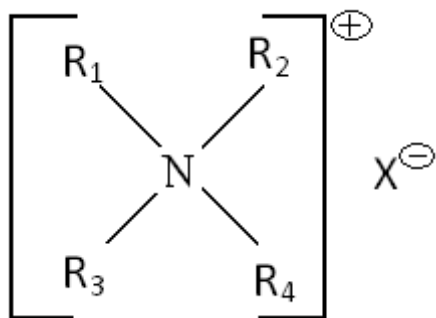
Hydrofobní část tvoří jeden nebo více uhlovodíkových řetězců. Neochota hydrofobní části k interakci s vodou je pak zodpovědná za proces asociace. Podle toho, jak hydrofilní skupina podléhá disociaci, dělíme tenzidy na **ionogenní** (anionaktivní, kationaktivní, amfoterní) a **neionogenní** neboli **neutrální** [10].



Obr. 8 Struktura tenzidu

2.4.1.1 Kationaktivní tenzidy

Drtivá většina kationotových tenzidů je založena na atomu dusíku nesoucího kladný náboj [14]. Nejdůležitější jsou aminové a kvartérní amoniové soli. Aminové tenzidy jsou závislé na prostředí, ve kterém jsou rozpuštěny a závisí na hodnotě pH [13],[14]. Obecný vzorec kvartérní amoniové soli je znázorněn na Obr. 9, kde $X^- = Cl^-, Br^-, CH_3OSO_3^-, C_2H_5OSO_3^-, CH_3COO^-$ a R_1-R_4 jsou jednoduché nebo substituované alkyly, z nichž alespoň jeden musí obsahovat 8 – 18 uhlíkových atomů v lineárním řetězci. Alkylová skupina může být připojena i k aromatickému jádru. Délka alkylového řetězce, jejich substituce a přítomnost aryllové skupiny v molekule kvartérní amoniové sloučeniny určuje její vlastnosti a použití. Kvartérní soli (chloridy, bromidy, octany, apod.) jsou dobře rozpustné ve vodě a v alkoholech. Se zvyšující se teplotou jejich rozpustnost roste. Kationaktivní tenzidy mají významné antibakteriální účinky. Usmrcují bakterie, plísňe a kvasinky. Používají se proto jako antiseptika, desinfekční činidla, bakteriocidy, fungicidy a deodoranty [13].



Obr. 9 Obecný vzorec kvartérní amoniové soli

2.4.2 Základní vlastnosti micel

2.4.2.1 Kritická micelární koncentrace

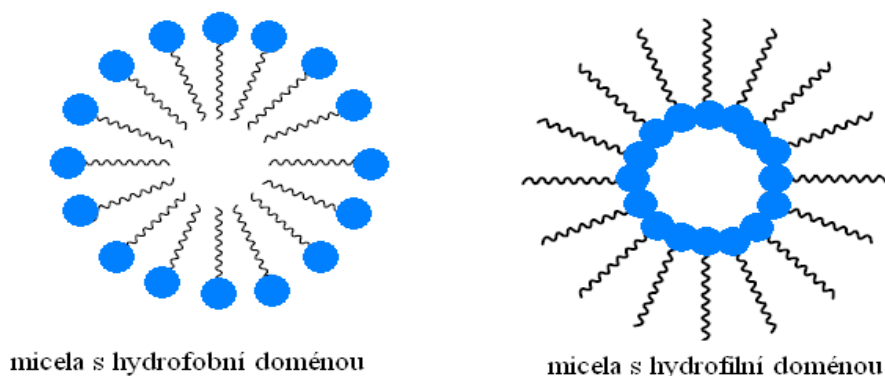
Micely se tvoří pouze nad kritickou micelární koncentrací (CMC). Tato koncentrace nebývá příliš vysoká, pohybuje se v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} M. Koloidní soustava pod touto hodnotou se nachází pouze ve stavu unimerních molekul, nad hodnotou CMC všechny molekuly asociují do micel. Kritická micelární koncentrace závisí na délce a struktuře uhlíkového řetězce. Hodnota CMC s rostoucí délkou uhlíkového řetězce klesá. Závislost CMC na délce uhlíkatého řetězce je vyjádřena vztahem pro ionogenní micelární koloidy:

$$\ln CMC = A - B \cdot \eta c \quad (5.)$$

kde A je konstanta závislá na teplotě, povaze hydrofilních skupin a substituentech uhlíkového řetězce; konstanta B se mění s počtem iontových skupin; ηc udává počet uhlíků v řetězci [15]. S kritickou micelární koncentrací souvisí i pojem **agregační číslo**, které udává počet monomerů uvnitř jedné micely [16].

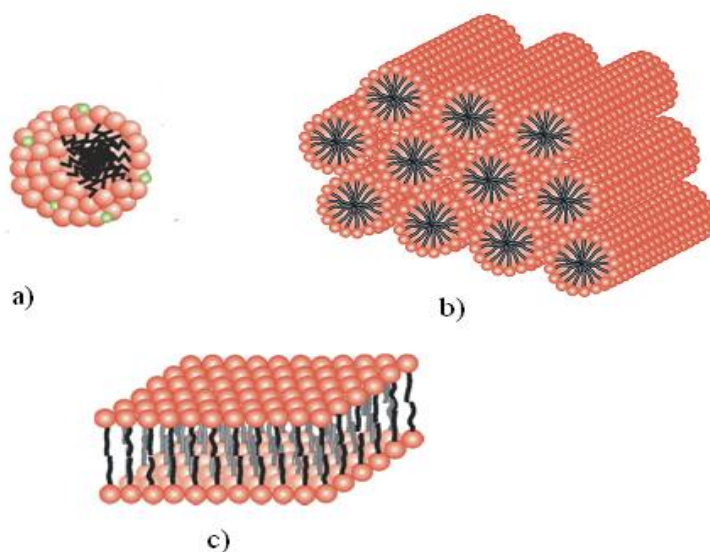
2.4.2.2 Struktura micel

Jádro micely má vždy opačný charakter než použité rozpouštědlo. Uvnitř micely tenzidu ve vodném prostředí je tedy nepolární prostředí. Tímto způsobem můžou tenzidy ve vodném prostředí udržet látky jinak ve vodě nerozpustné.



Obr. 10 Micely v polárním a nepolárním prostředí

Velikost a tvar micel závisí na teplotě, koncentraci, struktuře PAL a charakteru mezimolekulárních sil. Ve zředěných roztocích nad CMC se tvoří malé kulovité micely zvané **Hartleovy micely**, jejichž uhlovodíkové řetězce jsou navzájem propleteny – tvoří jádro micely a jejich polární skupiny směřují navenek (do vody). Poloměr takového agregátu je přibližně roven délce molekuly PAL. S rostoucí koncentrací roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se v nich stále více orientují navzájem rovnoběžně. Při větších koncentracích vznikají tzv. mezofáze – **hexagonální** a **laminární (McBainovy) micely**, složené ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci a ionogenní skupiny směřují ven. Stavbou připomínají dvojrozměrný krystal. **Laminární micely** se ukládají navzájem rovnoběžně, přičemž sousední molekuly jsou k sobě obráceny povrchy, na kterých jsou hydratované skupiny molekul PAL. V důsledku tvorby laminárních micel a jejich charakteristického uspořádání mohou dostatečně koncentrované roztoky přecházet v gel [17].



Obr. 11 a) Hartleova (kulovitá) micela, b) hexagonální micela, c) McBainova (laminární) micela [17]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Nové kationtové transfektanty (tenzidy) jsou používány zejména v genové terapii pro komplexaci s DNA a vytvoření takzvaných lipoplexů nebo polyplexů [20]. Genová terapie spočívá ve změně exprese genů člověka [21] a vyvstávají zde určitá rizika a otázky: Jak vpravit gen do buňky bez jejího poškození a aby nedošlo k jejímu nádorovému bujení? Jak vyřadit vadný gen a místo něj správně spustit ten dobrý? Je to vůbec etické? Účinné nosiče založené na nukleových kyselinách jsou klíčovým faktorem této terapie. Nevýhody spojené s užíváním virových vektorů, zejména těch, které souvisejí se zdravotními riziky, vedly vědce rozvíjet alternativní metody pro dodání genu založených na biologicky přijatelných kationktivních transfektantech [22]. Na rozdíl od virových vektorů, jsou tyto systémy známy jako *ne – virové* nosiče a jsou bezpečnější při používání *in vivo* [20].

Thalberg a Lindmant [23] zaměřili své studium na interakci kationtových tenzidů s hyaluronanem v závislosti na délce alkylového řetězce tenzidu. Pro chování systému hyaluronan – kationktivní tenzid použili následující metody: fázová separace, vodivost, NMR a solubilizace barviv. Výsledky jejich měření ukázaly, že k návázání tenzidu na hyaluronan stačí velmi nízká koncentrace tenzidu c_1 a počet uhlíků v alkylovém řetězci tenzidu musí být minimálně deset. Tenzidy s kratším řetězcem vytvoří volné micely, protože je to energeticky výhodnější. Hodnota koncentrace c_1 se nachází pod CMC a s rostoucím počtem uhlíků v řetězci hodnota c_1 klesá. Také bylo prokázáno, že vazba hyaluronu s tenzidem je slabší, než s jiným polyelektrolytem.

Lendemans a spol. [24] se zabývali nahrazením fosfolipidové složky v ISCOMech (imunitně-stimulované komplexy) kationktivním DOTAPem. Fosfolipidy jsou nezbytnou složkou ISCOMů a umožňují vznik dobře definovatelných struktur připomínajících klec s typickým rozměrem 40 – 100 nm. Koloidní struktura byla tvořena DOTAPem, Quil-A (*Quillaja saponin*) a cholesterolem. Vzorky byly připravovány pomocí hydratace lipidového filmu dialyzačními technikami. Tvoření této struktury bylo pozorováno jen u složení DOTAPu s nízkým hmotnostním poměrem (méně než 25%), což nezpůsobuje žádnou změnu negativního ζ -potenciálu koloidní částice. Vysoký hmotnostní podíl DOTAPu způsobuje fázovou separaci a tím nedochází k začleňování DOTAPu do Quil-A a cholesterolu k vytvoření částic o kleci podobné struktuře (*Cage-like structures*). Proto se zatím neuvažuje o přípravě ekvivalentů kationtových imunitně-stimulovaných komplexů.

DOTAP je populární transfektant pro cross-membránové dodání molekul DNA díky schopnosti komplexace s anionktivní DNA [29].

Filion a Phillips [25] studovali kationktivní lipidy vytvářející velmi stabilní komplexy s DNA nebo dioleoylfosfatidyletanolaminem (DOPE), které mohou destabilizovat endosomální kompartment buňky a spustit uvolňování nukleové kyseliny do cytoplasmy. V této práci byly vyhodnocovány účinky liposomů s obsahem kationktivních lipidů na produkci oxidu dusnatého NO a tumor nekrotizující faktor – α (TNF- α), dva důležité imunostimulátory. Produkce NO aktivuje makrofágy a zabraňuje specifické imunitní reakci. TNF – α je produkován makrofágy, působí proti virům a nádorovému bujení a zvyšuje účinnost B a T – lymfocytů. Výsledky prokázaly, že komplexy tvořené DOPE a kationktivními lipidy jsou toxické pro makrofágy a lidské buňky U937, ale nejsou toxické pro T – lymfocyty. Pořadí

toxicity liposomů je následující: DOPE / DDAB > DOPE / DOTAP > DOPE / DMTAP > DOPE / DPTAP > DOPE / DSTAP.

Cílem práce **Regelin a spol.** [26] bylo pozorování biofyzikálních parametrů a transfekčních vlastností analogů DOTAPu (DOTAP, DSTAP, DPTAP, DMTAP, DLTAP). Analogy DOTAPu byly použity buď samostatně nebo s přidavkem cholesterolu nebo DOPE. Hlavní metodou bylo měření anizotropie v závislosti na teplotě. V experimentech byl použit nepolární fluorofor DPH (1,6-diphenylhexa-1,3,5-trien), který se zcela začleňuje do hydrofobní části lipidové dvojvrstvy. Výsledky měření prokázaly, že všechny čisté analogy DOTAPu jsou nestabilní za normálních podmínek, ale po přidání cholesterolu či DOPE se jejich stabilita zvyšuje. Velikost liposomů se samostatnými analogy je 23 – 58 nm, liposom / cholesterol 53 – 95 nm, liposom / DOPE 20 – 160 nm. Anizotropní křivky čistých analogů vykazovaly při 37°C vysoké hodnoty anizotropie charakterizující rigidní (tuhý) stav DPTAP, DSTAP, DMTAP nebo nízké hodnoty, charakterizující fluidní (tekutý) stav DLTAP. Po přidání DOPE, byly anizotropní křivky srovnatelné s čistými analogy, kdežto cholesterol snížil hodnotu anizotropie.

Tato skupina vědců **Lei, Rahim, Quinn a Segura** [27] se zabývala vytvořením nového procesu zvaného „nanočásticová enkapsulace“, který dokáže začlenit koncentrované a neagregované nanočástice do různých struktur gelu. V této studii bylo dokázáno, že kyselina hyaluronová a fibrinové hydrogely s koncentrovanými a neagregovanými polyplexy mohou být vhodné pro genové dodání *in vivo* a *in vitro*. Ve studii byla testována velikost polyplexů bez přítomnosti HyA a fibrinu a s jejich přítomností pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Bylo zjištěno, že DNA/PEI polyplexy dosahovaly rozměrů 50 – 100 nm, kdežto v přítomnosti 1% HyA byla velikost okolo 1 μm.

McKiernan a spol. [28] studovali kationtové dvojvrstvy DPTAP a DMTAP pomocí fluorescenční spektroskopie a AFM (mikroskopie atomárních sil). Jako fluorescenční sonda byl použit NDB (((7-nitro-2-(1, 3-benzoxadiazol-4-yl)-amino)caproyl) phospholipid. Malé unilamelární lipidové měchýřky byly vytvořeny pomocí ultrazvuku v prostředí vody nebo soli s přidavkem 2, 3, 5, nebo 0 % mol NBD-PC. Tyto vzorky byly zahřívány a ochlazovány na laboratorní teplotu. Fluorescenční snímky ukázaly, že ohřívání a ochlazování vyústilo ke zvýšení tvorby vytváření krystalů (fraktálů) u DPTAPu, zatímco DMTAP s kratším acylovým řetězcem vytvořil prodloužené trojúhelníkové domény. Bylo také prokázáno, že rostoucí koncentrace sondy má vliv na morfologii lipidové dvojvrstvy. Při 2 % DNB – PC byly domény větší, při obsahu 3 a 5 % došlo k jejich zmenšování.

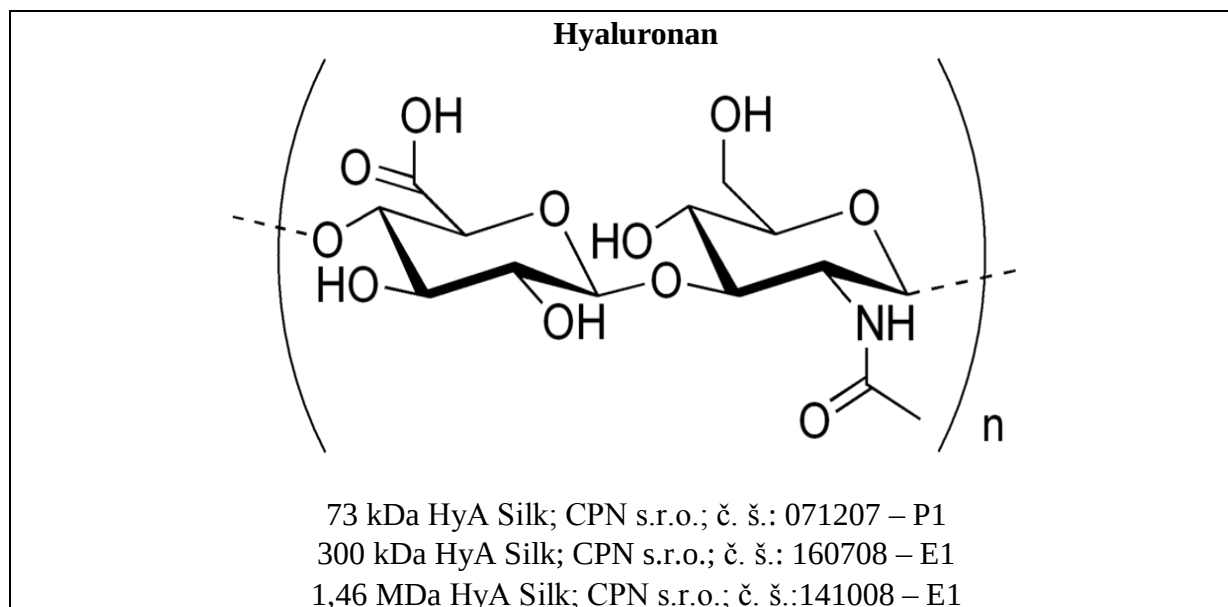
Tetradecylfosfocholin je strukturní analog myristoylu lysofosfatidylcholinu, který je stabilnější a nepodléhá tolik hydrolytickému štěpení. TPC je často používán jako prostředek pro proteinovou solubilizaci a byl použit jako nosič pro *in vivo* a *in vitro* genovou terapii a byly prokázány protinádorové účinky [30].

Zeisig a spol. [31] se zabývali ve svém výzkumu vlivem alkylfosfolipidové membrány (APLs) na přenos genů *in vivo* a *in vitro* pomocí „*LacZ reporter gene*“ a cytosinové deaminázy (CD). Lipoplexy tvořené z tetradecylphosphocholine / dimethyldioctadecylamine / cholesterol / diolelyphosphoethanolamine byly vybrány jako zprostředkovatelé transfekce. Bylo zjištěno, že tyto komplexy z alkylfosfolipidů zvyšují účinnost při přenosu genů v genové terapii.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

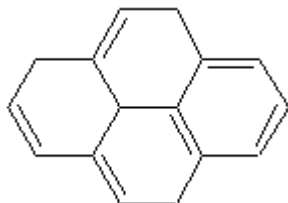
4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Polysacharidy



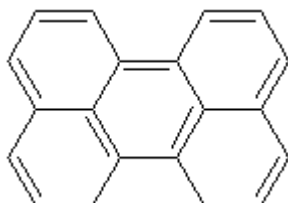
4.1.2 Fluorescenční sondy

Pyren C₆H₁₀



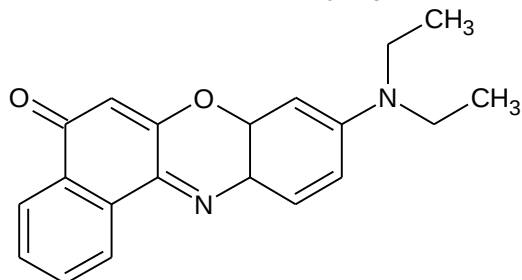
Mr = 202,25 CAS: 129-00-0 č. š.: 430166/1 Fluka, čistota ≥ 99,0 %

Perylen C₂₀H₁₂



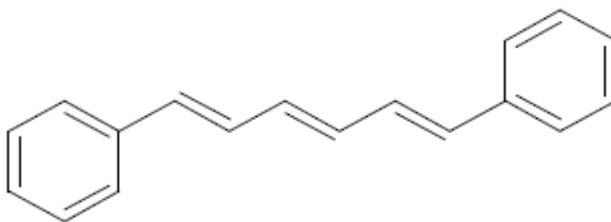
Mr = 252,31 CAS: 198-55-0 č. š.: 384079/1 Fluka, čistota ≥ 99,0 %

Nilská červen C₂₀H₁₈N₂O₂



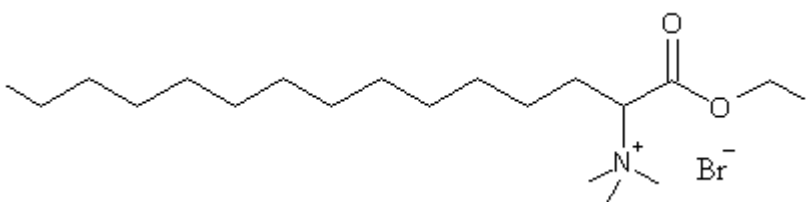
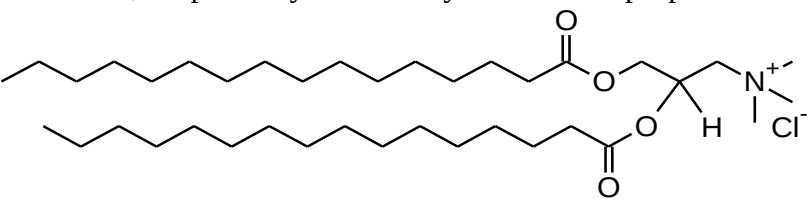
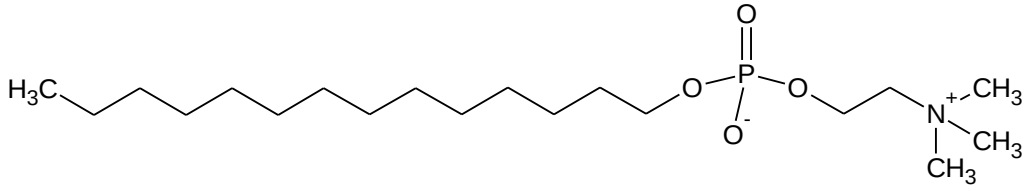
Mr = 318,37 CAS: 7385-67-3 č. š.: 1381469 BioChemika, čistota ≥ 98%

1,6-difenylohexa-1,3,5-trien (DPH)



Mr = 232,32 č. š.: 1054132 Sigma Aldrich, čistota 98 %

4.1.3 Tenzidy

Septonex C₂₁H₄₄BrNO₂ [1-(ethoxykarbonyl)pentadecyl] trimethylamoniumbromid  Mr = 422,48 CAS 10567-02-9 č. š.: 910SEP002 GNB Chem, a.s.
16:0 TAP C₃₈H₇₆NO₄Cl 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propan  Mr = 646,467 CAS 139984-36-4 č. š.: 160TAP-28, Avanti Polar Lipids, Inc.
TPC C₁₉H₄₂NO₄P tetradecylfosfocholin  Mr = 379,515 CAS 77733-28-9 č.š.: 140CP-10, Avanti Polar Lipids, Inc.

4.1.4 Další chemikálie

Aceton CH₃COCH₃ Mr = 58,08 CAS: 67-64-1 Lachner s.r.o., p.a., Ultra ≥ 99,5 %
Chlorid sodný NaCl Mr = 58,44 CAS 7647-14-5 č. š.: 06278, Lachner s.r.o.
Dihydrogenfosforečnan sodný NaH₂PO₄ Mr = 137,99 CAS 7558-80-7 č. š.: 00261, Lachner s.r.o.
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného – Na₂HPO₄·12H₂O Mr = 358,14 CAS 10039-32-4 č. š.: 0,6156, Lachner s.r.o.
Chloroform CHCl₃ Mr = 119,378 CAS 67-66-3
Voda H₂O deionizovaná voda systémem Milli – Q, Academic, Millipore, Inc.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Zásobní roztoky fluorescenčních sond

Zásobní roztoky použitých fluorescenčních sond byly připraveny v acetonu v rozmezí koncentrací 10^{-4} až 10^{-2} M a byly uchovány v chladu.

4.2.2 Zásobní roztok pufru PBS

Fosfátový pufr PBS o pH 7,4 byl připraven navážením 2,83 g hydrogenfosforečnanu draselného; 0,19 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 8 g chloridu sodného a doplněním vodou do 1000 ml.

4.2.3 Zásobní roztoky HyA

Potřebné množství hyaluronanu bylo naváženo na analytických vahách a doplněno cca na 70-80 ml a pro lepší rozpuštění byl tento roztok umístěn na pár hodin, případně do druhého dne na magnetickou míchačku. Po dokonalém rozpuštění byl doplněn objem na 100 ml vodou.

4.2.4 Zásobní roztoky tenzidů

Po rozpuštění potřebné navážky byl roztok tenzidu kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku na výsledný objem 100 ml. Takto připravený zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

4.2.5 Příprava vzorků

Byla připravena koncentrační řada, která zahrnovala koncentraci tenzidu minimálně přes tři řády. Koncentrační řada obsahovala cca 18 vzorků. Do vialek bylo napipetováno adekvátní množství fluorescenční sondy tak, aby koncentrace ve výsledném vzorku byla řádově 10^{-6} M a bylo odpařeno rozpouštědlo. Dále bylo do vialek pipetováno určité množství zásobního roztoku tenzidu a doplněno na výsledný objem 4-5 ml. Vzorky s HyA byly připravovány tak, aby výsledná koncentrace HyA ve vialce byla 1 g/l. Vzorky se vždy nechaly třepat na třepačce do druhého dne a následně byly změřeny na spektrofleurimetru.

4.2.6 Měření

Pro stanovení agregačního chování byla zvolena fluorescenční spektroskopie. Všechny připravené koncentrační řady byly proměřeny na luminiscenčním spektrometru AMINCO Bowman Series 2. Polychromatické záření z primárního zdroje (xenonová vysokotlaká výbojka) prochází přes mřížkový monochromátor (Czerny – Turner), kde dojde k vybrání paprsku o požadované vlnové délce λ . Tento paprsek dále prochází křemennou kyvetou se vzorkem, ležícím v optické dráze paprsku. Tím dojde k excitaci elektronů ve vzorku. Fluorescence je měřena kolmo k primárnímu paprsku, proto je druhý monochromátor (emisní) umístěn kolmo ke vzorku. Pomocí detektoru (fotonásobič, fotodioda) je měřena intenzita fluorescence.

4.2.6.1 Nastavení přístroje

Podle vybrané fluorescenční sondy byly nastaveny excitační a emisní monochromátory podle následující tabulky. Rychlost skenu byla nastavena na 5 nm/s a šířka štěrbin 4/4.

Tab. 1 Nastavení spektrofluorimetru

	pyren	nilská červeň	perylene
excitace/emi	336/392	560/630	410/440
se	nm	nm	nm
excitační	300 – 350	–	–
sken	nm		
emisní sken	360 – 540	580 – 700	430 – 600
	nm	nm	nm

4.2.6.2 Stanovení CMC Septonexu ve vodě; 0,15 M NaCl a pufru PBS

Nejprve byla navrhována koncentrační řada Septonexu v rozmezí koncentrací $5 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-3}$ M. Řada byla navržena tak, aby předpokládaná CMC byla přibližně v polovině koncentrační řady. Vzorky byly namíchány podle bodu 4.2.5 a 4.2.6. Koncentrační řada byla vždy namíchána třikrát, aby byly určeny chybové úsečky při vyhodnocování naměřených dat. Jako fluorescenční sondy byly použity pyren, perylen a nilská červeň. Nastavení monochromátorů přístroje podle bodu 4.2.7.1.

4.2.6.3 Zjišťování agregačního chování Septonexu a HyA ve vodě

Pro měření byla použita stejná koncentrační řada, která byla upravena o přídavek roztoku hyaluronanu tak, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla 1g/l. Pro měření byl vybrán nativní hyaluronan 300 kDa.

4.2.6.4 Stanovení CMC tetradecylfosfocholinu TPC

Navržená koncentrační řada TPC o 16 vzorcích byla namíchána v rozmezí koncentrací $1,5 \cdot 10^{-3} - 0,3$ M. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen, který je vhodný pro stanovení CMC a agregačního chování tenzidů.

4.2.6.5 Stanovení agregačního chování TPC a HyA ve vodě a 0,15 M NaCl

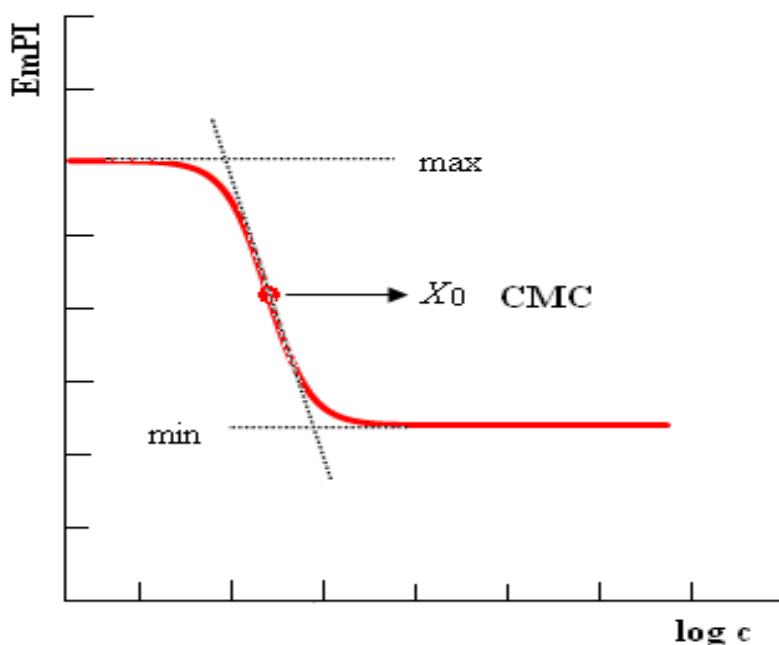
Byly vybrány tři typy nativního hyaluronanu – 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa. Vzorky byly proměřeny ve vodném prostředí a poté byla upravena iontová síla přidáním 111 μ l nasyceného roztoku NaCl (o koncentraci 5,4 M). Vzorky s upravenou iontovou silou se nechaly po dobu 24 hodin třepat na třepačce a následně byly změřeny. Použitá fluorescenční sonda byl opět perylen.

4.2.6.6 Měření anizotropie

Pro studium chování hyaluronanu s TPC bylo provedeno měření anizotropie na přístroji FLUOROCUBE. Jako fluorescenční sonda byl použit DPH a vzorky obsahovaly konstantní koncentraci TPC 0,26 mM s měnící se koncentrací hyaluronanu. Pro měření byl vybrán nativní hyaluronan o molární molekulové hmotnosti 73 kDa a 1,46 MDa. Nastavení přístroje bylo následující: excitace 385 nm a emise 450 nm.

4.2.7 Vyhodnocení dat

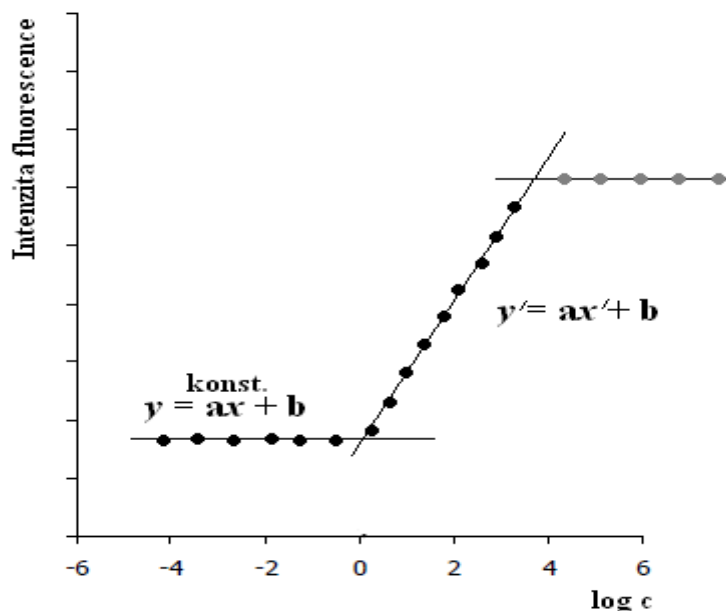
Pro stanovení kritické micelární koncentrace existuje mnoho způsobů, vždy však záleží na použité fluorescenční sondě, protože každá sonda má svá specifika. Jak již bylo zmíněno v bodě 2.2.4.1, pro vyhodnocení naměřených dat s pyrenem se nejčastěji využívá jeho emisního spektra. Do grafické závislosti se vynáší hodnota $EmPI$, což je poměr intenzit fluorescence při vlnových délkách 373 nm a 382 nm. Tento poměr se vynáší v závislosti na logaritmu koncentrace tenzidu. Výsledná závislost vykazující sigmoidní tvar se dá proložit v programu Origin Boltzmanovou S – křivkou, jejíž tvar je popsán rovnicí 4.



Obr. 12 Proložení dat sigmoidní křivkou a stanovení hodnoty CMC

Stanovení kritické micelární koncentrace pro perylen a nilskou červeň je jednodušší a pro obě sondy velice podobné. Naměřená data mají jedno případně dvouzlomový charakter. Konstantní nebo jen nepatrná rostoucí část odpovídá oblasti před CMC a intenzita fluorescence je minimální. Strmě rostoucí část vykazuje oblast nad CMC a je lineární.

V některých případech dochází k dalšímu zlomu, který je opět konstantní a vykazuje oblast dosažení maxima fluorescence v důsledku úplného rozpuštění sondy do systému [12]. Proložení konstantní a lineární části přímkami dostaneme jejich průsečík, který odpovídá výsledné hodnotě CMC. Do grafické závislosti se může vynášet intenzita fluorescence nebo totální integrál.



Obr. 13 Ideální závislost intenzity fluorescence na logaritmu koncentrace pro vyhodnocení dat s nilskou červení a perylenem

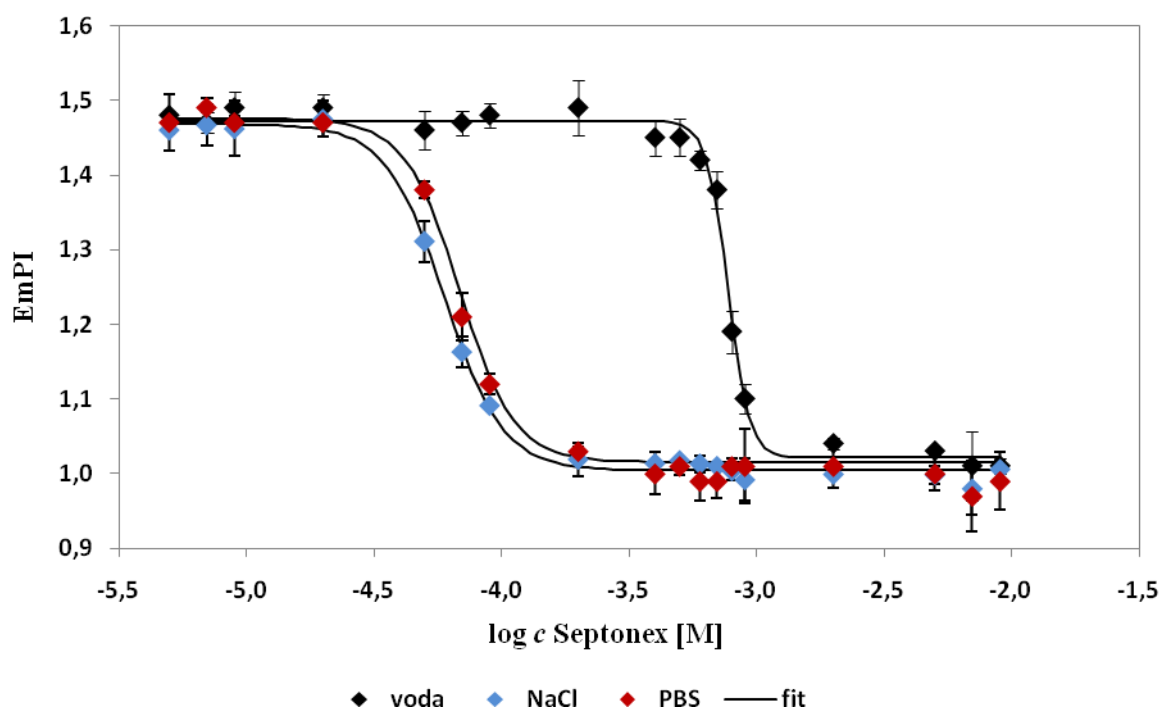
Každé měření bylo prováděno třikrát. Výsledné grafy v této práci jsou vyhodnoceny z průměrných hodnot těchto měření. Ke všem měřením byla v programu MS EXCEL použita funkce SMODCH, ke stanovení směrodatné odchylky měření. V grafech jsou směrodatné odchylky znázorněny chybovými úsečkami.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro lepší pochopení agregačního chování Septonexu byly nejprve zjišťovány hodnoty kritické micelární koncentrace ve vodě a dvou fyziologických roztocích 0,15 M NaCl a pufru PBS o výsledném $\text{pH} = 7,44 \pm 0,01$ bez přídavku hyaluronanu za použití tří různých fluorescenčních sond.

5.1 Výsledky měření Septonexu

5.1.1 Stanovení CMC s pyrenem



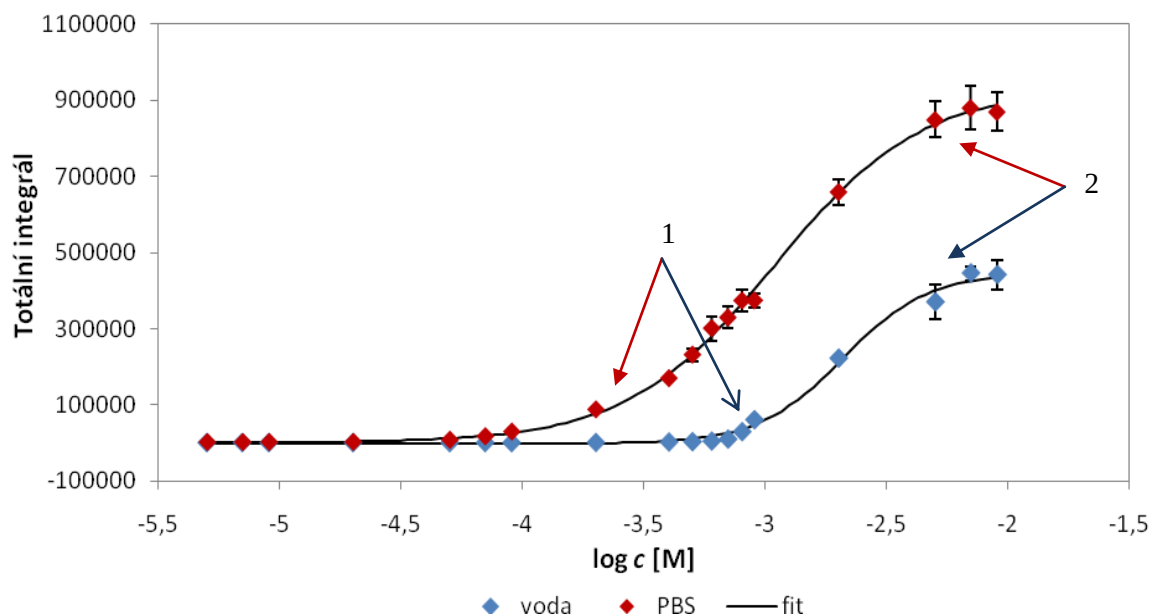
Obr. 14 Závislost $EmPI$ pyrenu na logaritmu koncentrace Septonexu v prostředí vody, NaCl a PBS. Závislosti jsou proloženy Boltmanovou křivkou

Do grafické závislosti (Obr. 14) byl vynesén poměr $EmPI$ na logaritmu koncentrace Septonexu ve třech zvolených prostředích. Výsledky vykazují typické sigmoidní křivky, ze kterých lze odvodit hodnotu kritické micelární koncentrace. Jak je vidět, hodnota CMC je ve vodném prostředí řádově vyšší než v NaCl a pufru PBS. Měřením bylo prokázáno, že fyziologické prostředí snižuje hodnotu kritické micelární koncentrace tenzidu.

Tab. 2: Zjištěné hodnoty CMC Septonexu v různých prostředích

prostředí	CMC [mM]
voda	$0,775 \pm 0,008$
0,15 M NaCl	$0,060 \pm 0,018$
pufr PBS	$0,068 \pm 0,018$

5.1.2 Stanovení CMC s perylenem



Obr. 15 Srovnání průběhu měření CMC Septonexu v prostředí vody a pufru PBS s perylenem jako fluorescenční sondou. Šípkami jsou vyznačeny zlomy 1 a 2.

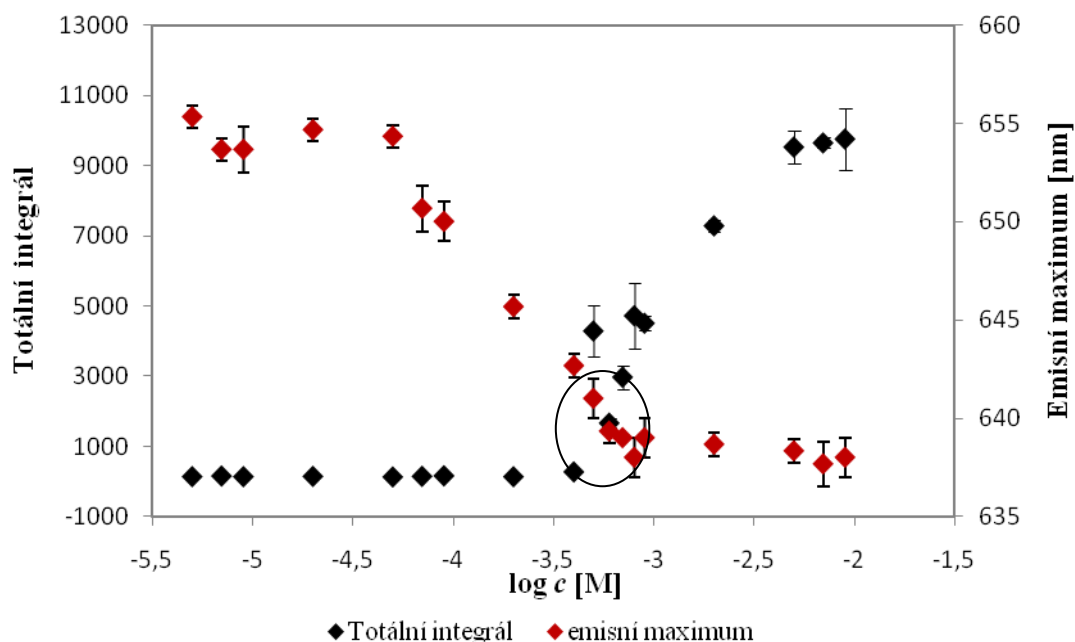
Pro lepší vyhodnocení dat byla do grafu (Obr.15) vynesena závislost totálního integrálu fluorescence perylenu na logaritmu koncentrace Septonexu. Měření bylo provedeno i v prostředí 0,15 M NaCl, vykazující stejný průběh jako v prostředí pufru PBS a pro lepší přehlednost nebylo zahrnuto do grafu. Výsledné hodnoty CMC jsou uvedeny v Tab. 3. Nulové hodnoty intenzity fluorescence odpovídají hodnotám koncentrace před CMC, za hodnotou CMC dochází ke zvýšení intenzity fluorescence. Výsledné křivky vykazují dvouzlomový charakter, výsledná data lze proložit sigmoidní křivkou. Zlom 1 odpovídá tvorbě micel a proložením konstantní a lineární části získáme hodnotu kritické micelární koncentrace. Zlom 2 nastává při vyšších koncentracích tenzidu a dochází pravděpodobně k úplné solubilizaci sondy do systému.

Tab. 3: Zjištěné hodnoty CMC Septonexu pro různá prostředí

prostředí	CMC [mM]
voda	$3,661 \pm 0,062$
0,15 M NaCl	$0,747 \pm 0,065$
pufr PBS	$0,932 \pm 0,057$

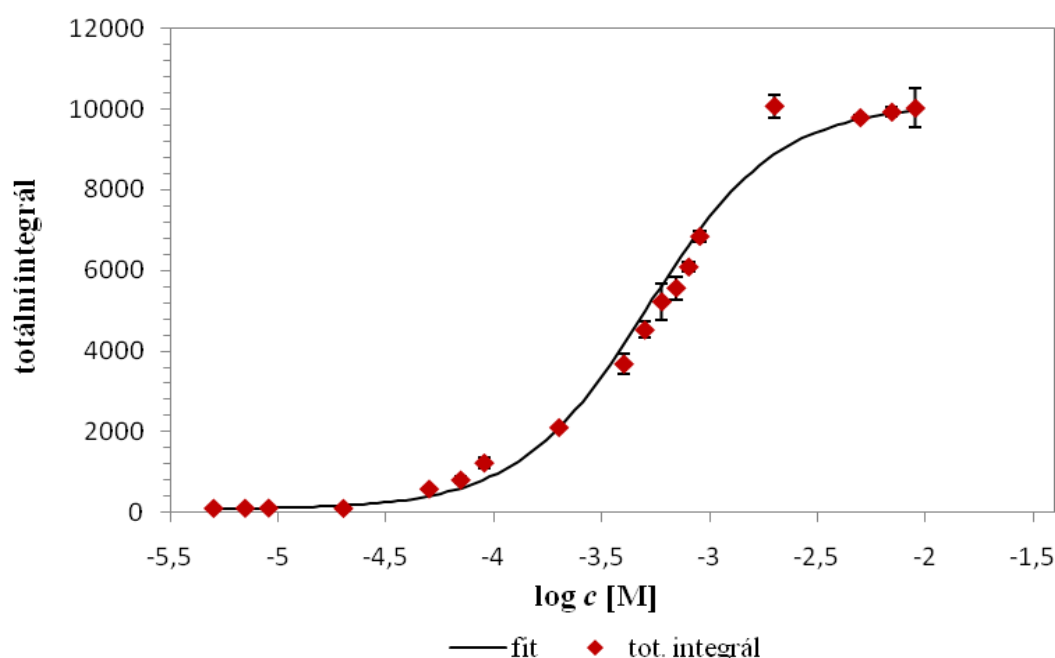
Z tabulky je opět patrné, že fyziologické prostředí snižuje hodnotu kritické micelární koncentrace Septonexu

5.1.3 Stanovení CMC s nilskou červení



Obr. 16 Závislost totálního integrálu a emisního maxima na logaritmu koncentrace Septonexu s nilskou červení jako fluorescenční sondou ve vodném prostředí. V grafu je vyznačena oblast začátku tvorby micel.

Výsledky měření s použitím nilské červeně mají shodný průběh jako měření s perylenem. Měření bylo provedeno ve třech prostředích – voda, NaCl, pufr. Opět se potvrdil trend snížení kritické micelární koncentrace v prostředí NaCl a pufru oproti vodnému prostředí. V grafu je vynesena i závislost na emisním maximu nilské červeně. Při nízkých koncentracích tenzidu se emisní maximum pohybuje okolo 655 – 645 nm. Tato oblast vykazuje polární prostředí a intenzita fluorescence je zde minimální (nulová). Při zvyšující se koncentraci tenzidu dochází k poklesu emisního maxima až k 637 nm a dochází ke zvýšení intenzity fluorescence vlivem tvorby micel a tudíž snižování polaroty prostředí. První zlom je označen v grafu kolečkem a odpovídá hodnotě kritické micelární koncentrace.



Obr. 17 *Průběh závislosti totálního integrálu na logaritmu koncentrace Septonexu v prostředí 0,15 M NaCl s nilskou červení*

V prostředí NaCl dochází ke snížení hodnoty kritické micelární koncentrace Septonexu. Oproti vodnému prostředí dochází k lepšímu pozorování druhého zlomu. Jak je vidět, data lze proložit sigmoidní křivkou, ale důležitou roli hraje první zlom, který odpovídá kritické micelární koncentraci.

Tab. 4: *Zjištěné hodnoty CMC Septonexu v různých prostředích*

prostředí	CMC [mM]
voda	$1,072 \pm 0,018$
0,15 M NaCl	$0,518 \pm 0,017$
pufr PBS	$0,827 \pm 0,059$

Výsledky stanovení CMC Septonexu třemi různými sondami ukazují, že je nutné zvážit charakteristické body – zlomy, jednotlivých naměřených závislostí, ze kterých se odečítá výsledná hodnota CMC. Dále je nutno brát v úvahu metodu stanovení použité sondy – možné příčiny, které vedou ke změnám jejich fluorescenčních charakteristik. V případě měření Septonexu by bylo dosaženo konzistentních výsledků s pyrenovou metodou u perylenu – jako charakteristický bod vezmeme bod od začátku růstu intenzity fluorescence a u nilské červeně (emisního maxima) určíme-li charakteristickým bodem koncentraci, od které se poloha emisního maxima prakticky nemění.

5.1.4 Studium agregace Septonexu s hyaluronanem ve vodě

Pro měření vlivu hyaluronanu na agregační chování Septonexu byl vybrán nativní hyaluronan o molární molekulové hmotnosti 300 kDa a jeho výsledná koncentrace ve vzorcích byla 1 g/l, což odpovídá koncentraci hyaluronanu v lidském těle. Pro upravenou koncentrační řadu Septonexu byla použita jako fluorescenční sonda pyren. Při vyšších koncentracích se začaly vytvářet bílé sraženiny a zákal. Pro lepší vizuální pozorování byly vzorky namíchány s nilskou červení. Vizuální pozorování je shrnuto v Tab. 5. Díky přítomnosti sraženin tyto vzorky nebyly proměřeny na spektrofotometru.

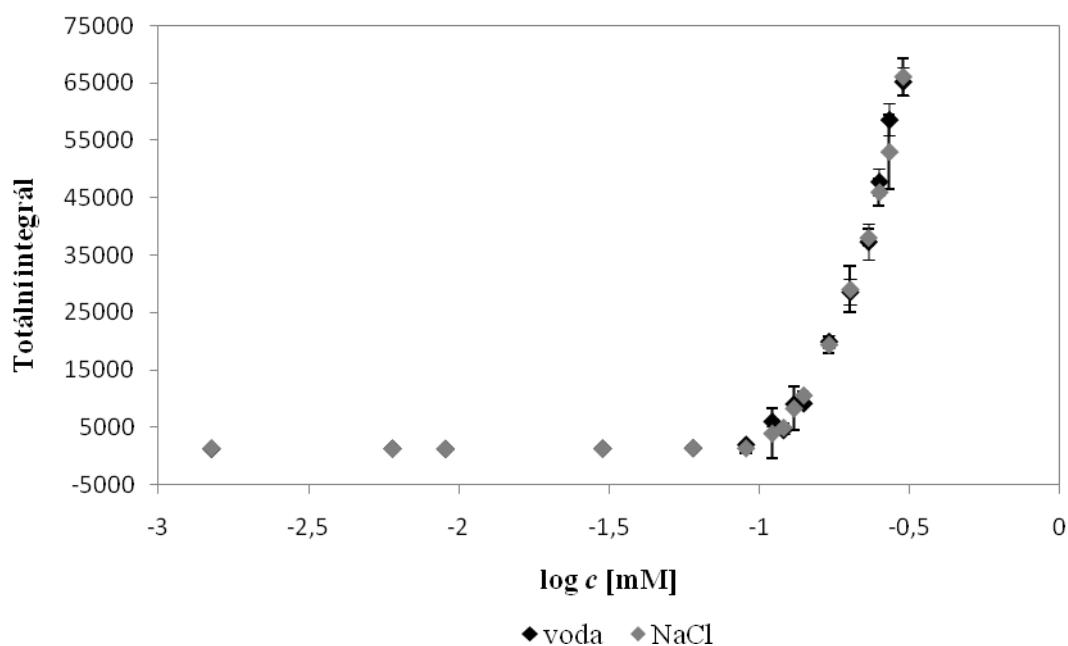
Tab. 5: *Vizuální pozorování vzorků Septonexu ve vodě s 300 kDa HyA (1g/l)*

vzorek	koncentrace [mM]	pozorování	
		pyren	nilská červen
1 – 7	0,005 – 0,009	čiré	čiré
8 – 15	0,2 – 2,0	bez zákalu/ bílá sraženina	růžový lem/bílé sraženiny/bez zákalu
16 – 18	5,0 – 9,0	zákal/ bílá sraženina	zákal/sraženiny

5.2 Výsledky měření TPC

5.2.1 Stanovení CMC tetradecylfosfocholinu ve vodě a NaCl

Předpokládaná hodnota CMC tohoto tenzidu nesoucího kladný i záporný náboj je podle vyrábějící firmy *Avanti Polar Lipids, Inc.* 0,12 mM. Pro ověření této hodnoty byla navrhnutá koncentrační řada. Měření CMC bylo provedeno ve vodě a 0,15 M NaCl, jako fluorescenční sonda byl vybrán perylen.



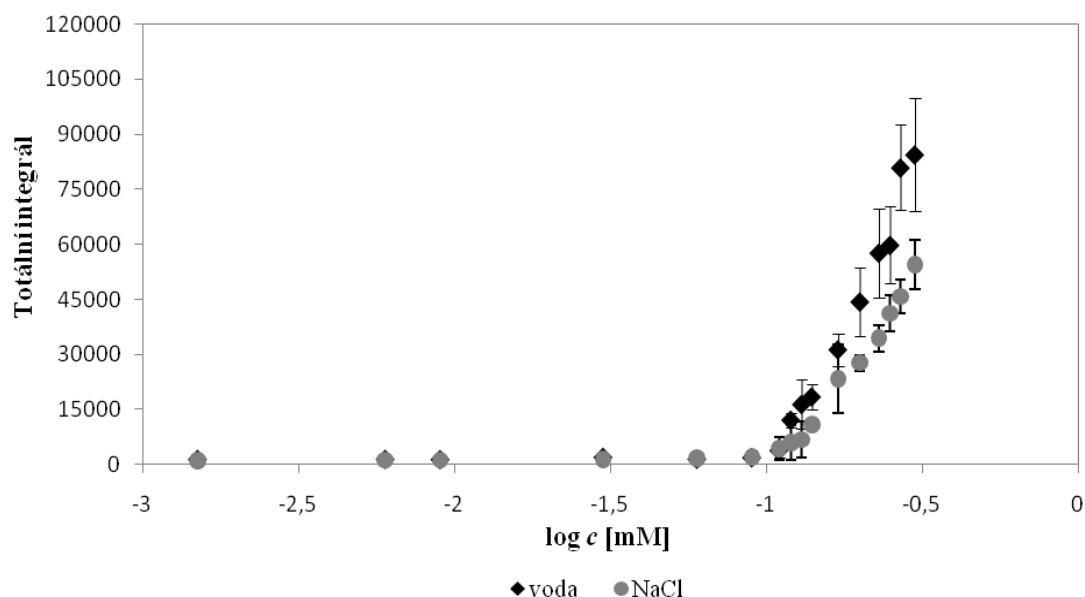
Obr. 18 Závislost totálního integrálu intenzity fluorescence na logaritmu koncentrace TPC ve vodném prostředí a NaCl bez HyA s perylenem

Naměřená data vykazují pouze jednozlomový charakter, proložením konstantní a lineární části byla vypočtena hodnota CMC, která je shodná s předpokládanou CMC. Hodnoty kritických micelárních koncentrací v obou proměřených prostředích se od sebe neliší, což může být způsobeno obojetným nábojem tenzidu TPC a tudíž upravená iontová síla nemá na hodnotu kritické micelární koncentrace vliv.

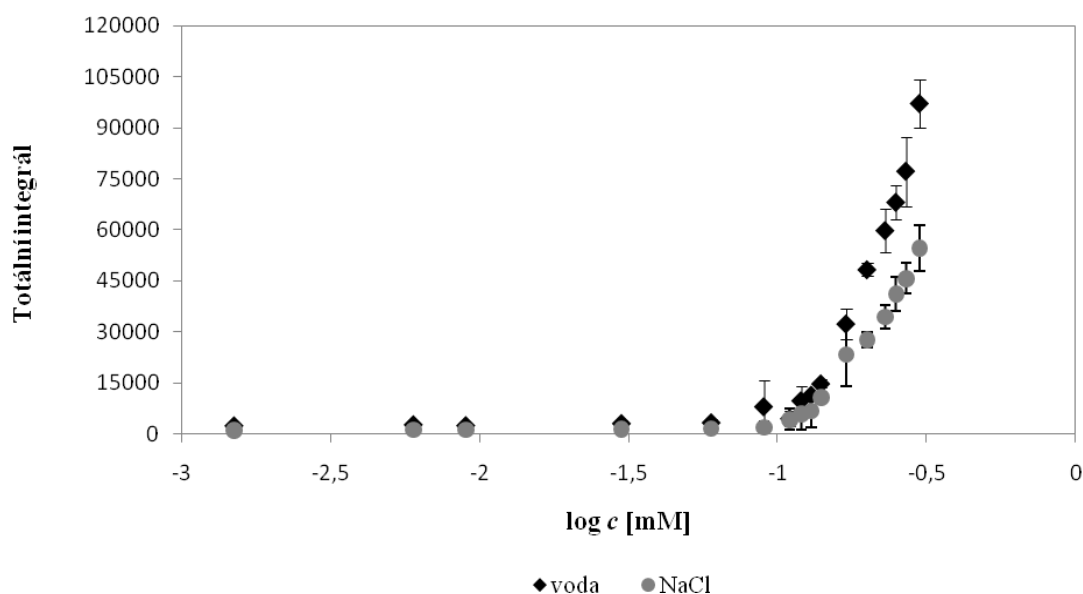
Tab. 6: Naměřené hodnoty CMC tetradecylfosfocholinu

prostředí	CMC [mM]
voda	$0,117 \pm 0,003$
0,15 M NaCl	$0,120 \pm 0,002$

5.2.2 Agregační chování systému TPC – hyaluronan

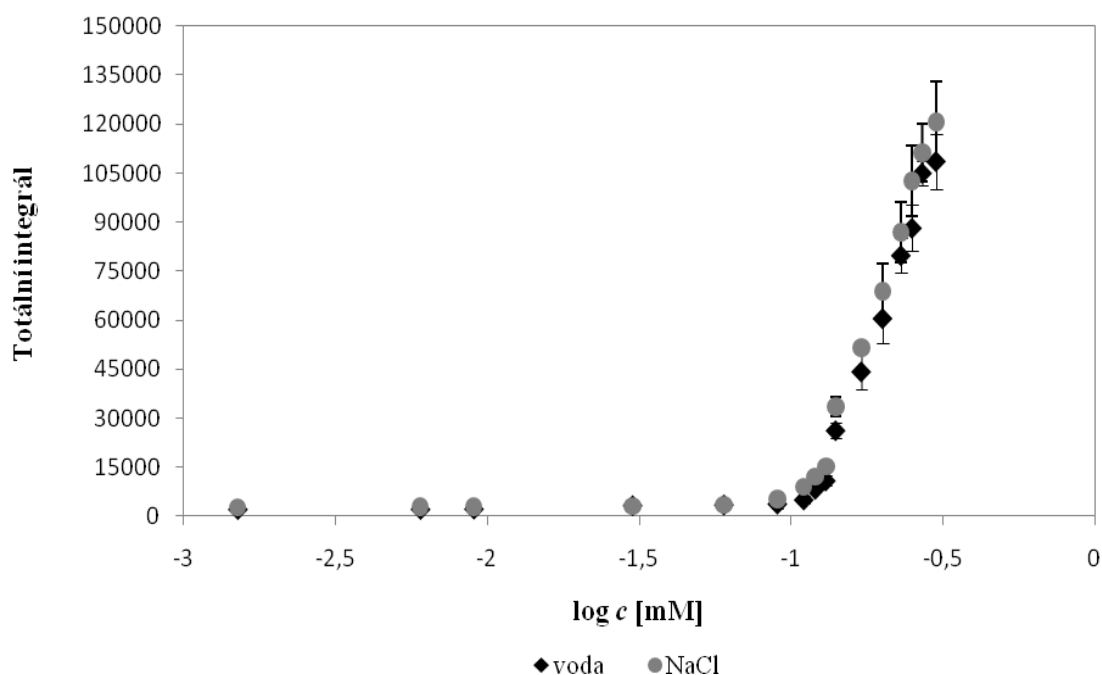


Obr. 19 Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace TPC s 73 kDa HyA ve vodném prostředí a NaCl s perylenem



Obr. 20 Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace TPC s 300 kDa HyA ve vodném prostředí a NaCl s perylenem

Roztoky hyaluronanu o molární molekulové hmotnosti 73 kDa a 300 kDa nejsou samy o sobě moc viskózní a přidavek těchto hyaluronanů k TPC nezpůsobil žádnou změnu v chování. Hodnota CMC zůstala stejná jak v prostředí vody, tak v prostředí NaCl. Jedinou změnu, kterou můžeme sledovat po změně iontové síly, je snížení intenzity fluorescence v prostředí NaCl.

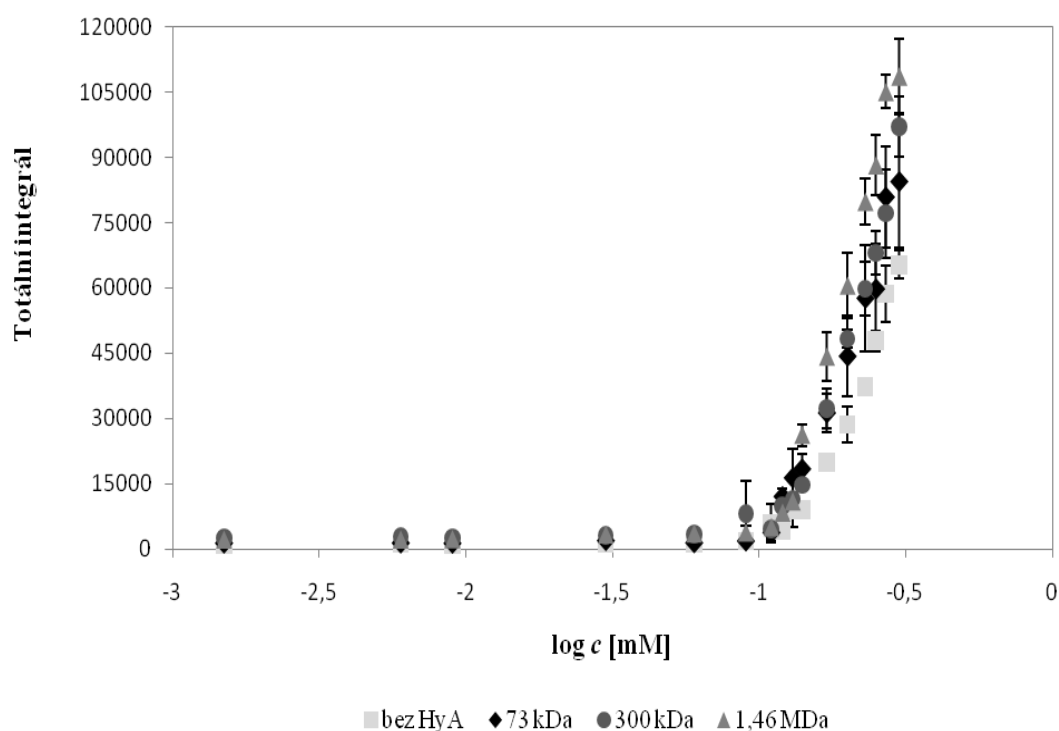


Obr. 21 Závislost *totálního integrálu perylenu* na *logaritmu koncentrace TPC s 1,46 MDa HyA v prostředí vody a NaCl*

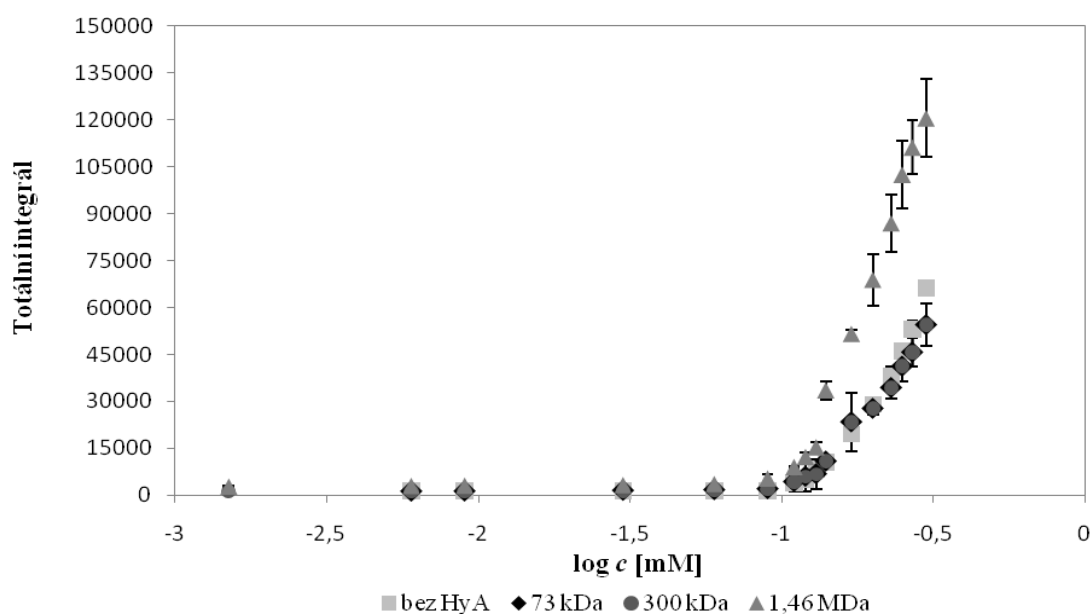
Přídavek 1,46 MDa HyA k tenzidu TPC opět nezpůsobilo žádnou změnu v hodnotě CMC. Těmito měřeními bylo zjištěno, že nezávisí na molární molekulové hmotnosti hyaluronanu ani na zvoleném prostředí. Podle výsledku je patrné, že tenzid TPC pravděpodobně s hyaluronanem nemá ochotu reagovat. Toto chování je asi způsobeno amfoterním charakterem, na rozdíl od látek, které mohou oddisociovat některý z protiiontů. Záporný náboj TPC pravděpodobně brání interakcím s anionaktivním polymerem hyaluronanu.

Tab 7: *Výsledky měření TPC v různých prostředích*

prostředí	voda	0,15 M NaCl
	CMC[mM]	CMC [mM]
bez HyA	0,117 ± 0,003	0,120 ± 0,002
73 kDa	0,107 ± 0,009	0,106 ± 0,005
300 kDa	0,116 ± 0,006	0,106 ± 0,001
1,46 MDa	0,114 ± 0,001	0,111 ± 0,002



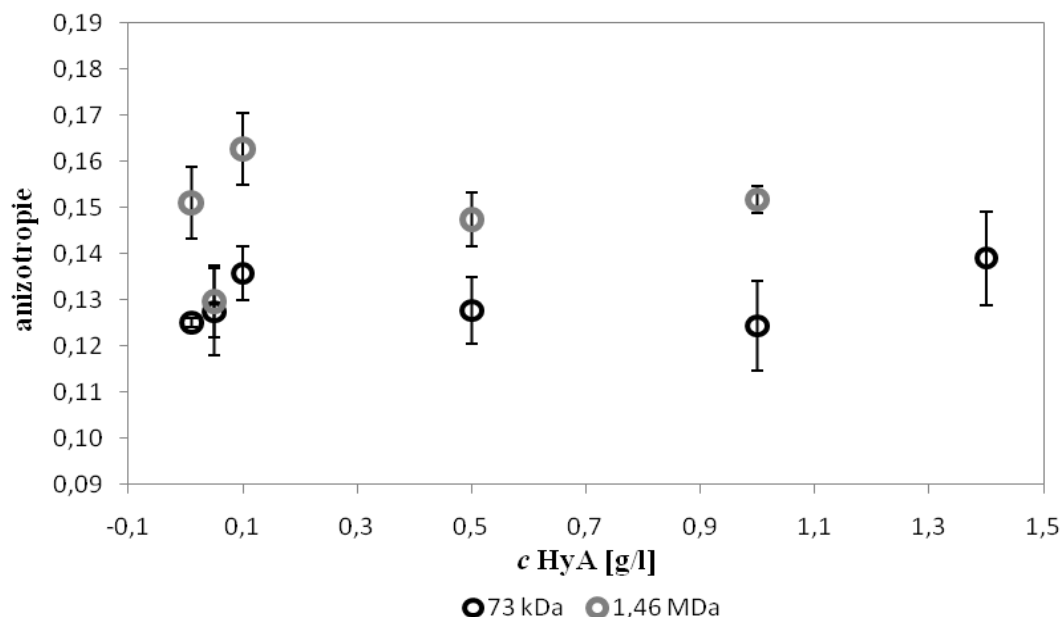
Obr. 22 Srovnání vlivu molární molekulové hmotnosti hyaluronanu na agregační chování TPC ve vodném prostředí s perylenem



Obr. 23 Srovnání vlivu molární molekulové hmotnosti hyaluronanu na agregační chování TPC v prostředí NaCl s perylenem

Na Obr. 22 a Obr. 23 je viditelné, že opravdu nedochází ke změnám chování tenzidu TPC v závislosti na rostoucí molární molekulové hmotnosti hyaluronanu. Na Obr 23 se pouze odlišuje intenzita fluorescence při 1,46 MDa hyaluronanu, která je o něco větší než v ostatních případech.

5.2.3 Měření anizotropie



Obr. 24 Závislost anizotropie na měnící se koncentraci hyaluronanu s konstantní koncentrací tenzidu TPC v prostředí Milli Q s DPH jako fluorescenční sondou

Měření anizotropie bylo vybráno pro studium mikroviskozity systému hyaluronan – TPC. Koncentrace TPC byla konstantní – 0,26 mM (což je hodnota nad kritickou micelární koncentrací) a koncentrace HyA se pohybovala v rozmezí 0,01 – 1 g/l, respektive 1,4 g/l pro HyA 73 kDa. Naměřené anizotropie se v závislosti s rostoucí koncentrací hyaluronanu téměř nemění, dochází jen k nepatrnému růstu anizotropie, viz. Obr. 24.

5.3 Výsledky měření DPTAPu

Bylo zjištěno, že kationaktivní tenzid DPTAP je nerozpustný ve vodě a proto nemohla být navržená koncentrační řada namíchána klasickým postupem jako u předchozích použitých tenzidů. Literatura uvádí, že kritická micelární koncentrace se pohybuje okolo 0,07 mM [32]. DPTAP je rozpustný v chloroformu, ale chloroform jako organické rozpouštědlo by rušil měření intenzity fluorescence. Díky neselektivnímu rozpouštění by v chloroformu pravděpodobně nedošlo k vytvoření klasických micel ale spíše reverzních.

Rozpuštěním DPTAPu v chloroformu byl připraven vzorek o celkovém objemu 10 ml a koncentraci 1 g/l. Poté bylo do vialky napipetováno malé množství tohoto vzorku a chloroform byl odpařen, na dně vialky zůstal bílý povlak tenzidu. Do těchto vialek bylo napipetováno 4 ml vody a tenzid se nerozpustil ani po vložení do ultrazvuku. Do jiných vialek bylo přidáno 1000 ml hyaluronanu o molární molekulové hmotnosti 300 kDa a 1,46 MDa a doplněno vodou na 4 ml došlo k vytvoření sraženin, které se podobaly jemným vláknům.

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium interakcí kationaktivních tenzidů s nativním hyaluronanem v různých prostředích v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu. První část práce obsahuje seznámení s použitou metodou spektrofluorimetrií, použitých fluorescenčních sond a charakteristikou tenzidů. Dále byly shromážděny literární poznatky o využití nových tenzidů TPC a DPTAP. Bylo zjištěno, že tyto tenzidy se využívají v genové terapii a připravují se z nich *polyplexy*, což jsou komplexy těchto tenzidů s DNA. Druhá část je zaměřena na zpracování výsledků měření navržené experimentální metody.

Pro studium chování kationaktivních tenzidů s hyaluronanem byly vybrány následující tenzidy – Septonex, TPC a DPTAP. Pro studium agregace Septonexu byly vybrány tři fluorescenční sondy – pyren, perylen a nilská červeň. Nejprve byla stanovena kritická micelární koncentrace Septonexu v prostředí vody, 0,15 M NaCl a pufru PBS. Naměřené hodnoty CMC těchto tří prostředí potvrdily, že fyziologické prostředí snižuje hodnotu CMC o řád oproti vodnému prostředí. Po přidání nativního hyaluronanu o molární molekulové hmotnosti 300kDa a výsledné koncentraci ve vzorcích 1 g/l došlo k vytvoření viditelných bílých sraženin. Vznik těchto sraženin je způsoben důsledkem intenzivní interakce Septonexu s opačně nabitým hyaluronanem. Tvorba sraženin se projevila při koncentraci Septonexu, která se nachází ještě před kritickou micelární koncentrací a při koncentracích vyšších, což je pro kationtové tenzidy běžné.

Druhým použitým tenzidem byl amfoterní tetradecylfosfocholin. Pro studium agregačního chování TPC bylo zvoleno prostředí vody a 0,15 M NaCl. Jako fluorescenční sonda byl použit perylen, jakožto vhodná sonda pro stanovení agregačního chování tenzidů. Dále byl zjišťován vliv rostoucí molární molekulové hmotnosti hyaluronanu. Zvolené molární molekulové hmotnosti hyaluronanu byly 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa. Měřením bylo zjištěno, že molární molekulová hmotnost ani změna iontové síly nemá vliv na kritickou micelární koncentraci TPC. Je to pravděpodobně způsobeno amfoterním charakterem TPC, který nepodporuje interakci s hyaluronanem, která by se projevila na formování hydrofobní domény. Bylo provedeno i jedno měření anizotropie s fluorescenční sondou DPH v závislosti na rostoucí koncentraci hyaluronanu. Toto měření také prokázalo, že TPC s hyaluronanem neinteraguje, nedocházelo k žádným změnám hodnot anizotropie.

Posledním tenzidem byl 1,2dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propan. Bylo zjištěno, že DPTAP je nerozpustný ve vodě a proto nemohly být namíchány vzorky stejným způsobem jako u předchozích dvou tenzidů. DPTAP se velice dobře rozpustil v chloroformu. Po odpaření organického rozpouštědla a po přidání hyaluronanu došlo k vytvoření bílých sraženin.

Výsledky této práce zatím dokazují, že z hlediska studia agregace pomocí fluorescenční spektroskopie TPC ani DPTAP nejsou vhodné pro komplexaci s hyaluronanem a případné přípravě cílených léčiv. Na provedené experimenty by měla navázat další práce, například přidání jiného tenzidu k TPC a DPTAP a tím podpořit interakci s hyaluronanem. Septonex se naopak chová jako klasický kationtový tenzid a tento systém by si zasloužil samostatnou studii.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Necas, J., Bartoskova, L., Brauner, P., Kolar, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, 53, NO. 8, s. 397-411.
- [2] Sliva, J., Minárik, J.: *Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí*. New EU Magazine of Medicine. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [3] Chen, W. Y. J., Abatangelo, G.: Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound repair and regeneration*. March – April 1999, vol. 7, NO. 2, s. 79- 89. ISSN 1067-1927.
- [4] *Celostnimedica.cz* [online]. 2004 [cit. 2011-02-04]. Informační server o zdraví. Dostupné z: < <http://www.celostnimedica.cz/kyselina-hyaluronova.htm>>.
- [5] *Kontaktní čočky.cz* [online]. 2007 [cit. 2011-02-04]. Dostupné z: <<http://www.cocky-kontakti.cz/kyselina-hyaluronova.html>>.
- [6] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155- 0- 5.
- [7] *Fluorofory v biomedicině* [online]. 2006 [cit. 2011-02-20]. Dostupné z: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>>.
- [8] Valeur, B.: *Molecular fluorescence : Principles and applications*. Wiley – VCH Verlag GmbH, 2001. 381 s. ISBN 3-527-60024-8.
- [9] Lakowicz, J.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Springer, 2006. 954 p. ISBN 0-387-31278-1.
- [10] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-X.
- [11] Sýkora, J.: Fluorescenční mikroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie jako nástroje pro měření velikosti a pohyblivosti nanočástic. *Sborník akce student 7777, Praha 23.8. – 29.8.2009*. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., 2009. s.20-22.
- [12] Mravec, F.: *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu koloidních a asociativních systémů*. Brno 2006. 26 s.
- [13] Bareš, M.,Zajíc, J.: *Chemie a technologie tensidů a detergentů*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1982. s. 270. ISBN 440-3332.
- [14] Holmberg, K., Jonsson, B., Kronberg, B., Lindman, B.: *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2002. 545 p. ISBN 0-471-49883-1.
- [15] *Kritická micelární koncentrace* [online]. [cit. 2011-02-20]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es001/hesla/kriticka_micelarni_koncentrace.html>.
- [16] Müller, L.: *Přesné měření kritické micelární koncentrace tenzidů a její využití v kapilární elektroforéze*. [on line]. [cit. 2011-18-02]. Dostupné z: <<http://kalch.upce.cz/merck2003/pdf/9.pdf>>.
- [17] Bartovká, L.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. 2000 [cit. 2011-02-20]. Dostupné na www: <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/N403016.html>.

- [18] Donner, M., Bouchy, M., Viriot, M., André, J.: *Spectrofluorimetric methods for the measurement of the so called "Microviscosity" of lipidic structures*. Biochemie, 1981, vol. 63, pp. 961-965
- [19] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. [on line] 2010 [cit. 2011-16-02] Dostupné z: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>>.
- [20] Dissertations – University of Groningen [on line] 2006 [cit. 2011-01-03] *Gene delivery with cationic lipids : fundamentals and potencial applications*. Dostupné z: <http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2006/l.b.wasungu/01_c1.pdf>
- [21] Oficiální výukové stránky Univerzity Palackého v Olomouci <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/7.pdf>
- [22] Pedroso de Lima, M.C., Simões, S. et al.: Cationic lipid – DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv drug deliv.* vol. 47, pp.277-294.
- [23] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *Journal of Physical Chemistry*, 1989, vol. 93, pp 1478-1483.
- [24] Lendemans, D.G., Egert, A.M., Hook ,S., Rades ,T.: Cage-like complexes formed by DOTAP, Quil-A and cholesterol, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, vol. 332, pp.192-195.
- [25] Labbé, J. F., Cronier, F., Gaudreault, R.C., , Auger, M.: Spectroscopic characterization of DMPC/DOTAP cationic liposomes and their interactions with DNA and drugs, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2009, vol. 158, pp. 91-101.
- [26] Regelin, A.E., Fankhaenel, S. et al.: Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, vol. 1464, pp. 151-164.
- [27] Yuguo, L., Rahim, M., Quinn, N., Segura, T.: Hyaluronic acid and fibrin hydrogels with concentrated DNA/PEI polyplexes for local gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2011. 6 p.
- [28] McKiernan, A. E., Ratto, T. V., Longo, M. L.: Domain Growth, Shapes, and Topology in Cationic Lipid Bilayers on Mica by Fluorescence and Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*, vol. 79, pp. 2605-2615.
- [29] Nchinda, G., Überla, K., Zschörnig, O.: Characterization of cationic lipid DNA transfection complexes differing in susceptibility to serum inhibition, *BMC Biotechnology*, 2002, 10 p. Dostupné na www: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/12>.
- [30] Avanti Polar Lipids, Inc. [on line] 1999. [cit. 2011-02-04] Dostupné z: <http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=2204&Itemid=191&catnumber=850338>.
- [31] Zeisig, R., Ress, A., Fichtner, I., Walther, W.: Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy, 2003, vol. 10, pp. 302-311.
- [32] Dalvi-Malhotra, J., Chen, L.: Enhanced Conjugated Polymer Fluorescence Quenching by Dipyrindinium-Based Quenchers in the Presence of Surfactant, *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, pp. 3873-3878.

8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

λ	vlnová délka
S_0	základní stav
S_1	první excitovaný singletový stav
S_2	druhý excitovaný singletový stav
T_1	první excitovaný tripletový stav
HyA	kyselina hyaluronová
Mr	molární molekulová hmotnost
Da	jednotka molární molekulové hmotnosti, používaná v biochemii, 1 Da odpovídá 1g/mol
CMC	kritická micelární koncentrace
PAL	povrchově aktivní látky
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření
PAL	povrchově aktivní látka
TPC	tetradecylfosfocholin
DOTAP	1,2-dipalmitoyl-3-trimetylammonium-propan
DPTAP	1,2-dipalmitoyl-3-trimetylammonium-propan
DMTAP	1,2-dimyristoyl-3-trimetylammonium-propan
DSTAP	1,2-distearyl-3-metylammonium-propan
DLTAP	1,2-dioleoyloxy-3-metylammonium-propan
DOPE	dioleoylfosfatidyletanolamin
DDAB	didecyldimetylammonium bromid

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 *Vybrané vzorky Septonexu s 300 kDa HyA, kdy se tvoří mléčný zákal a sraženiny. Výsledná koncentrace HyA ve vzorcích byla 1g/l.*

číslo vzorku	c Septonexu [mM]
13 B	0,8
14 B	0,9
15B	2
16 B	5
17B	7
9C	0,4

