



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STUDIUM INTERAKCÍ BIOPOLYMER - TENZID POMOCÍ MIKROKALORIMETRIE A METOD ROZPTYLU SVĚTLA

MICROCALORIMETRIC AND LIGHT SCATTERING METHODS IN THE STUDY OF INTERACTIONS IN  
BIOPOLYMER - SURFACTANT SYSTEM

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kamila Šojdrová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0992/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Kamila Šojdrová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Studium interakcí biopolymer – tenzid pomocí mikrokalorimetrie a metod rozptylu světla

### Zadání diplomové práce:

1. Na základě vypracované literární rešerše zvolit vhodné zástupce tenzidů a opačně nabitých biopolymerů, jejichž interakcí vznikají polyelektrolytové komplexy.
2. Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci těchto komplexů metodami rozptylu světla a mikrokalorimetrie.
3. Diskuze výsledků a srovnání dat získaných různými metodami.

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

-----  
Bc. Kamila Šojdrová  
student(ka)

-----  
Ing. Jitka Krouská, 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

S využitím různých fyzikálně-chemických metod byly studovány systémy biopolymer-tenzid. Jako biopolymer byl zvolen hyaluronan sodný o vysoké (1400–1600 kDa), střední (250–450 kDa) a nízké (8–15 kDa) molekulové hmotnosti. Dále byly vybrány dva kationické tenzidy – cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a karbethodecinium bromid (Septonex), které s opačně nabitým hyaluronanem poskytují polyelektrolytové komplexy. S využitím přístroje Zetasizer Nano ZS byla prostřednictvím dynamického rozptylu světla sledována kritická agregační koncentrace tenzidu v systému, daná změnou Z-průměru velikosti částic a zeta potenciálu. Metodou SEC-MALS bylo popsáno konformační uspořádání hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech a charakterizovány polyelektrolytové komplexy hyaluronan-tenzid po dosažení bodu agregace. Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) byla využita pro stanovení kritické agregační koncentrace tenzidu sledováním tepelných změn doprovázejících agregaci systému. Bylo zjištěno, že s rostoucí molekulovou hmotností tato koncentrace klesá, a naopak.

## ABSTRACT

Biopolymer-surfactant systems have been studied by using different physico-chemical methods. As the biopolymer, it was chosen high (1400–1600 kDa), medium (250–450 kDa) and low (8–15 kDa) molecular weight sodium hyaluronate. Two cationic surfactants – cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and carbethodecinium bromide (Septonex) were selected to provide polyelectrolyte complexes with oppositely charged hyaluronan. The critical aggregation concentration of the surfactant in the system was monitored by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS). SEC-MALS method was used for the description of the conformation of sodium hyaluronate of different molecular weights and polyelectrolytes complexes hyaluronan-surfactant after reaching the aggregation point. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to determine the critical aggregation concentration of the surfactant by monitoring the thermal changes accompanying the aggregation of the system. It was found out that the increasing molecular weight of hyaluronan in these systems decreases the critical aggregation concentrations and conversely.

## KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan sodný, kationické tenzidy, polyelektrolytové komplexy, kritická agregační koncentrace (CAC), zeta potenciál, SEC-MALS, izotermická titrační kalorimetrie (ITC)

## KEY WORDS

sodium hyaluronate, cationic surfactants, polyelectrolyte complexes, critical aggregation concentration (CAC), zeta potential, SEC-MALS, isothermal titration calorimetry (ITC)

ŠOJDROVÁ, K. *Studium interakcí biopolymer - tenzid pomocí mikrokalorimetrie a metod rozptylu světla*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé největší poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Jitce Krouské, PhD. za odborný dohled, velmi vstřícný přístup, cenné rady a připomínky a za čas věnovaný konzultacím k dané problematice během zpracování diplomové práce.

Ráda bych také poděkovala Ing. Michalu Kalinovi, PhD. za čas věnovaný konzultacím praktické části diplomové práce.

Velké díky patří také mé rodině za její obrovskou pomoc a podporu během studia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	KYSELINA HYALURONOVÁ .....	8
2.1.1	Struktura hyaluronanu .....	8
2.1.2	Chování hyaluronanu v roztocích .....	9
2.1.3	Výskyt kyseliny hyaluronové v lidském těle .....	10
2.1.4	Polysacharidy jako nosiče léčiv .....	12
2.2	POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY .....	13
2.2.1	Kationické tenzidy .....	15
2.2.2	Charakterizace cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) .....	15
2.2.3	Charakterizace Septonexu .....	16
2.3	POLYELEKTROLYTY .....	16
2.3.1	Charakterizace polyelektrolytů .....	17
2.4	POLYELEKTROLYTOVÉ KOMPLEXY .....	17
2.4.1	Komplex polyelektrolyt-tenzid .....	19
2.4.2	Polyelektrolytový komplex hyaluronan-kationický tenzid .....	20
2.5	METODY STUDIA POLYELEKTROLYTOVÝCH SYSTÉMŮ .....	21
2.5.1	Metody rozptylu světla .....	21
2.5.2	SEC-MALS .....	26
2.5.3	Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) .....	28
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
5.1	CHARAKTERIZACE MATERIÁLU .....	36
5.1.1	Hyaluronan sodný .....	36
5.1.2	Tenzidy .....	36
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	36
5.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	38
5.3.1	Srážecí experimenty .....	38
5.3.2	Příprava zásobních roztoků pro měření velikosti částic a zeta potenciálu .....	38
5.3.3	Příprava zásobních roztoků pro mikrokolorimetrii .....	38
5.3.4	Příprava zásobních roztoků a vzorků pro měření na přístroji SEC-MALS .....	38
5.4	POPIS NASTAVENÍ MĚŘENÍ .....	39
5.4.1	Měření na přístroji Zetasizer Nano ZS .....	39
5.4.2	Měření na přístroji SEC-MALS .....	40
5.4.3	Měření na přístroji TAM III .....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>41</b>
6.1	CHARAKTERIZACE HYALURONANU .....	41

6.2	SRÁŽECÍ EXPERIMENTY .....	41
6.3	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC A ZETA POTENCIÁLU .....	42
6.4	ANALÝZA POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ POMOCÍ ITC .....	44
6.5	ANALÝZA POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ POMOCÍ SEC-MALS .....	47
6.6	POROVNÁVÁNÍ VÝSLEDKŮ Z JEDNOTLIVÝCH METOD.....	49
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>60</b>
9.1	SEZNAM ZKRATEK.....	60
9.2	SEZNAM SYMBOLŮ .....	61
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>63</b>

# 1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) patří mezi jedny z nejpozoruhodnějších přírodních materiálů, jehož chemické, fyzikální či fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické funkce vycházejí z molekulární struktury s nenahraditelným aplikačním potenciálem. Není divu, že se již od roku 1934, kdy byla poprvé objevena Karlem Mayerem a Johnem Palmerem, stala předmětem mnoha studií a výzkumů, které v dnešní době nadále pokračují a vědci z celého světa stále rozšiřují poznatky o tomto biokompatibilním polysacharidu. Kyselina hyaluronová je nedílnou součástí lidského těla, kde plní mnoho biologických funkcí. Ve velkém množství se nachází v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži, tvoří patřičnou část mezibuněčné hmoty a tkání. V dnešní době se kyselina hyaluronová získává fermentací z buněčných stěn bakterií rodu *Streptococcus*.

Povrchově aktivní látky neboli tenzidy jsou nejuniverzálnějšími produkty chemického průmyslu, se kterými se setkáváme téměř denně. Často bývají součástí mycích, pracích a dezinfekčních prostředků, vyskytují se jako přísady v kosmetických produktech a interakcí s jinými polymery poskytují vhodné systémy s potenciálním využitím v medicíně a farmacii. Amfifilní charakter tenzidů umožňuje těmto organickým molekulám vyskytovat se v roztocích v různém nadmolekulárním uspořádání, které ovlivňuje zejména jejich koncentrace. Schopnosti vytvářet agregáty za určitých interakčních podmínek bylo využito v této diplomové práci.

V teoretické části diplomové práce jsou popsány základní charakteristiky a využití hyaluronanu sodného a povrchově aktivních látek se zaměřením na kationické tenzidy. Práce poskytuje informace o interakcích biopolymer-tenzid, vzniku polyelektrolytových komplexů a možnostech jejich charakterizace z fyzikálně-chemického hlediska s využitím metod rozptylu světla a tepelných změn systému. Jako biopolymer byla vybrána kyselina hyaluronová a z tenzidů byl vybrán CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a Septonex (karbethependedcinium bromid).

Praktická část nabízí přehled o získaných výsledcích z experimentálních měření na přístrojích Zetasizer Nano ZS, SEC-MALS a TAM III, které nám napomohly charakterizovat a blíže prozkoumat tvorbu a chování polyelektrolytových komplexů v systému hyaluronan-tenzid.

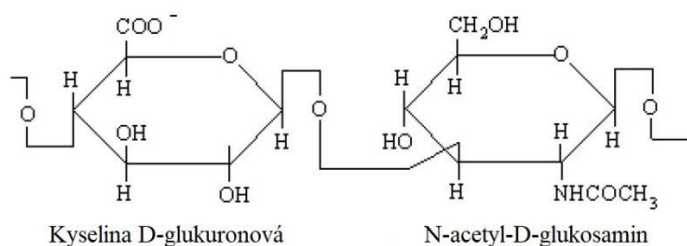
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová, jakožto přirozeně se vyskytující vysokomolekulární polysacharid, je významným biopolymerem s důležitými biologickými funkcemi, a to zejména v lidském těle. Primárně tvoří důležitou součást extracelulární matrix, perikulárního prostoru a většiny pojivových tkání. Kyselina hyaluronová je přirozeně syntetizována třídou integrálních membránových proteinů nazývaných hyaluronan syntázy a degradována skupinou enzymů, tzv. hyaluronidázami. Za fyziologických podmínek se vyskytuje ve formě polyelektrolytu s přidruženými sodnými kationty, a proto častěji nese označení hyaluronát, resp. hyaluronan sodný [1, 2].

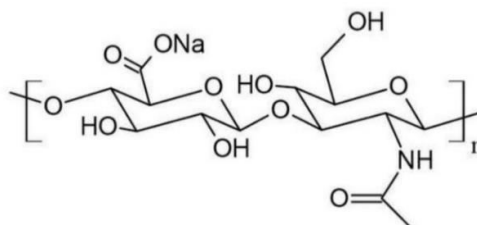
#### 2.1.1 Struktura hyaluronanu

Primární řetězec tohoto poměrně jednoduchého, nevětveného glykosaminoglykanu tvoří lineární uspořádání s opakujícími se disacharidovými jednotkami *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a *D*-glukuronové kyseliny, střídavě spojenými glykosidickými vazbami  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) a  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3). Počet opakovaných disacharidů v konečné molekule hyaluronanu může dosáhnout i více než 10 000, přičemž se celková molekulová hmotnost obvykle pohybuje mezi  $10^4$  až  $10^7$  Da (každý disacharid má přibližně 400 Da, s průměrnou délkou 1 nm) [1, 3, 4].



Obr. 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [1]

Beta konfigurace umožňuje, aby byly všechny velké, polární skupiny ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{COO}^-$ ) a anomerní uhlík na sousedním sacharidu ve výhodné ekvatoriální rovině, zatímco všechny malé atomy vodíku obsazují méně stericky výhodné axiální polohy. Molekula disacharidu se tak stává energeticky velmi stabilní [1].

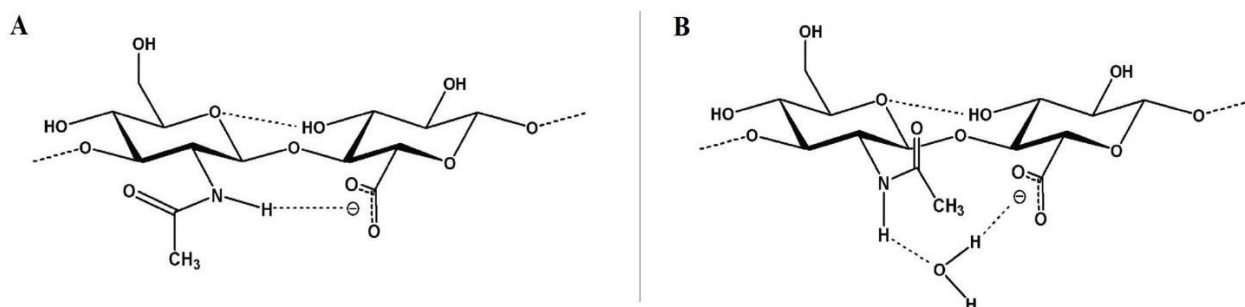


Obr. 2: Struktura hyaluronanu sodného [5]

Sekundární strukturu hyaluronanu determinují právě vazby  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) a  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), díky kterým mohou molekuly mukopolysacharidového řetězce zaujmout pravotočivou nebo levotočivou helikální konformaci, a to otočením disacharidové jednotky o  $180^\circ$  vždy vzhledem k následující. Mezi funkčními skupinami, jako je NH, OH nebo C=O působí

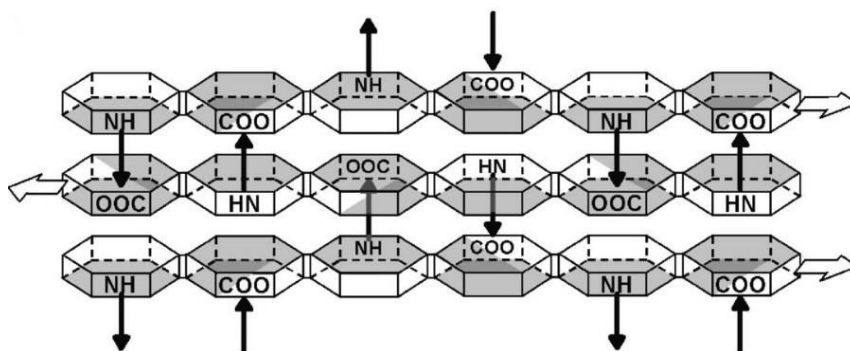


intramolekulární vodíkové vazby, zajišťující vznik pevné dvoušroubovice. V závislosti na prostředí je možné pozorovat dvě stabilní uspořádání polysacharidového řetězce, viz Obrázek 3 [6].



Obr. 3: Sekundární struktura HA v DMSO roztoku (A), sekundární struktura HA ve vodném prostředí (B) [7]

Se zvyšující se koncentrací hyaluronanu v roztoku jsou zesíleny vodíkové vazby mezi acetamidovými a karboxylovými skupinami různých hyaluronanových řetězců a společně s interakcemi hydrofobních částí podporují tvorbu terciární struktury v listovém uspořádání [6].

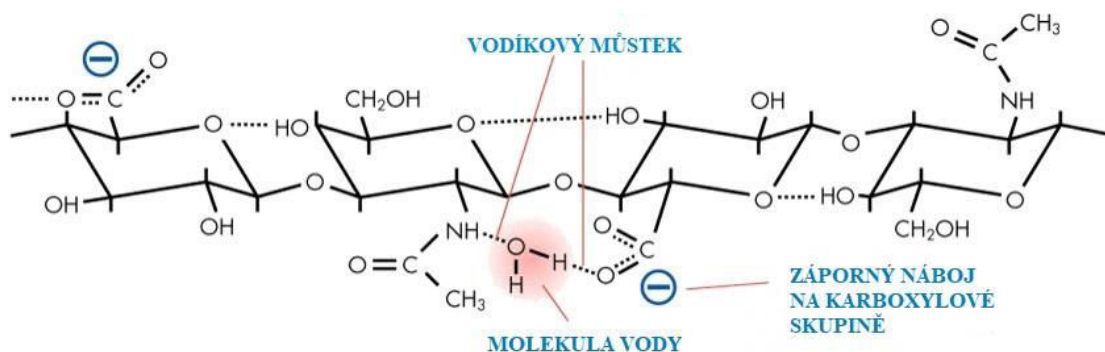


Obr. 4: Schematické znázornění terciární struktury HA ve vodném prostředí [7]

Hydrofobní a vodíkové vazebné interakce v kombinaci s elektrostatickým odporem umožňují agregaci velkého počtu molekul, což vede k tvorbě molekulární sítě, tedy kvartérní struktury hyaluronanu [8].

### 2.1.2 Chování hyaluronanu v roztocích

Hydrofilní část molekuly je zodpovědná za schopnost hyaluronanu vázat se na vodu mnohem více než většina jiných polymerů. Ve vodném roztoku vzniká vodíkový můstek mezi aminem a karboxylovými skupinami přítomnými v hyaluronanu a molekulou vody (Obrázek 4), kde hraje vodíkový můstek důležitou roli při stabilizaci struktury tohoto polysacharidu [8].



Obr. 5: Vznik vodíkových můstků v lineárním řetězci HA [8]

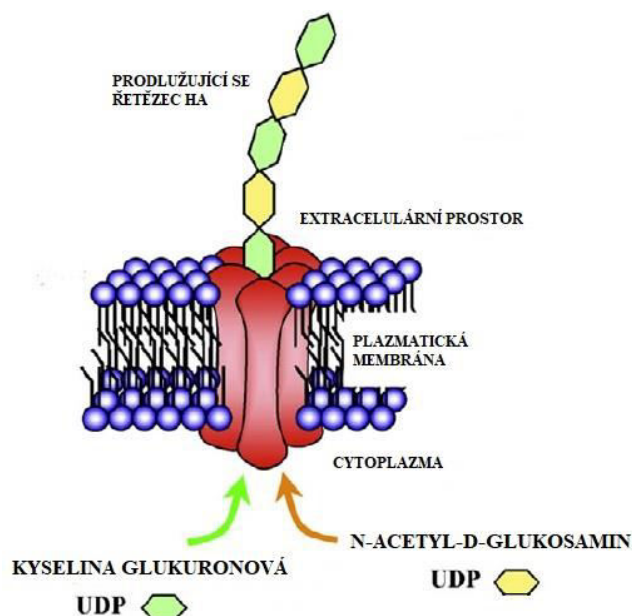
Roztoky hyaluronanu vykazují vzhledem k jejich hydrofilní povaze velmi neobvyklé reologické vlastnosti. Ve vodném prostředí vytváří hyaluronan viskoelastický roztok v závislosti na jeho molekulové hmotnosti, na koncentraci a pH roztoku a na smykových vlastnostech. Hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností je převážně elastický při nízkých smykových rychlostech, zatímco nízkomolekulární hyaluronan se chová převážně viskózně. Při nízkých koncentracích se řetězce hyaluronanu navzájem splétají za vzniku pevného gelu a při vyšších koncentracích mají extrémně vysokou viskozitu (10 mg/ml HA zvyšuje viskozitu vody až 5 000násobně), proto jsou hyaluronanové roztoky označovány za pseudoplastický materiál. Tyto ojedinělé vlastnosti umožňují široké využití haluronanu v řadě medicínských aplikací [1, 8, 9].

### 2.1.3 Výskyt kyseliny hyaluronové v lidském těle

Přítomnost kyseliny hyaluronové je nejvíce spojována s těly obratlovců, kde plní mnoho důležitých biologických funkcí, které se vztahují k jejím molekulárním a fyzikálně-chemickým vlastnostem. V lidském těle se HA převážně vyskytuje jako stavební jednotka extracelulární matrix, účastní se specifických interakcí a buněčné signalizace. Zároveň ovlivňuje zánětlivé a autoimunitní reakce, proliferaci a diferenciaci buněk. Také urychluje regeneraci tkání, hraje důležitou roli v embryogenezi, zasahuje do procesu angiogeneze a moduluje kancerogenezi [9, 10].

#### *HA v extracelulární matrix*

Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanových molekul, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu, je HA syntetizována v plazmatické membráně vysoce specializovanými membránovými proteiny – hyaluronansyntázami (HAS). Existují tři izoformy HAS přítomné u savčích druhů, z nichž má každá dvě odlišné vazebné domény pro aktivní tzv. UDP-cukry. HAS alternativně přidávají aktivní monomer kyseliny glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu na redukční konec růstového polymeru a neredukující konec sacharidového řetězce se přesouvá do extracelulárního prostoru pórem ve struktuře HAS [2].



Obr. 6: Polymerizace HA transmembránovými proteiny [2]

Na syntéze hyaluronanu v lidském těle se podílejí především fibroblasty, chondrocyty a keratinocyty a HA se tak stává stavebním prvkem mezibuněčné hmoty měkkých pojivových tkání. V lidském těle se nejvyšší obsah HA nachází v synoviální tekutině, pupečníku, ve sklivci oka a v kůži [9, 10].

#### HA jako signální molekula

HA se váže v extracelulární matrix na buňky a další složky prostřednictvím specifických a nespecifických interakcí. Na povrchu různých typů buněk byly identifikovány hyaluronanové receptory, které se podílejí na buněčné signální transdukci. Patří mezi ně CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, Layilin a receptor TLR4. CD44 a RHAMM, které jsou v dnešní době nejvíce sledovanými a zároveň nejlépe charakterizovanými receptory, svou přítomností ovlivňují proces vzniku nádorových buněk [1, 9].

CD44 je transmembránový glykoprotein, na který se kompetitivně váží polymery HA. Nachází se na leukocytech, endotelu, na parenchymových i epiteliálních buňkách. CD44 má nejméně 17 různých izoform a kromě funkce receptoru pro HA slouží také jako mediátor vyžívání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště do místa zánětu. Rovněž koordinuje signály pro buněčné přežívání a smrt [1, 9].

Buňky mají několik specifických receptorů rozpoznávajících hyaluronan, mezi nimiž je CD44 pravděpodobně nejdůležitějším, co se týče potenciálu pro aplikaci v cílené distribuci léčiv [12].

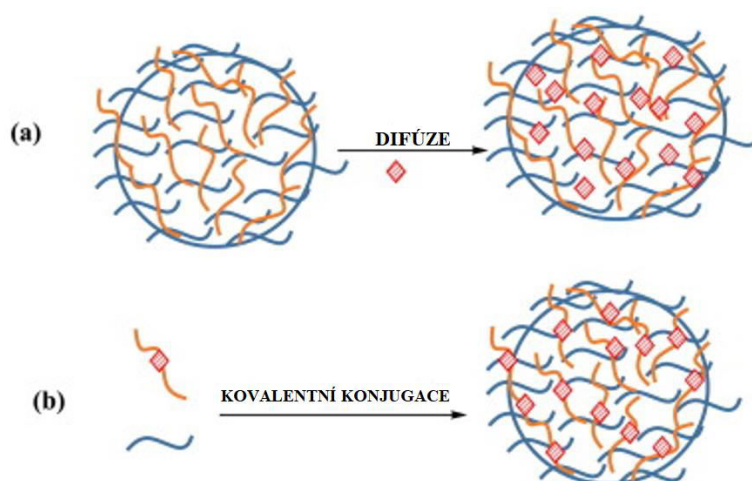
RHAMM, neboli CD168 není na rozdíl od CD44 transmembránovým proteinem a na buněčnou membránu je napojen zvenčí. Může tak snadno interagovat s přítomnými glykosaminoglykany. Účastní se buněčné migrace, urychluje přípravou (G2) a mitotickou (M) fází buněčného cyklu a podporuje novotvorbu cév [9].

## 2.1.4 Polysacharidy jako nosiče léčiv

Polysacharidy jsou v dnešní době nejatraktivnějšími a nejslibnějšími biomateriály v nanomedicině vzhledem k jejich značnému výskytu v přírodě, nízké ceně při zpracování, biokompatibilitě, rozložitelnosti, netoxicitě, rozpustnosti ve vodě a bioaktivitě. Existence velkého množství reaktivních funkčních skupin na polysacharidovém řetězci umožňuje snadnou chemickou či biochemickou modifikaci pro syntézu hydrogelů v řádech nanometrů, a to na bázi polysacharidů s různými strukturami [13].

Nanogely jsou disperze hydrogelových nanočástic vytvořených z fyzikálně nebo chemicky zesíťovaných polymerních sítí, které jsou považovány za systém dodávání léku nové generace. Nanočástice s rozměry od 10 do 1000 nm vykazují jedinečné vlastnosti (vysoký obsah vody, velká plocha pro multivalentní biokonjugaci, volitelná velikost a schopnost adsorbovat a nést jiné sloučeniny), které z nich činí ideální struktury v systému cíleného dodávání léků. V důsledku poměrně velké (funkční) plochy mohou nanočástice enkapsulovat nebo imobilizovat velké množství protinádorových léčiv buď prostřednictvím kovalentních nebo nekovalentních interakcí. Distribuce léčiv se tak mohou účastnit nanogelové systémy složené z biokompatibilních a biologicky rozložitelných proteinových (kolagen, albumin, fibrin) a polysacharidových (chitosan, kyselina hyaluronová, heparin, chondroitin sulfát, agaróza, alginát) polymerů [13].

Mezi nejvíce prozkoumané metody začlenění léčiva do těchto systémů patří přímé přidávání léčiva do roztoku nanogelů. Řetězce polymerů jsou zesíťovány v přítomnosti malého léčiva nebo makromolekuly, kde mají léčiva následně možnost difundovat do pórů nanogelů. Protinádorová léčiva jsou zapouzdřena do nanogelové matrice prostřednictvím nekovalentní interakce a jejich uvolňování v organismu je řízeno kontrolovanou difúzí (v závislosti na velikosti pórů nanogelů), viz Obrázek 7a. Léčiva mohou být také kovalentně vázaná na matici nanogelů v hydrogelovém systému a jejich uvolňování je hlavně řízeno rychlostí hydrolyzy polymerních řetězců a chemickým nebo enzymatickým štěpením vazby polymer-léčivo, viz Obrázek 7b [13].



Obr. 7: Schematické začlenění léčiva do nanogelové struktury [13]

- (a) Přímé začlenění léčiva do nanogelové matrice prostřednictvím difúze
- (b) Kovalentní konjugace léčiva na polysacharid a tvorba nanogelu

## HA jako potenciální nosič léčiva

Za poslední tři desetiletí byla HA a její deriváty klinicky používána jako léčivý přípravek v řadě léčebných aplikací, zahrnujících především oftalmologii, chirurgii, hojení ran a ortopedickou chirurgii a revmatologii. Hyaluronan představuje vysoce hydrofilní biopolymer s dokonalou hydratací, který za normálních podmínek nelze použít pro inkorporaci hydrofobního léčiva. Pro jeho specifické vlastnosti a možnost zabudovat účinné léky do molekuly HA, musí být tato struktura chemicky modifikována za vzniku hydrofobní domény. Právě díky přítomnosti multifunkčních skupin (jako je karboxylová skupina kyseliny glukuronové, primární a sekundární hydroxylové skupiny a N-acetylové skupiny) může docházet k takovým změnám ve struktuře HA, které mohou vést i ke změně vlastností derivátů HA, včetně jejich hydrofobicity a biologické aktivity [12, 13].

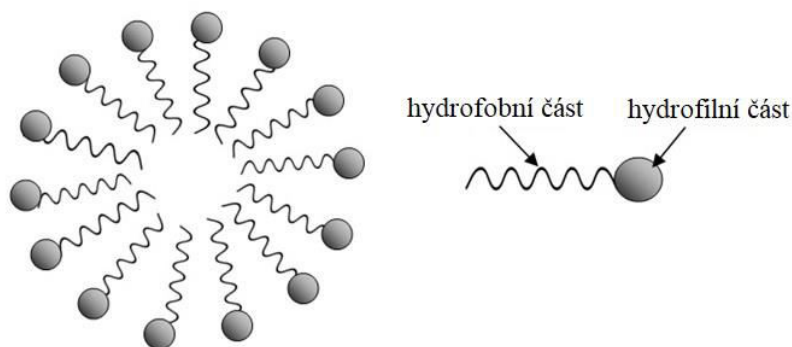
Nejčastější způsoby chemické modifikace HA zahrnují esterifikaci a amidaci karboxylových skupin a etherifikaci a esterifikaci hydroxylových skupin HA. V současné době jsou ve velké míře zkoumány aplikace HA nanogelů jako vezikulum farmaceutických přípravků při poskytování léků pro léčbu rakoviny. Mnoho nádorů rezistentních na léky a rakovinové kmenové buňky vykazují vysoké hladiny receptoru CD44, proto lék konjugovaný na HA nebo zapouzdřený do struktury HA nanogelů získají cílové buňky přes receptory CD44, čímž bude umožněno intracelulární podávání léků [13].

Bylo prokázáno, že kombinace HA s povrchově aktivní látkou může vést k tvorbě asociátů, v nichž se hydrofobní struktura surfaktantu podílí na solubilizaci hydrofobní látky a HA hraje roli biokompatibilního nosiče a cíleného distributora konkrétního léčiva [12].

## 2.2 Povrchově aktivní látky

Pojem povrchově aktivní látky (PAL) značí souhrnný název pro organické látky, známé také jako tenzidy (z německého *tenside*) nebo surfaktanty (z anglického *surfactant*), které způsobují změnu vlastností daného prostředí na fázovém rozhraní soustavy. Při nízkých koncentracích se na tomto rozhraní hromadí za současného ovlivňování energetických poměrů, což se projeví snížením mezifázového či povrchového napětí [14, 15, 16].

Tyto vlastnosti vyplývají z fyzikálně-chemické struktury molekuly tenzidu, která vykazuje bipolárně asymetrický charakter. Jedná se o tzv. *amfifilní molekulu* s polární i nepolární funkční skupinou ve struktuře. Nachází-li se tato molekula ve vodě nebo vodném prostředí, lze označit protichůdné části molekuly za hydrofilní (resp. lipofobní) s velkou afinitou k tomuto rozpouštědlu a hydrofobní (resp. lipofilní), která se snaží co nejvíce zamezit styku s rozpouštědlem. Chování PAL v roztoku závisí na poměru obou částí, které charakterizuje hodnota HLB (hydrofobic-lipophilic balance) udávající praktické využití tenzidů [14, 17, 18]. Z chemického hlediska jsou tenzidy organizovány do lineární nebo rozvětvené struktury, kterou doprovází nasycené, popř. nenasycené uhlovodíkové řetězce. Tyto nepolární řetězce, nejčastěji s 12–18 uhlíkovými atomy, vykazují alkylový nebo alkylbenzenový charakter. Pro polární skupinu je naopak typická přítomnost heteroatomů (O, S, P, N), které bývají často součástí funkčních skupin (alkoholů, thiolů, etherů, esterů, sulfátů, sulfonátů ...) a mohou nést částečný nebo celý náboj [15, 19].

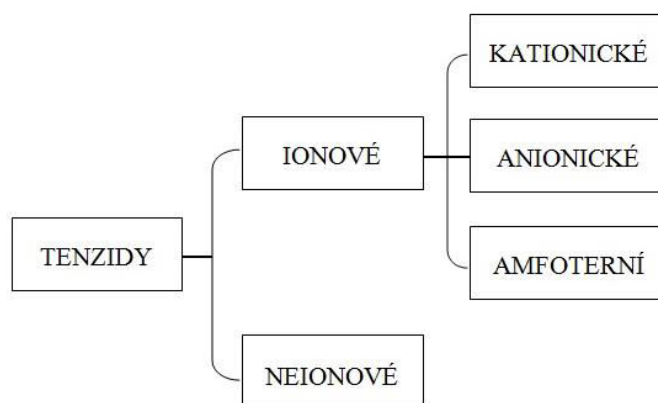


Obr. 8: Struktura micely a molekuly PAL

Chemická a fyzikální struktura udává povrchově aktivním látkám specifické vlastnosti. Nejen, že usnadňují smáčení povrchu a odstraňování nečistot, ale především ovlivňují procesy v heterogenních soustavách na rozhraní dvou, popřípadě tří fází, mají vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti materiálů a aktivně se podílejí na biochemických procesech v živých organismech [14].

Ovšem podstatným znakem molekul tenzidů je schopnost formovat se v roztocích do různých nadmolekulárních útvarů, zvaných *micely*. Ke vzniku těchto koloidních agregátů s uspořádanou strukturou dochází mezi nepolárními řetězci tenzidů na základě působení van der Waalsových sil a za současného zvyšování koncentrace tenzidu v roztoku. Ve vodném prostředí jsou micely orientovány polární (hydrofilní) částí k vodě, zatímco v nepolárním prostředí vznikají tzv. *inverzní* resp. *reverzní micely* s opačným uspořádáním hydrofilní a hydrofobní části PAL. Koncentrace, při které se začnou tvořit micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC), která výrazně mění některé fyzikálně-chemické vlastnosti tenzidu [17, 18, 19].

Tenzidy lze rozdělit podle několika kritérií do různých skupin a tříd. Nejčastěji ale rozhoduje o rozdělení tenzidů charakter hydrofilní, tedy polární části molekuly PAL a její schopnost nebo neschopnost disociovat ve vodném prostředí. Z hlediska iontového charakteru uvažujeme PAL jako skupinu ionických tenzidů, které lze dále dělit podle náboje polární skupiny na kationické, anionické a amfoterní, resp. zwitterionické. Skupina neionických tenzidů není schopná ve vodném prostředí disociovat na ionty [14, 19, 20].

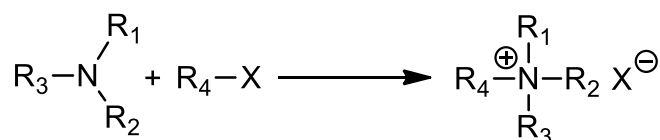


Obr. 9: Klasifikace PAL podle typu hydrofilní složky

### 2.2.1 Kationické tenzidy

Povrchovou aktivitu kationických tenzidů nese jedna nebo více funkčních skupin, které ve vodném prostředí disociují na kladně nabitě ionty. Největší zastoupení této skupiny ionických tenzidů zaujímají sloučeniny s přítomností kladně nabitého atomu dusíku v molekule. Nejčastěji se jedná o soli aminů a kvartérní amoniové soli, v jejichž struktuře jsou všechny vodíky aminu nahrazeny organickými substituenty, ať už uhlovodíkovým řetězcem, alkylarylovou nebo arylovou skupinou. Opačný ion pak může poskytovat halogenid, síran, acetát a další skupiny tohoto typu [19, 21].

Kationtové PAL lze získat reakcí terciárního aminu s alkylačními činidly (methylchlorid, methyljodid, dimethylsulfát, benzylchlorid) za vzniku struktury s kladně nabitým centrem dusíku. Tato reakce se nazývá *kvarternizace* a obvykle probíhá při zvýšené teplotě a/nebo v přítomnosti rozpouštědla. Je-li k dispozici pouze jeden delší alkylový řetězec a ostatní řetězce jsou methylové skupiny, teprve pak tato reakce dosahuje určité četnosti produktů [16].



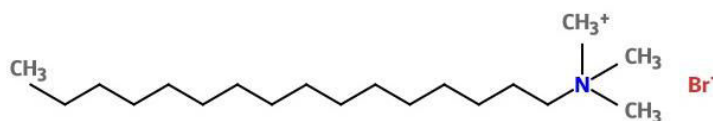
Obr. 10: Průběh kvarternizace [22]

Přestože jsou kationické PAL obecně dražší než anionické či neionické, jejich specifické vlastnosti jim zajišťují uplatnění v řadě aplikací. Většina z nich je biologicky aktivních a vykazují baktericidní a/nebo bakteriostatické účinky. Působí jako antistatická činidla v prostředcích na změkčování tkanin, inhibitory koroze a flotační činidla. Benzalkonium a alkyltrimethylamoniumchlorid nebo bromid se používají jako antiseptické látky, dezinfekční prostředky a sterilizační činidla. Velký význam kationických tenzidů patří kosmetickému průmyslu, kde se vyskytují nejčastěji ve vlasových kondicionérech v podobě kvartérních amoniových solí, kde jeden substituent tvoří peptid [21, 23, 24].

S určitými výjimkami nelze většinu kationických tenzidů kombinovat s anionickými, neboť se vzájemně srážejí za vzniku nerozpustného aglomerátu. Lze kombinovat jen ty typy, které mají v molekule kromě ionické části i neionickou část, zajišťující rozpustnost ve vodném prostředí. Nutno podotknout, že přítomnost kationického tenzidu v receptuře podporuje vlastnosti anionických PAL [16, 24].

### 2.2.2 Charakterizace cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB)

Cetyltrimethylammonium Bromide, jiným názvem Hexadecyltrimethylammonium Bromide, s molekulovým vzorcem  $C_{19}H_{42}BrN$ , je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek s molekulovou hmotností 364,5 g/mol, řadící se mezi kationické tenzidy typu kvartérní amoniové soli [25].



Obr. 11: Strukturální vzorec CTAB

CTAB je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu (96%), mírně rozpustný v acetonu a chloroformu a nerozpustný v etheru, diethyletheru a benzenu [25, 26].

Při alkalickém pH působí antisepticky vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Používá se jako jedna ze složek tlumivého roztoku k izolaci rostlinné DNA a nukleových kyselin a také našel využití pro stanovení molekulových hmotností proteinů v elektroforetických systémech [27].

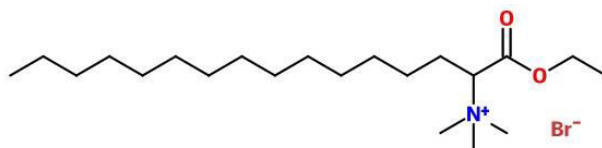
CTAB se díky svým poměrně vysokým nákladům obvykle používá pouze ve vybraných kosmetických výrobcích, nejvíce v kondicionérech a šamponech proti lupům a seborrhoické dermatitidě v 1–3% koncentraci [28, 29].

Stejně jako u většiny povrchově aktivních látek tvoří CTAB ve vodných roztocích micely s CMC v rozmezí 0,92 až 1 mmol·dm<sup>-3</sup> a je tedy vhodný pro stanovení kritické micelární koncentrace detergentů. Při 30 °C tvoří micely s agregačním číslem 75–120 (v závislosti na metodě stanovení, průměrně ~ 95) a stupněm ionizace  $\alpha = 0,2-0,1$  [27].

### 2.2.3 Charakterizace Septonexu

Karbohexopendecinium bromid, sumárním vzorcem C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>BrNO<sub>2</sub>, častěji uváděný pod názvem Septonex patří mezi kvartérní amoniové soli s mírně antiseptickými a baktericidními vlastnostmi. Za běžných podmínek se jedná o bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek s molekulovou hmotností 422,49 g/mol. Je snadno rozpustný ve vodě, ethanolu (96%) a chloroformu [30, 31]. Ve vodném prostředí dochází ke vzniku micel při dosažení kritické micelární koncentrace pohybující se přibližně okolo 0,8 mmol·dm<sup>-3</sup> (při 25 °C) [32].

Agregační číslo 20mmol·dm<sup>-3</sup> roztoku Septonexu bylo stanoveno pomocí zhášení pyrenu cetylpyridinium chloridem na hodnotu 104 molekul [33].



Obr. 12: Strukturní vzorec Septonexu

## 2.3 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty (PE) patří mezi vysokomolekulární látky, které nesou podél polymerního řetězce postranní skupiny schopné ve vodném prostředí elektrolytické disociace za vzniku makroiontu o velkém počtu elementárních nábojů a protiiontu o příslušném počtu opačných nábojů. Nejčastěji rozdělujeme polyelektrolyty právě podle povahy skupin schopných disociace:

- PE obsahující kyselé skupiny (–COOH, –OSO<sub>3</sub>H)
- PE obsahující bazické skupiny (–NH<sub>2</sub>)
- amfoterní PE obsahující zásadité i kyselé skupiny (bílkoviny) [34].

Typ disociačních skupin v polyelektrolytech určuje jejich rozpustnost ve vodě a v jiných polárních rozpouštědlech. Silně kyselé skupiny disociují prakticky úplně, zatímco slabě



kyselé a slabě zásadité skupiny disociují pouze do určitého stupně. U amfoterních makromolekul jsou při vysokých pH disociovány pouze kyselé skupiny, při nízkých pH disociují jen zásadité skupiny. Bude-li pH vykazovat střední hodnoty, pak disociují částečně kyselé i zásadité skupiny za vzniku obojetných iontů (amfiontů). Při disociaci stejného počtu kladných i záporných nábojů dosahuje molekula hodnoty pH, označované jako *tzv. izoelektrický bod* a celkový náboj makromolekuly je tedy nulový a sama molekula se chová jako elektroneutrální [35, 36].

Disociací iontových skupin může být podpořen vznik elektrostatických interakcí, v jejichž důsledku dochází ke změnám vlastností polymerů. Chování PE také výrazně ovlivňuje iontová síla roztoku. Při nižší iontové síle zaujímají PE natažený tvar, a to díky odpuzující síle uvnitř molekul. Pokud se iontová síla roztoku zvýší, PE mají tendenci se smršťovat. Vzhledem k této zvláštní povaze jsou PE velmi důležité v řadě různých farmaceutických a biomedicínských aplikacích, a to zejména díky existenci rozdílného stupně velikosti, stabilitě, viskozitě nebo i morfologii polyelektrolytových komplexů (PEC) [37].

### 2.3.1 Charakterizace polyelektrolytů

Polyelektrolyty lze charakterizovat pomocí několika metod, které tak umožňují získat přehled o nejdůležitějších vlastnostech studovaného systému.

Makromolekulární vlastnosti PE mohou být stanoveny použitím některých *chromatografických metod*, jako je frakcionace tokem v poli, elektroforéza a vylučovací chromatografie. Molární hmotnost PE lze určit *metodou tenze par*.

*Metody rozptylu světla* se široce používají k charakterizaci PE, zejména ve formě roztoku. Mohou poskytnout podrobné informace o velikosti částic, tvaru a hmotnosti rozptýlených částic, interakci mezi částicemi a rozpouštědly a o polydisperzi. Dalším typem analytické metody je *ultracentrifugace* určující molekulové hmotnosti PE v rozmezí 100–10<sup>8</sup> g/mol. Využívá působení odstředivé síly na PE roztok, což vede k sedimentaci makromolekul, která souvisí s molární hmotností daného polyelektrolytu.

*Potenciometrické metody* slouží k odhadu iontových aktivit (H<sup>+</sup> iontu) za použití selektivních a referenčních elektrod. Umožňuje současné stanovení pH, pK<sub>a</sub> a stupně ionizace, které charakterizují PE. *NMR spektroskopii* lze získat informace o chemickém složení makromolekul i o molekulární dynamice [37].

## 2.4 Polyelektrolytové komplexy

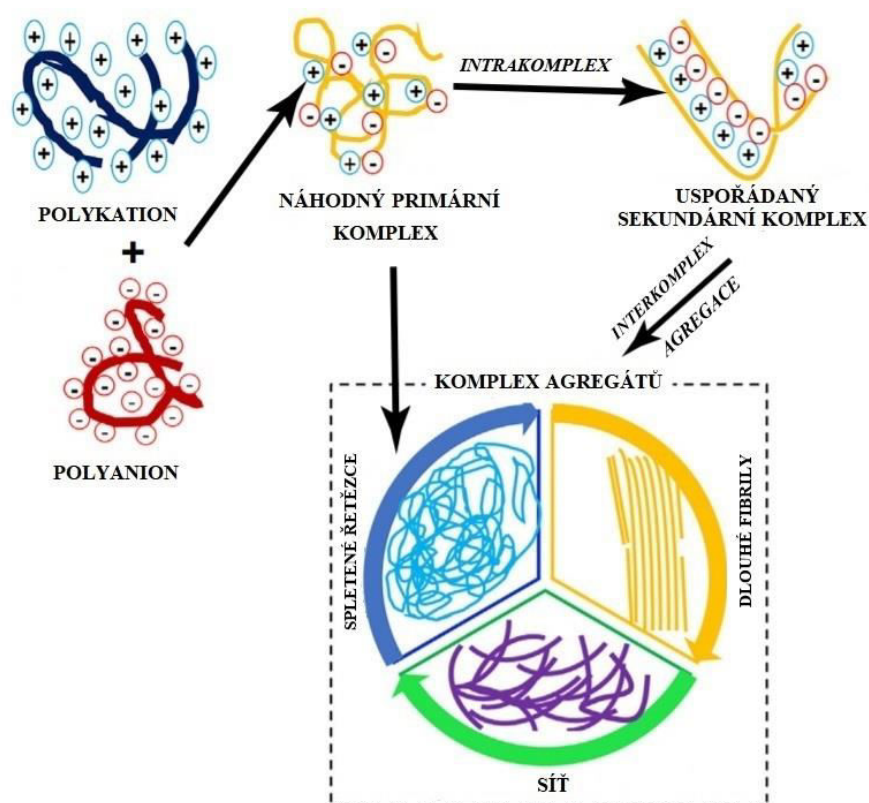
Polyelektrolyty mají tendenci díky elektrostatické interakci mezi jedním nebo více opačně nabitými PE řetězci vytvářet ve vodném prostředí trojrozměrné makromolekulární struktury – *polyelektrolytové komplexy* (PEC). K PE komplexaci dochází nejen mezi dvěma PE řetězci, ale také může docházet ke vzniku systému PE-léčivo, PE-nukleová kyselina i PE-povrchově aktivní látka. Ke vzniku těchto celků taktéž přispívají van der Waalsovy síly, vodíkové vazby, hydrofobní a dipólové interakce, aniž by bylo třeba použít zesíťovací činidla [37].

PEC mají ve srovnání s jinými polymery jedinečné vlastnosti. Nejsou rozpustné ve většině běžných rozpouštědel a jejich elasticita se mění v závislosti na vlhkosti prostředí. V mokřích podmínkách jsou PEC velmi pružné, zatímco za sucha jsou značně tvrdé a křehké. PEC jsou propustné pro všechny elektrolyty, ale nepropustné pro makročástice [37].

Tvorba PEC může mít významný vliv na rozpustnost polymeru, reologii systému, vznik zákalu a vodivost polymerního roztoku. Kromě toho může dojít ke skokové změně elektrické vodivosti, mechanických vlastností a propustnosti systému. Proces podílející se na tvorbě PEC probíhá ve třech krocích:

1. *Primární komplex* vzniká ihned po smísení opačně nabitých roztoků PE v důsledku působení Coulombovy síly. Tento proces je velmi rychlý.
2. *Intrakomplex*: proces formace uvnitř intrakomplexů zahrnuje vznik nových vazeb a/nebo modifikaci polymerních řetězců. Jedná se o přechodný stav, který obvykle trvá 1–2 hodiny.
3. *Interkomplex*: Třetí krok zahrnuje agregaci sekundárních komplexů zejména prostřednictvím hydrofobních interakcí [37, 38].

Tvorba polyelektrolytového komplexu je obvykle, ale ne vždy nezávislá na poměru obou makromolekul a pořadí míchání. Hnací silou tvorby komplexu je z velké části nárůst entropie způsobený uvolněním protiiontů s nízkou molekulovou hmotností. Vytvoření PE komplexů přímo závisí na stupni ionizace kationtových a aniontových polymerů, hustotě nábojů a jejich distribuci, na koncentraci polymerů a jejich poměru, stejně tak i na době trvání interakce a teplotě reakčního média [39].



Obr. 13: Proces tvorby polyelektrolytových komplexů [37]

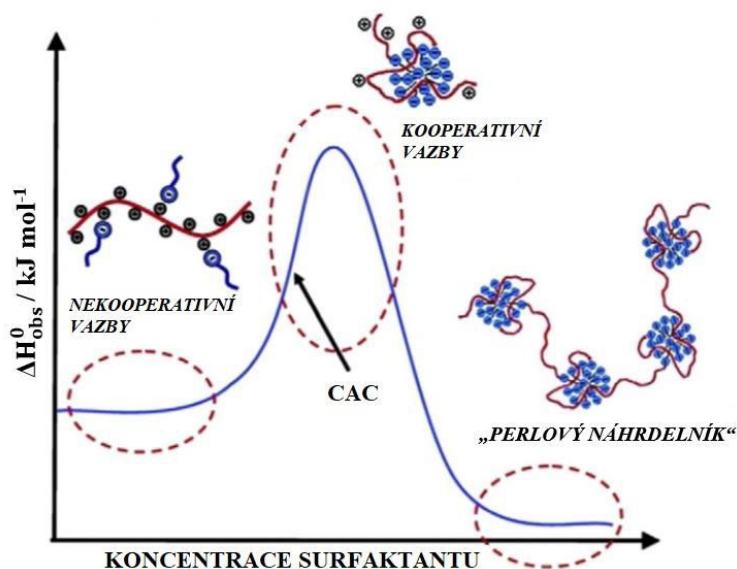
PE komplexům se v posledních letech přikládá velká pozornost díky jejich potenciálnímu použití převážně v oblasti medicíny. PEC působí jako systémy nosiče léků pro enzymy nebo DNA, díky schopnosti nabitých částic snadno interagovat do tohoto komplexu. Lze je použít jako membrány, slouží k izolaci a frakcionaci proteinů, zajišťují cílenou distribuci nukleových

kyselin. Dále jsou vhodné pro vazbu farmaceutických produktů, pro přípravu mikrokapslí k podávání léků, využívají se jako membrány pro dialýzu, kontaktní čočky, napodobeniny enzymů, i jako nanočástice pro cílené doručení tkáňových struktur. PEC jsou vhodné pro vývoj biosenzoru, enzymovou imobilizaci a využití našly také jako hydrogely pro dodávání proteinů a peptidů. Účastní se léčení chronobiologických onemocnění a vývoje vakcín pro zvýšení imunitní odpovědi na antigeny [37].

#### 2.4.1 Komplex polyelektrolyt-tenzid

Vazba povrchově aktivních látek na opačně nabitě polyelektrolyty je souhrou působení silných elektrostatických interakcí mezi nábojem PE a opačně nabitými „hlavičkami“ tenzidu i hydrofobních interakcí mezi alkyly tenzidu a hydrofobních částí PE řetězců. Vznikají tak polyelektrolyt-tenzid komplexy (PES-C) různého tvaru, velikosti, stability, s přítomností/nepřítomností uspořádaných struktur, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a možností aplikace. Převážně se jedná o komplexy vysoce stabilní, stechiometrické, ve vodě nerozpustné [40, 41].

PAL mohou interagovat s polyelektrolyty ve formě menších agregátů po dosažení tzv. kritické agregační koncentrace (CAC), která je nižší než kritická micelární koncentrace čisté PAL v roztoku. V přítomnosti dostatečného množství PAL vznikají první micely navázané na PE řetězce. Další zvýšení koncentrace tenzidu vede k tvorbě přebytku volných micel. Model zvaný *perlový náhrdelník* zjednodušeně popisuje interakci polymer-tenzid a používá se jako obecný pohled na vazebné procesy (viz Obrázek 14) [40, 42].



Obr. 14: ITC křivka zobrazující vazebný proces systému surfaktant-polyelektrolyt [43]

Srážení PES-C z vodného roztoku je doprovázeno konfigurační/konformační změnou polymerních řetězců a rozdíly v pružnosti/tuhosti. V důsledku toho tvoří vysoce kondenzované molekuly surfaktantu micely, které jsou schopny spontánního sestavování molekul (tzv. „self-assembly“) do kubických, 2D hexagonálních nebo lamelárních

mezostruktur v závislosti na hustotě/distribuci náboje polyelektrolytu, na koncentraci soli v roztoku, teplotě systému a za podmínek termodynamické rovnováhy [40, 44].

#### **2.4.2 Polyelektrolytový komplex hyaluronan-kationický tenzid**

Hyaluronan představuje jedinečný biopolymer s typickými viskoelastickými a hydratačními vlastnostmi. Vzhledem ke karboxylové skupině zbytku kyseliny glukuronové nese molekula HA negativní náboj a v roztoku s fyziologickým pH se chová jako polyelektrolyt, respektive polyanion. Vysokomolekulární hyaluronan se vyskytuje hlavně v pojivových tkáních obratlovců, kde interaguje s jinými molekulami – proteoglykany a proteiny. Na druhé straně nízkomolekulární hyaluronan je zapojen do mnoha základních buněčných procesů díky specifickým interakcím s receptory buněčného povrchu. V organismu se HA dostává do styku s řadou molekul a tento fakt podporuje studium interakcí HA s různými druhy molekul vedoucích k jeho využití v lékařství a farmacii. Nabízí se zejména cílená distribuce léčiv, kde hyaluronan našel své největší využití [45, 46].

Masivní hydratační obal zamezuje využití hyaluronanu k přímému a cílenému dodávání nepolárních látek. Vzhledem k tomu, že mnoho potenciálně účinných léčiv vykazuje hydrofobní charakter, je třeba molekulu hyaluronanu chemicky modifikovat za vzniku hydrofobních domén, které umožňují dopravovat ve vodě nerozpustné látky. Chemickou modifikací pomocí navázaných ligandů a síťovacích reakcí však může dojít k ovlivnění biologické funkce a biokompatibility hyaluronanu, doprovázené změnou jeho fyzikálně-chemických vlastností. Lze tak docílit vzniku trojrozměrných struktur, tzv. hydrogelů, které nachází uplatnění ve tkáňovém inženýrství při tvorbě scaffoldů, hojení ran a popálenin, ale i jako nosiče léčiv [45, 47].

Chemické modifikace biopolymerů mohou být obecně využity k připojení jak biologicky aktivní látky, tak molekuly zabezpečující fyzikální interakce mezi molekulami. Takovou skupinou molekul jsou povrchově aktivní látky, které mohou sloužit ve výsledném PES komplexu jako solubilizující domény, zatímco hyaluronan zajišťuje rozpustnost ve vodě, biokompatibilitu a cílové vlastnosti těchto nově vzniklých nosičových systémů [45, 48].

Množství probíhajících interakcí hyaluronan-tenzid závisí na mnoha parametrech, avšak jeden z nich je obzvláště důležitý, a sice hovoříme o molekulové hmotnosti hyaluronanu. Oblast řízené distribuce léčiv je omezena na přípravu roztoků v přítomnosti NaCl, kde více interakcí vykazuje nízkomolekulární HA. Naopak vysokomolekulární HA na sebe dokáže navázat více tenzidu ve vodním prostředí. Tyto interakce obecně probíhají v prostředí NaCl obtížněji, a to v důsledku deformace prostorové struktury hyaluronanu, která má za následek snížení počtu dostupných vazebných míst pro další molekuly surfaktantu [49].

Interakce mezi hyaluronanem a kationtovými povrchově aktivními látkami tvoří komplexy v různých koloidních formách, od solů až po gely. Jsou-li smíchány vodné roztoky hyaluronanu a kationtové PAL, často pozorujeme separaci fází v izoelektrickém bodě (IEP). Bylo zjištěno, že precipitovaná fáze sedimentuje a nakonec po několika hodinách až několika dnech nebo týdnech vzniká malé množství vysoce viskózního gelového materiálu. Nutno podotknout, že hyaluronan interaguje pouze s povrchově aktivními látkami, které mají v alkylovém řetězci deset nebo více uhlíkových jednotek, jako je např. CTAB nebo Septonex – materiály vybrané pro studium komplexů hyaluronan-tenzid v této diplomové práci [50, 51].

## 2.5 Metody studia polyelektrolytových systémů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, polyelektrolytové komplexy lze charakterizovat pomocí několika metod. Mezi nejčastěji využívané patří spektroskopické metody, metody rozptylu světla, turbidimetrie, tenziometrie, konduktometrie a potenciometrie, termická a strukturní analýza, rentgenová a elektronová mikroskopie, fluorescenční techniky i membránové separační metody. Zvláště metody rozptylu světla se zdají být velmi vhodné pro získání komplexních informací o struktuře PEC, a to zejména v kombinaci statického a dynamického rozptylu světla [52].

V publikacích nalezneme využití metody rozptylu světla pro charakterizaci PE komplexů zřídka, proto se tato technika stala předmětem diplomové práce. Stejně tak se budu v následujících kapitolách věnovat izotermické titrační kalorimetrii, která umožňuje získat přehled o procesu agregace hyaluronanu v přítomnosti povrchově aktivních látek, neboť údaje o termodynamice takovýchto interakcí nejsou v literatuře téměř k dispozici [45].

### 2.5.1 Metody rozptylu světla

Koloidní soustavy lze charakterizovat na základě jejich optických vlastností, které jsou závislé zejména na velikosti, elektrické vodivosti a absorpci světla koloidních částic tvořící disperzní fázi. Hlavní postavení ve studiu těchto systémů zaujímá absorpce a rozptyl světla, na kterých je založena metoda dynamického rozptylu světla a elektroforetického rozptylu světla [53].

#### *Dynamický rozptyl světla*

Obecně lze říci, že dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. Dynamic Light Scattering), také znám jako fotonová korelační spektroskopie (PCS) nebo též kvazielastický rozptyl světla, je technika vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti [54, 55].

Metoda DLS je založena na měření časových změn fluktuací intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje částicemi, které podléhají Brownovu pohybu v důsledku náhodné srážky s okolními molekulami kapaliny. Interakcí laserového paprsku s částicemi dochází k interferenci, která závisí na vzdálenosti mezi částicí a detektorem, přičemž se mění vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného světla. Výsledkem jsou fluktuace intenzity rozptýleného záření okolo její průměrné hodnoty [53, 56, 57].

Okamžitou hodnotu fluktuace v čase  $\tau$  vyjadřuje pro monodisperzní systém tzv. autokorelační funkce  $g(\tau)$ :

$$g(\tau) = \exp\left[-\frac{\tau}{\tau_c}\right], \quad (1)$$

kde  $\tau_c$  je tzv. relaxační čas (doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla) [57], respektive můžeme autokorelační funkci definovat tímto vztahem:

$$g(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (2)$$

kde výrazy v ostrých závorkách značí průměrnou časovou hodnotu a  $\delta$  okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty. Autokorelační funkce má své maximum pro malé  $\tau$ , pro delší časy  $\tau$  funkce klesá k nule [58].

Relaxační čas souvisí s difuzním koeficientem  $D$  rozptylujících částic, který lze vyjádřit následující rovnicí:

$$D = \frac{\tau_c}{q^2}, \quad (3)$$

kde  $q$  je absolutní hodnota vlnového vektoru, daná vlnovou délkou dopadajícího světelného paprsku  $\lambda$  a úhlem  $\theta$ , pod kterým je měřena intenzita rozptýleného světla [57]:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (4)$$

Při samotném měření přístroj nejprve určí tzv. translační difuzní koeficient částic, prostřednictvím kterého lze ze Stokes-Einsteinovy rovnice stanovit velikost částic v systému, interpretovanou jako hydrodynamický poloměr částic  $R_H$ :

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta_0 \cdot D}, \quad (5)$$

kde  $k_B$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je absolutní teplota a  $\eta_0$  je dynamická viskozita disperzního prostředí. Získaná veličina odpovídá průměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný difuzní koeficient, jaký byl naměřen pro analyzovanou částici [55].

Nespornými výhodami DLS je rychlý a jednoduchý průběh měření, který obvykle trvá od několika desítek sekund do 10 minut. Techniku lze využít při analýze velikosti částic s rozměry i menšími než 1 nm, maximálně však 4  $\mu\text{m}$ . Analýza vyžaduje pouze malé množství vzorku v řádu mikrolitrů [57].

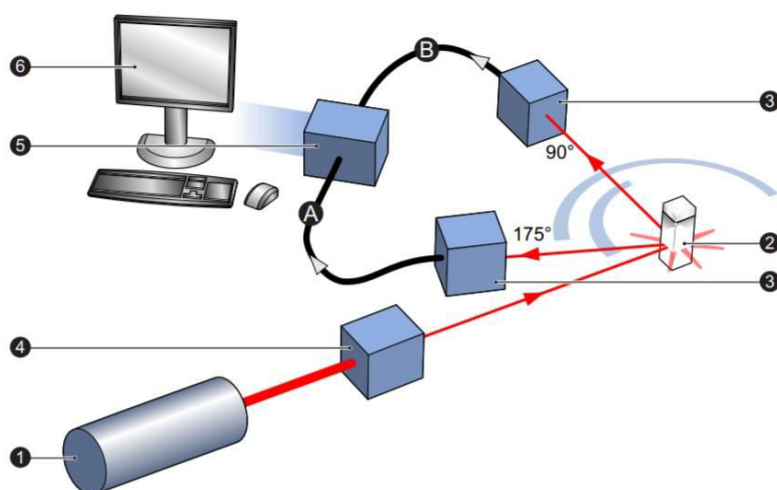
Své využití našla metoda dynamického rozptylu světla zejména při přesném stanovení velikosti částic v suspenzích. Lze ji využít při charakterizaci emulzí, micel, liposomů, latexů i pigmentů a stejně tak našla tato technika uplatnění v biologické a mikrobiologické oblasti při získávání informací o bakteriích, virech, proteinech či DNA [57].

#### *Zetasizer Nano ZS a princip stanovení velikosti částic*

Na principu rozptylu záření pracuje přístroj Zetasizer Nano ZS, který se nejčastěji používá k měření velikosti částic, elektroforetické mobility proteinů, ke stanovení zeta potenciálu koloidů a nanočástic. Je vhodný k měření mikroeologických vlastností roztoků proteinů a polymerů. Umožňuje také měření molekulové hmotnosti a druhého viriálního koeficientu  $A_2$  makromolekul a  $k_D$  – interakčního parametru DLS. Zařízení může být využito u techniky SEC (vylučovací chromatografie) nebo FFF (frakcionace tokem v poli) jako detektor velikosti částic [59].

Zetasizer Nano ZS měří velikost částic v rozmezí 0,3 nm až 10  $\mu\text{m}$ , velikost částic při měření zeta potenciálu od 3,8 nm do 100  $\mu\text{m}$  a stanovuje molekulovou hmotnost v rozmezí 342 Da až  $2 \times 10^7$  Da [60].

Zetasizer se skládá ze šesti hlavních komponent. Jako zdroj světla využívá červený laserový paprsek o vlnové délce 633 nm, který prochází vzorkem uvnitř cely. Většina laserového paprsku prochází vzorkem přímo, avšak jeho určitá část je rozptýlena částicemi zkoumaného vzorku. K měření tohoto rozptýleného světla se používá detektor umístěný v úhlu 175° (NIBS – neinvazivní detekce zpětného rozptylu) nebo v úhlu 90° vzhledem ke směru laserového paprsku. Pokud je detekováno příliš mnoho světla, detektor může být přetížen, a proto je součástí zařízení zeslabovač, který sníží intenzitu laserového paprsku, a tím i intenzitu rozptýleného světla. Toho se využívá u vzorků s vyšší koncentrací nebo s větší velikostí částic [60].

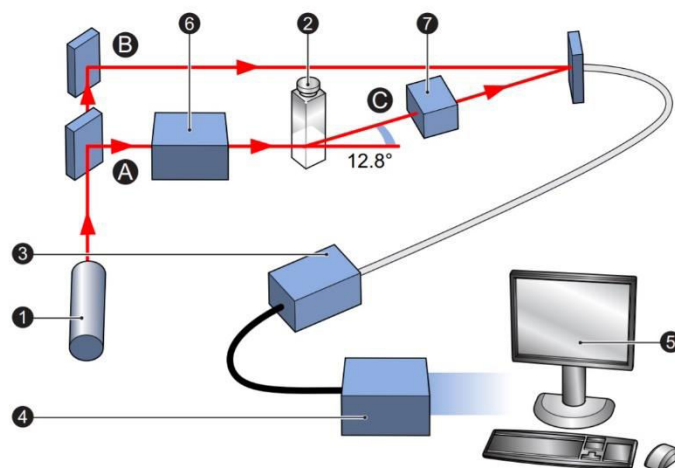


Obr. 15: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS zobrazující 6 hlavních komponent: laser (1), celi (2), detektor (3), zeslabovač (4), korelátor (5) a počítač (6) [60]

Detekovaný signál intenzity rozptylu je předán k digitálnímu zpracování tzv. korelátořem, který porovná změnu intenzity rozptylu během po sobě jdoucích časových intervalů. Informace z korelátoře jsou předány ke zpracování do počítače, kde software Zetasizer stanoví velikost částic v daném systému [60].

#### Stanovení zeta potenciálu pomocí Zetasizeru Nano ZS

Obdobně jako typický DLS systém popsany výše, Zetasizer obsahuje pro měření zeta potenciálu sedm hlavních komponent. Jako zdroj světla využívá laserový paprsek, který během měření zeta potenciálu rozdělí kompenzační optika na dva paprsky, které poté putují odlišnými směry. Jeden slouží jako referenční paprsek a druhý dopadá na květu se vzorkem. Laserový paprsek prochází středem vzorku, kde současně dochází k jeho rozptýlení, které je detekováno pod úhlem 12,8°. K omezení přetížení detektoru je před květu umístěn zeslabovač, který snižuje intenzitu záření laserového paprsku a zároveň i intenzitu rozptýleného světla [60].



Obr. 16: Schéma sedmi komponent přístroje ZetaSizer Nano ZS při měření zeta potenciálu: laser (1), cela (2), detektor (3), digitální procesor signálu (4), počítač (5), zeslabovač (6), kompenzační optika (7), dopadající (A), referenční (B) a rozptýlený paprsek (C) [60]

Bude-li působit na celu se vzorkem elektrické pole, částice se začnou pohybovat a způsobí tak fluktuaci intenzity detekovaného světla, kdy frekvence fluktuace by měla být úměrná rychlosti pohybu částic ve vzorku. Referenční a rozptýlený laserový paprsek prochází optickou soustavou sestávající z několika čoček. Čočky paprsky sloučí a dopraví na detektor. Detektor poskytne tyto informace digitálnímu procesoru signálu a následně jsou informace předávány do počítače. Software Zetasizer vytvoří na základě dat frekvenční spektrum, pomocí kterého lze vypočítat elektroforetickou mobilitu částic, a tím i určit hodnotu zeta potenciálu aplikací Henryovy rovnice:

$$U_E = \frac{2\varepsilon f(ka)}{3\eta}, \quad (6)$$

kde hodnota  $z$  značí zeta potenciál,  $U_E$  elektroforetickou pohyblivost částic,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta a  $\eta$  viskozita prostředí. Hodnota Henryovy funkce  $f(ka)$  závisí na dané aproximaci (hodnota 1,5 dle Smoluchowskiho aproximace, tj. pro částice větší než  $0,2 \mu\text{m}$  dispergované v elektrolytu o více než  $10^{-3}$  molární soli; hodnota 1 dle Hückelovy aproximace, tj. pro malé částice s nízkou dielektrickou konstantou) [56, 60].

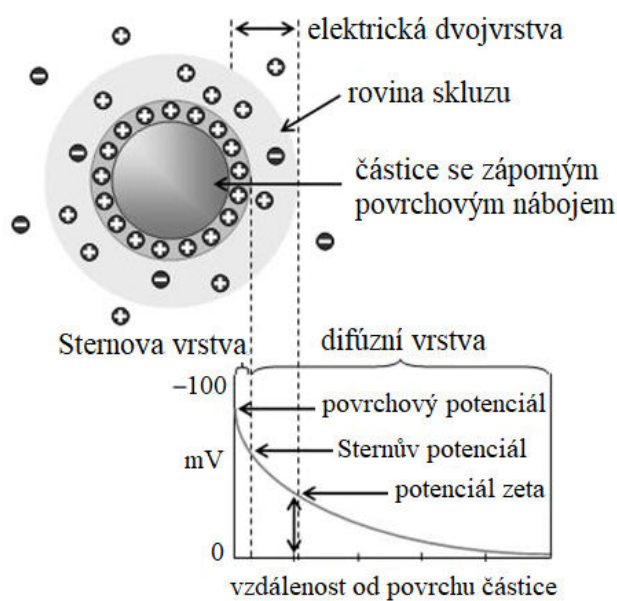
#### Princip elektroforetického rozptylu světla

Technika pro měření elektroforetické mobility částic koloidních systémů se nazývá elektroforetický rozptyl světla (ELS), jehož základním fyzikálním principem je jev zvaný elektroforéza, při které dochází k pohybu částic disperzní fáze v elektrickém poli. Primárně se metoda ELS používá k charakterizaci povrchových nábojů koloidních částic v kapalném disperzním prostředí. Vzhledem k malým rozměrům mají koloidní částice extrémně velký specifický povrch, který může ovlivnit chování koloidních systémů na fázovém rozhraní, zejména stabilitu a dispergaci [61].

Kolem každé nabitě koloidní částice se seskupují opačně nabitě ionty a na povrchu takovéto částice vznikají dvě nabitě vrstvy označované jako *elektrická dvojvrstva*. Kapalná



vrstva obklopující částice tvoří dvě oblasti. Vnitřní (Sternovu) vrstvu, kde působí adsorpční síly a ionty jsou pevně vázány k povrchu částice a vzdálenější, difúzní oblast, kde jsou tyto síly zanedbatelné. Díky přítomnosti povrchového náboje existuje mezi povrchem koloidních částic a roztokem určitý potenciálový rozdíl. Elektrochemický potenciál je dán celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny, zatímco elektrokinetický potenciál ( $\zeta$  potenciál, zeta potenciál) se vyskytuje na rozhraní mezi difúzní částí elektrické dvojvrstvy a tenkou vrstvou protiiontů poutaných k povrchu částice [53, 56].



Obr. 17: Sternův difúzní model elektrické dvojvrstvy [56]

Elektrický náboj dvojvrstvy charakterizuje a zároveň ovlivňuje stabilitu koloidních systémů jako důsledek existence elektrokinetických efektů, tedy kinetických dějů způsobených vlivem elektrického pole. Jsou známy čtyři základní typy elektrokinetických jevů, které jsou současně využitelné pro určení hodnoty elektrokinetického potenciálu. Hovoříme nejčastěji o elektroforéze, dále pak o elektroosmóze, sedimentačním potenciálu a potenciálu proudění [53, 56].

Během měření se sleduje rychlost, kterou se nabitá částice pohybují k opačně nabitá elektrodě metodou ELS, respektive metodou laserové dopplerové velocimetrie (LDV), která využívá rozptylu světla v úhlu  $17^\circ$  v kombinaci s referenčním paprskem. Intenzita signálu začne kolísat a frekvence fluktuace úměrně odpovídá rychlosti pohybu částic. Ze získané elektroforetické mobility lze jednoduše při znalosti viskozity a permitivity rozpouštědla určit zeta potenciál systému [56, 62].

Zeta potenciál ( $\zeta$ ) odpovídá náboji difúzní části dvojvrstvy a je mírou interakce částic. Je-li stanovena hodnota zeta potenciálu v rozmezí  $-30$  až  $30$  mV, vypovídá o nestabilitě systému. Částice nemají dostatečně velký náboj k tomu, aby se odpuzovaly, a může tak docházet k agregaci a vzniku asociátů. Koloidní systém je nejméně stabilní, je-li zeta potenciál nulový a je tedy dosaženo tzv. izoelektrického bodu. Nejdůležitějším parametrem, který ovlivňuje zeta potenciál je pH. Při nízkém pH získají částice kladný náboj a i křivka zeta potenciálu v závislosti na pH bude kladná a naopak [56].

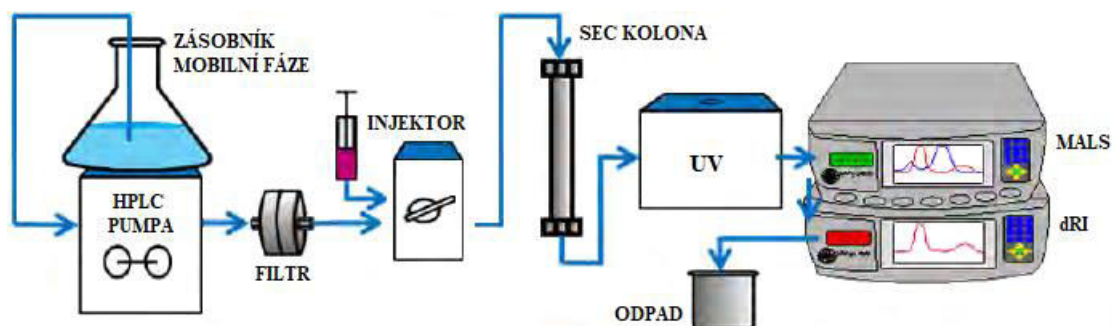
Jak je zřejmé ze schématu Sternova difúzního modelu elektrické dvojvrstvy (Obrázek 17), celkový potenciálový rozdíl se skládá z poklesu potenciálu difúzní části dvojvrstvy a z rozdílu potenciálů mezi vrstvami. Je-li vložen do systému elektrolyt, difúzní vrstva se bude stlačovat a stále více opačně nabitých iontů bude přecházet do adsorpční vrstvy. Zeta potenciál se bude snižovat tak dlouho, než dosáhne téměř nulové hodnoty. Naopak ředěním systému dochází k rozšíření difúzní vrstvy a narůstající hodnotě zeta potenciálu [53].

Zetasizer Nano ZS kombinuje jak metodu DLS, tak i ELS a umožňuje současně stanovit velikost částic i zeta potenciál.

### 2.5.2 SEC-MALS

Jedním z nejdůležitějších parametrů, díky kterým lze charakterizovat polymery, je jejich molekulová hmotnost. Pro její stanovení se jako nejvhodnější jeví technika SEC-MALS, která kombinuje rozměrově vylučovací chromatografii (SEC, z angl. size exclusion chromatography) s detektorem typu MALS (z angl. Multi angle light scattering) využívající statický rozptyl světla měřený ve více úhlech. Tato metoda dokáže přesně určit absolutní molekulovou hmotnost polymerů bez použití standardů a je schopna pokrýt široké spektrum molekulových hmotností [63].

Typické experimentální uspořádání SEC-MALS, které kombinuje detektor MALS s analýzou koncentrace pomocí absorpce UV/VIS nebo diferenciální refraktometrie (dRI) znázorňuje Obrázek 18 [64, 65].

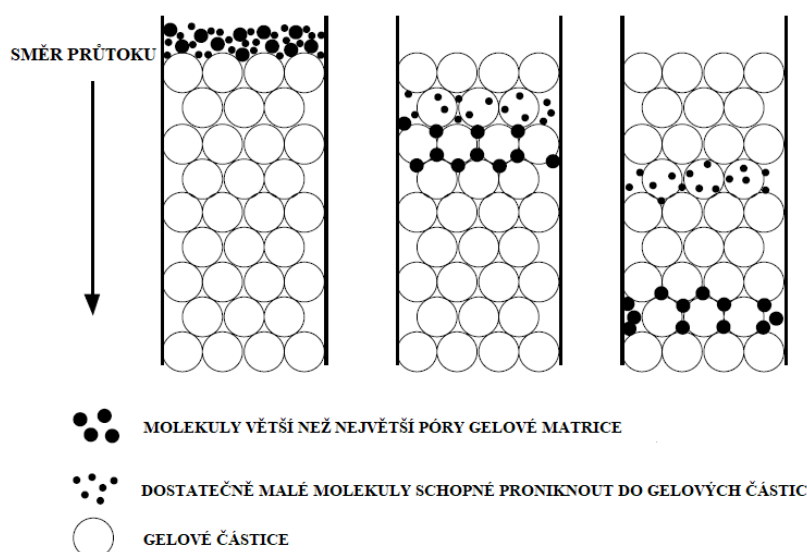


Obr. 18 Schéma přístroje SEC-MALS s UV a dRI detektorem [65]

Přístroj SEC-MALS se skládá ze zásobníku kapalné mobilní fáze, která je pomocí vysokotlaké pumpy dodávána přes filtr až do komory, kde se mísí se vzorkem. Ten je pomocí autosampleru vstřikován do mobilní fáze v podobě zředěného roztoku. Směs putuje do kolony, jejíž náplň (stacionární fáze) tvoří gelový materiál s kontrolovanou velikostí pórů, kterými biomolekuly difundují na základě rozdílu velikosti jejich molekul [65, 66].

Molekuly penetrují póry v různých stupních, přičemž nejmenší molekuly mohou pronikat nejdále do struktury pórů. V důsledku toho se nejprve eluují makromolekuly v prázdném objemu kolony (s nejkratšími retenčními časy), následované menšími molekulami s klesající velikostí. Nejmenší molekuly pak eluují v elučním objemu kolony a jejich retenční čas

je větší. Tento princip je obecně znám jako hlavní separační mechanismus SEC nazývaný sterické vyloučení [66, 67].



Obr. 19: Difundující molekuly analyzovaného vzorku skrz gelovou matrix v SEC koloně [68]

Po separaci v koloně vstupují molekuly do MALS detektoru, kde jsou ozařovány paprskem světla a jejich hmotnostní koncentrace v elučním rozpouštědle může být sledována jedním nebo vícero detektory. Existuje mnoho typů detektorů, které mohou být součástí systému SEC-MALS a lze je rozdělit do dvou hlavních kategorií – detektory citlivé na koncentraci (např. detektory dRI, UV a RI) a detektory citlivé na molekulovou hmotnost (detektory rozptylu světla) [68].

Intenzita rozptýleného světla je snímána detektory statického rozptylu světla umístěnými pod různými úhly. Počet úhlů v systému MALS se může pohybovat od 2 do 20, přičemž je rozptyl detekován současně v každém úhlu. Signál z detektoru je převeden do příslušného softwaru, který poskytne data k vytvoření grafu závislosti rozptýleného světla na úhlu detekce. Extrapolací úhlu detekce na nulovou hodnotu a prostřednictvím Rayleighova poměru  $R_\theta$  lze vypočítat molekulovou hmotnost makromolekul  $M_w$  analyzovaného vzorku:

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M_w} \right) \cdot P_\theta + 2A_2c, \quad (7)$$

kde  $K$  je konstanta,  $A_2$  druhý viriální koeficient a  $c$  koncentrace makromolekuly. Funkce rozptylu  $P_\theta$  se rovná jedné, jestliže je velikost molekuly menší než 10 nm. Za těchto podmínek lze rovnici zjednodušit:

$$R_\theta = M_w K \cdot c \quad (8)$$

Metoda SEC-MALS umožňuje také vypočítat gyrační poloměr a stanovit tak velikost molekul [69, 70].

### 2.5.3 Izotermická titrační kalorimetrie (ITC)

Izotermická titrační kalorimetrie (z anglického *Isothermal Titration Calorimetry* – ITC) patří mezi analytické metody používané ke studiu širokého spektra biomolekulárních interakcí v roztoku. Tato metoda poměrně rozsáhle zkoumá vazebné interakce makromolekul s malými ligandy, proteiny, nukleovými kyselinami, stejně tak i s kovy nebo léčivy. Jejím principem je přímé měření tepla, které se při interakci dvou látek absorbuje nebo uvolňuje [71, 72].

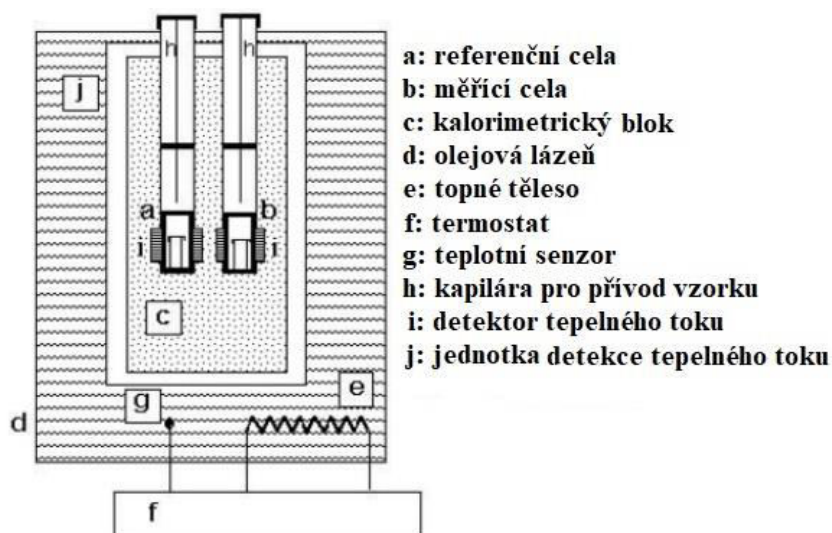
Experimenty se provádí titrací reaktantu do roztoku vzorku obsahujícího další reaktant potřebný pro reakci. V našem případě se jedná o titraci roztoku CTAB/Septonexu do roztoku hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti, přičemž reakce probíhají za konstantní teploty. Každý přídavek je ale doprovázen tepelnými efekty a tak lze z jediné kalorimetrické titrace získat úplný termodynamický popis interakčního systému a přesně stanovit všechny vazné parametry, jako je vazebná konstanta ( $K_D$ ), stechiometrie interakce ( $n$ ), entalpie ( $\Delta H$ ) a entropický příspěvek ( $-T\Delta S$ ) [43, 71, 73].

#### *Izotermický kalorimetr TAM III*

Izotermický mikrok calorimetr TAM III představuje vícekanálový, mikrok calorimetrický systém od společnosti TA Instruments, který poskytuje ultracitlivé měření tepelného toku. K provádění opakovaných nebo různých typů experimentů je vybaven čtyřmi na sobě nezávislými kalorimetry. Mikrok calorimetrie je univerzální technika, která za pomoci TAM III umožňuje studium tepelné aktivity všech chemických, fyzikálních i biologických procesů. Je zcela nedestruktivní a neinvazivní pro vzorek. Zřídka vyžaduje jakoukoliv předchozí úpravu vzorku. Touto metodou lze zkoumat pevné látky, kapaliny i plyny. Na rozdíl od jiných analytických technik poskytujících snímky dat, mikrok calorimetrie dává průběžně data v reálném čase vzhledem k současně probíhajícímu procesu. TAM III využívá patentovanou technologii termostatu na bázi kapaliny (s přesností 0,0001 °C) – minerálního oleje, který rychle odvádí teplo a minimalizuje teplotní gradienty v systému. Termostat je řízen softwarem TAM Assistant™ [74].

Pro účely této diplomové práce byl využit jeden z dostupných modulů – nanokalorimetr pro izotermickou titrační kalorimetrii. Při experimentu se využívá měřicí a referenční cela, obě o pracovním objemu 1 ml. Referenční cela je naplněna rozpouštědlem (v našem případě vodou) a v měřicí cele probíhá titrace tenzidu do roztoku polyelektrolytu za neustálého míchání. Jednotlivé přídavky tenzidu jsou řízeny automatickou pumpou [43].

Po každém přídavku tenzidu dojde v měřicí cele k reakci, což se projeví nárůstem nebo poklesem signálu tepelného toku. Tedy dojde ke změně teploty mezi měřicí a referenční celou, kterou doprovází vznik píku, jenž je tímto přístrojem kompenzován. Aby byla splněna podmínka izotermické reakce, signál je vždy směřován k nulové hodnotě. Počet píků vždy odpovídá počtu přídavků tenzidu v průběhu experimentu [43].

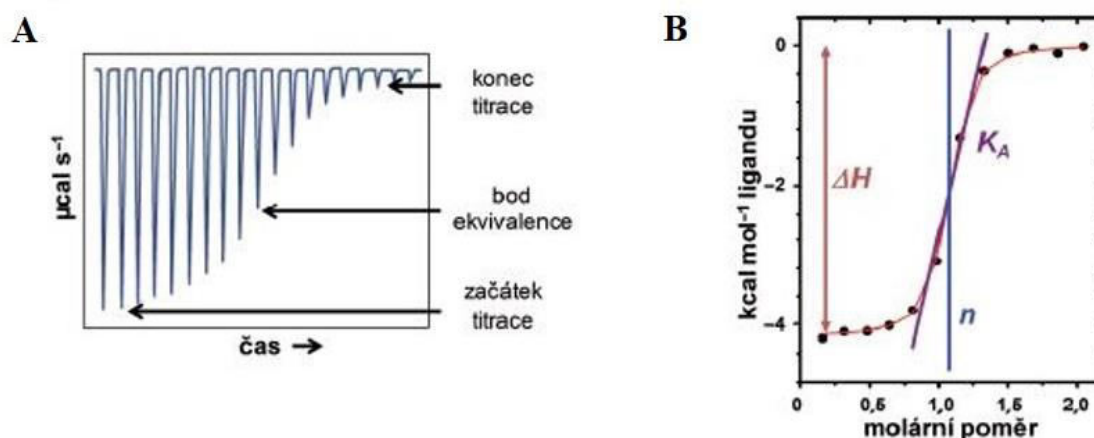


Obr. 20: Hlavní součásti titračního kalorimetru TAM III [75]

V případě, že pozorovaná reakce je exotermická, tedy dochází k uvolňování tepla, bude potřebné dodat celé se vzorkem méně tepla, aby byla udržena tepelná rovnováha s referenční celou. Tato změna tepla je zaznamenána v grafu jako funkce času (Obrázek 21A) a po integraci lze vytvořit v softwaru závislost entalpie na molárním poměru reagujících substancí (Obrázek 21B). Pokud během probíhající reakce mezi dvěma reaktanty nedochází k jiným entalpickým změnám, lze celkovou změnu volné energie interakce ( $\Delta G$ ) a entropický příspěvek interakce ( $-T\Delta S$ ) vyjádřit pomocí následujícího vztahu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A, \quad (9)$$

kde  $T$  je absolutní teplota a  $R$  je univerzální plynová konstanta [43].



Obr. 21: Teplo uvolněné při interakci dvou interakčních partnerů je zaznamenáno jako funkce času (A); po integraci jako závislost entalpie na molárním poměru interakčních partnerů (B) [43]

Podle směřování tepelného toku můžeme z grafu okamžitě posoudit, zda se jedná o reakci exotermní nebo endotermní. Záporná hodnota reakční entalpie (tj. teplo se uvolňuje) indikuje, že v reakci převládá energie uvolněná při tvorbě vazeb v produktu, zatímco kladná hodnota

entalpického příspěvku  $\Delta H_0$  (tj. teplo se spotřebovává) naznačuje, že v reakci převládá energie spotřebovaná na štěpení vazeb. Reakční změna entropie souvisí s výslednou neuspořádaností děje, přičemž záporné hodnoty  $\Delta S_0$  představují klesající neuspořádanost systému v důsledku titračních reakcí. Kladné hodnoty entropického příspěvku pak naznačují, že se neuspořádanost systému zvyšuje [76].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato kapitola nabízí přehled klíčových objevů dostupných z vědeckých publikací, týkajících se přípravy a vzniku polyelektrolytových komplexů hyaluronan-tenzid a jejich charakterizace pomocí různých instrumentálních metod.

Předmětem diplomové práce je studium interakcí hyaluronanu a kationických tenzidů, proto bude i následující výčet informací omezen na tuto problematiku.

Jednou z prvních průlomových prací zabývajících se interakcí hyaluronanu a kladně nabitého tenzidu, přesněji alkytrimethylamonium bromidu, je článek Thalberga a kol. [77]. Výzkum byl proveden s uvedeným tenzidem o různé délce uhlíkového řetězce, mající 8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíkových jednotek. K charakterizaci daného systému využili autoři této práce metodu NMR, solubilizaci barviv, měření vodivosti systému i pozorování separace fází. Získané údaje prokázaly, že HA je schopen interakce pouze s takovými povrchově aktivními látkami, které mají ve struktuře deset nebo více uhlíků, aby došlo ke vzniku ve vodě rozpustných komplexů. Tedy při reakci HA a tenzidu o 8 a 9 uhlících v alkylovém řetězci dochází k fázové separaci a srážení, doprovázené vznikem malého množství vysoce viskózního gelového materiálu. Důležitým vědeckým přínosem je fakt, že interakce mezi HA a opačně nabitým tenzidem vedou ke tvorbě agregátů podobných micelám vázajících se na polyelektrolytový řetězec.

Tento systém byl o několik let později zjednodušeně simulován jako model tzv. perlového náhrdelníku v článku Goswami a kol. [41], který ale platí pouze pro zředěné systémy. Ukazuje, jak hustota náboje PE řetězce ovlivňuje strukturu a dynamiku komplexu polyelektrolyt-povrchově aktivní látka. Vědci zjistili, že se zvyšujícími se hodnotami hustoty náboje na hlavním řetězci se mění struktura komplexu z tzv. perlového náhrdelníku na téměř sférický tvar.

Fukada, Suzuki a Seimiya [78] prezentovali studii interakcí mezi hyaluronanem sodným a decyltrimethylamonium bromidem (DTAB), pro kterou využili měření viskozity a dynamických smykových modulů. Výzkum omezili pouze na oblast s velkým přebytkem povrchově aktivní látky. Došli k závěru, že hyaluronan a DTAB tvoří kompaktní komplexy, jejichž velikost se zvyšuje se zvyšující se koncentrací surfaktantu, následované zvýšením vnitřní viskozity a hustoty spletení hyaluronanových řetězců.

Polyelektrolytovými komplexy a jejich odpovědí na přidávek NaCl se zabýval ve svých pracích Dautzenberg [79, 80], který se zaměřil zejména na časovou závislost strukturálních změn PEC, ke kterým dochází po rychlém přidání NaCl. V souvislosti s využitím polyelektrolytového komplexu jako nosiče enzymů bylo zkoumáno chování mezi Na-PSS a Na-PMA jako polyanionty a polykationem PDADMAC a jejich náhodnými kopolymery s akrylamidem. S využitím turbidimetrie a víceúhlého statického rozptylu světla prokázal, že u komplexů se silnými iontovými skupinami dochází po přidavku soli k sekundární agregaci a flokulaci, zatímco při nízké iontové síle byla pozorována dezintegrace částic. Tato studie ukazuje, že i malé množství soli v přítomnosti PECs může ovlivnit jejich praktické využití, zejména v oblasti nosičových systémů léčiv nebo enzymů.

Další z prací zaměřenou na chování komplexu hyaluronan-tenzid ve fyziologickém prostředí je práce Halasové a kol. [12]. Přítomnost chloridu sodného může potlačit interakce mezi polyelektrolytem a opačně nabitou povrchově aktivní látkou, přesto bylo pomocí techniky fluorescenční sondy (pyren) prokázáno, že v některých systémech, jako je komplex

hyaluronan-tenzid, tyto interakce přetrvávají, aniž by byl brán zřetel na iontovou povahu PAL. V přítomnosti hyaluronanu dochází k tvorbě agregátů (micel) v určitém koncentračním rozmezí přidaného tenzidu. Největší vliv hyaluronanu byl pozorován u neionického tenzidu Tween 20, kdy došlo k výraznému poklesu CMC. U kationického CTAB se CMC v přítomnosti hyaluronanu výrazně zvýšila, pravděpodobně působením silných hydrofobních interakcí alkylových řetězců CTAB s málo polárními částmi hyaluronanu. Tenziometrie neprokázala téměř žádné změny v CMC takovýchto systémů.

Jak naznačuje článek Lapitskyho a kol. [81], interakce mezi polyelektrolytem a povrchově aktivní látkou lze charakterizovat jedinečnou metodou – izotermickou titrační kalorimetrií (ITC), přičemž je měřeno teplo, které je absorbováno nebo generováno při interakci mezi molekulami. ITC se používá jak k určení agregačních parametrů PAL, tak i k dalším termodynamickým parametrům systému.

Metodu ITC využil pro zkoumání interakce mezi různými polysacharidy a iontovými PAL ve vodných roztocích Bao a kol. [82]. Použili šest různých kombinací neutrálních, pozitivních a negativně nabitých polysacharidů (methylcelulóza, chitosan a  $\kappa$ -karagenan) s aniontovými a kationtovými PAL (SDS, CTAB). Karagenan představuje typický aniontový polysacharid, zatímco CTAB zastupuje kationtovou PAL. Výsledky ITC prokázaly silnou hydrofobní vazbu a elektrostatické interakce mezi polymerním řetězcem a molekulami surfaktantu. Interakce takového systému je velmi blízká naší studii a několika dalším vědeckým publikacím z Fakulty chemické, VUT Brno, jako je např. práce Krouské [83]. Různými fyzikálně-chemickými metodami byl studován vliv záporně nabitého HA (s různou molekulovou hmotností a koncentrací) na agregační vlastnosti kationtové PAL – CTAB a TTAB (trimethylamonium bromid). Měření povrchového napětí výše zmíněných PAL v roztoku  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl s přidavkem hyaluronanu bylo prokázáno, že agregační koncentrace CTAB a TTAB nebyly ovlivněny přidavkem hyaluronanu a nedošlo k fázové separaci. Naopak v přítomnosti vody hyaluronan snižuje pouze hodnoty povrchového napětí, ale neovlivňuje agregační oblast. Pro popis interakcí HA-CTAB a HA-TTAB z termodynamického hlediska byla použita mikrokolorimetrie, přičemž byly prokázány elektrostatické interakce a fázová separace systému. Ta je u HA-CTAB posunuta do vyšší koncentrace tenzidu a HA-TTAB se posune do nižší koncentrace tenzidu.

Na předchozí práci později navázala Krouská a kol. [45] studiem termodynamiky tvorby micel kationtových tenzidů (CTAB a TTAB) s i bez přidavku hyaluronanu ve vodném prostředí metodou titrační kalorimetrie. Interakce byly pozorovány nejprve vizuálně, kdy během titrace roztoku PAL do roztoku hyaluronanu se nově vzniklý systém změnil z čirého na neprůhledný, poté na zakalený a na konci experimentu byla pozorována fázová separace až do vysráženého stavu. Kalorimetrie ukázala, že separace fází nastává, jsou-li náboje na surfaktantu a HA v rovnováze. Naproti tomu turbidimetrie a potenciometrie prokázaly, že k interakci hyaluronanu a povrchově aktivní látky dochází již při velmi nízkých koncentracích PAL. Také byly pozorovány rozdíly mezi systémy HA-CTAB a HA-TTAB. Bylo zjištěno, že se na interakci hyaluronanu a povrchově aktivní látky vedle elektrostatického působení významně podílí také hydrofobní účinky.

K charakterizaci polydisperzity hyaluronanu využila v publikaci Krutišová a kol. [84] dvou metod: dynamického rozptylu světla a Laserové dopplerovy velocimetrie. Za elektrostatického působení byly připraveny nanočástice kyseliny hyaluronové s kladně



nabitou molekulou CTAB ve vodném prostředí i ve fyziologickém roztoku (0,15 mol.dm<sup>-3</sup> NaCl). Bylo zjištěno, že systém HA-tenzid tvoří částice v jednotkách stovek nanometrů a tato velikost částic byla v roztoku NaCl menší než ve vodě. Výsledky studie ukázaly, že větší agregáty vznikají v blízkosti bodu nulového náboje, zároveň má systém HA-CTAB nulový zeta potenciál a taková nestabilita systému vede k oddělení fází. Stabilitou nanočástic tvořených hyaluronanem a kationickým tenzidem Septonexem se zabývá práce Pilgrové a Pekaře [85]. Tenzid tvoří hydrofobní jádro nanočástic, zatímco hyaluronan hydrofilní obal. S využitím metod DLS a fluorescenční spektroskopie bylo prokázáno, že nanočástice HA-tenzid jsou ovlivňovány celou řadou faktorů, jako je teplota, iontová síla roztoku i doba skladování, přičemž molekulová hmotnost HA ovlivňuje stabilitu tohoto systému nejméně. Připravené nanočástice ale nevykazovaly dostatečnou stabilitu k tomu, aby byly schopny po zředění systému udržet aktivní hydrofobní látky v jádru.

Vědeckým článkem významně přispěl do oblasti medicínských aplikací Felipe A. Oyarzun-Ampuero a kol. [86], který se zabýval vývojem nových lékových nanonosičů nazývaných hyaluronanové nanokapsle (HA nanokapsle). Ty jsou složené z lipidového jádra a obalu tvořeného kyselinou hyaluronovou. Byly připraveny technikou umožňující tvorbu polymerního pláště kolem lipidového jádra využívající kationický tenzid (CTAB, BKC (benzalkonium chlorid)) jako mezifázový můstek. Nanokapsle mají sloužit jako intracelulární nosičový systém pro hydrofobní léčiva (chemoterapeutika: paclitaxel a docetaxel) s hlavním využitím zejména pro léčbu rakoviny. Studie in vitro na buněčných kulturách (NCI-H460 buněčná linie rakoviny) následně prokázala, že díky zapouzdření docetaxelu v jádru nanokapslí se výrazně zvyšuje jeho cytotoxicita.

K charakterizaci hyaluronanu použil Waters a Leiske [87] 7 různých vzorků HA. Ukázalo se, že jedinečná kombinace přístroje MALS, diferenciálního viskozimetru a refraktometru se SEC je ideální sestavou pro zkoumání vlastností biopolymeru HA, včetně absolutní molekulové hmotnosti, informaci o poloměru a distribuci molekulové hmotnosti. Hodnoty byly v souladu s daty z předešlých let.

Chytil a spol. [46] využili kombinaci technik SEC-MALS a ITC k charakterizaci makromolekulárních vlastností interakce hyaluronanu (nativního i modifikovaného) s povrchově aktivními látkami – SDS a DTAB ve vodném prostředí. Prudké změny endotermických entalpií během titrace HA-DTAB svědčí o silné elektrostatické interakci a tvorbě komplexních agregátů. Naopak tepelné změny titrace HA-SDS neodhalují žádnou vazebnou reakci, pouze snížení CMC povrchově aktivní látky. Výsledky experimentů prokazují vhodnost metody ITC pro studium interakcí prezentovaného typu. Grafy naznačují, že modifikace HA významně nemění jeho makromolekulární chování. Metoda SEC-MALS ukázala větší perzistenční délku, tedy i větší tuhost u modifikovaného řetězce, než u řetězce nativního HA.

Studii vlastností polyelektrolytových komplexů hyaluronan/chitosan se zabýval Laleveé a kol. [88]. Byly zkoumány kritické parametry, které ovlivňují proces tvorby HA/CH komplexů a představují přechod z homogenních vodných roztoků na koloidní suspenze nebo gelové koacerváty. K charakterizaci systému autoři aplikovali vizuální pozorování v kombinaci s DLS a reologickými vlastnostmi PECs. Pro kontrolu tvorby komplexů těchto dvou polysacharidů využili přísadku NaCl do PE roztoku k zobrazení elektrostatických nábojů obou polyelektrolytů. Bylo prokázáno, že vlastnosti vzniklých komplexů jsou závislé

na molární hmotnosti, stupni acetylce chitosanu i na zbytkové koncentraci soli. Při nízkém poměru nábojů ( $r = n\text{NH}_3^+/n\text{COO}^-$ ) se systém vyskytuje ve formě koloidních suspenzí, při zvýšení poměru náboje vytváří koacerváty. Ve které formě se bude komplex HA/CH vyskytovat závisí na molekulové hmotnosti chitosanu. HA i chitosan jsou známy pro své jedinečné biologické vlastnosti, a proto jsou perfektními biomateriály vhodnými ke studiu HA/CH a dalších polyelektrolytových systémů.

## 4 CÍL PRÁCE

Práce je zaměřena na interakce mezi záporně nabitým hyaluronanem a opačně nabitými povrchově aktivními látkami. Na základě literární rešerše byli zvoleni jako zástupci tenzidů CTAB a Septonex, kteří poskytují vazbou na hyaluronan polyelektrolytové komplexy. Jedním z hlavních cílů je stanovení entalpie micelizace a kritických koncentrací povrchově aktivních látek, které mohou v přítomnosti hyaluronanu s různou molekulovou hmotností vytvářet micely či agregáty.

Předpokládá se, že s využitím metody dynamického rozptylu světla a izotermické titrační kalorimetrie lze charakterizovat systém hyaluronan-tenzid ve větším rozsahu, než nabízí jiné vědecké publikace využívající pro studium takovýchto či obdobných komplexů odlišné instrumentální metody. Nové poznatky o chování kationických povrchově aktivních látek v přítomnosti hyaluronanu jsou zásadní pro případné použití takového komplexu v cílené distribuci léčiv.

Práce by měla přispět k zodpovězení otázek týkajících se aplikací povrchově aktivních látek v kombinaci s hyaluronanem a použití vhodných metod pro vytvoření požadovaného systému, využitelného k případné inkorporaci léčiva a následné aplikaci v medicíně.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Charakterizace materiálu

#### 5.1.1 Hyaluronan sodný

Hlavním materiálem používaným pro experimenty v této diplomové práci byl polysacharid hyaluronan sodný (Contipro, a.s., Dolní Dobrouč). Pro účely této práce byly zvoleny tři molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Tab. 1: Vybrané vzorky hyaluronanu sodného

Materiál	Molekulová hmotnost	Šarže
LMW HA	8–15 kDa	213-6147
MMW HA	250–450 kDa	230215-E1
HMW HA	1400–1600 kDa	181214-4-D1

#### 5.1.2 Tenzidy

Dále byly v této diplomové práci použity dva kationické tenzidy, a to CTAB a Septonex (Sigma Aldrich).

Tab. 2: Vybrané kationické tenzidy

Materiál	Molekulová hmotnost	Šarže	CAS
CTAB	364,45 g·mol <sup>-1</sup>	SLBJ9504V	57-09-0
Septonex	422,28 g·mol <sup>-1</sup>	511SEPT003	10567-02-9

Jako rozpouštědlo byla u všech připravovaných vzorků použita ultračistá voda ze systému PureLab flex ELGA.

### 5.2 Použité přístroje

#### *Analytické váhy*

K navažování příslušného množství tenzidů a hyaluronanů byly použity analytické váhy 224A od firmy DENVER INSTRUMENT, s přesností na 0,0001 g a váživostí do 220 g.

#### *Zetasizer Nano ZS*

Pro měření velikosti částic a zeta potenciálu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments společně s připojeným titrátorem MPT-2 Multi Purpose stejné firmy.

*Velikost částic a molekul:*

rozsah měření:	0,3 nm – 10 mikronů
princip měření:	dynamický rozptyl světla
minimální objem vzorku:	12 $\mu$ l
citlivost	0,1 mg/ml (lysozym)

*Zeta potenciál*

rozsah měření:	3,8 nm – 100 mikronů
princip měření:	elektroforetický rozptyl světla
minimální objem vzorku:	150 $\mu$ l (20 $\mu$ l za použití difúzní bariéry)
přesnost:	0,12 $\mu$ m·cm/Vs pro vodní systémy používající standardní referenční materiál

*Molekulová hmotnost*

rozsah měření:	980 Da – 20 MDa
princip měření:	statický rozptyl světla
minimální objem vzorku:	12 $\mu$ l

### **TAM III**

Charakterizace tepelných změn systému HA-tenzid a určení entalpie micelizace bylo provedeno pomocí vícekanálového izotermického mikrokolorimetru TAM III od společnosti TA Instruments (USA), s využitím titrační cely o objemu 1 ml.

### **SEC-MALS**

Molekulová hmotnost vzorků byla stanovena pomocí přístroje SEC-MALS. Analyzovaný vzorek je nejprve nastříknut do kolony, ve které probíhá separace podle velikosti částic. Pro účely této práce byla použita kolona PL aquagel-OH MIXED 8  $\mu$ m (vhodná pro měření molekulové hmotnosti v rozsahu 6 000 Da až 10 000 000 Da), respektive kolona PL aquagel-OH 30 (pro měření molekulové hmotnosti v rozsahu 100 Da až 60 000 Da). SEC-MALS kolony byly vyrobeny firmou Agilent Technologies (USA). Předseparované frakce analyzovaných vzorků následně vstupují do jednotlivých detektorů. V rámci měření byl použit MALS detektor (DAWN HELEOS II), diferenční viskozimetr (VISCOSTAR II) a diferenční refraktometr (OPTILAB T-REX), které jsou dodávány firmou Wyatt Technology (USA).

Dále bylo použito běžné laboratorní sklo, mikropipety a další laboratorní vybavení.

## 5.3 Příprava vzorků

### 5.3.1 Srážecí experimenty

Pro přesnější určení vhodné koncentrace tenzidu potřebné pro sledování vzniku komplexu během titrace byly nejprve provedeny tzv. srážecí experimenty ve vialkách mimo měřicí cely přístrojů, aby bylo možné pozorovat agregaci vizuálně. Tyto experimenty sloužily jako simulace měření v přístrojích, to znamená, že k roztoku hyaluronanu byl jednorázově přidán roztok tenzidu v takovém poměru, v jakém bude na konci titrací.

Do průhledné vialky byly vždy napipetovány 2 cm<sup>3</sup> zásobního roztoku hyaluronanu o koncentraci 5 g·dm<sup>-3</sup> a takové množství 20 mmol·dm<sup>-3</sup> tenzidu, aby konečná koncentrace tenzidu v roztoku odpovídala předem zvolené koncentrační řadě (0,1; 0,75; 1; 5; 10 mmol·dm<sup>-3</sup>). Vialky byly uzavřeny, protřepány a ponechány na vodorovném povrchu k vizuálnímu pozorování.

### 5.3.2 Příprava zásobních roztoků pro měření velikosti částic a zeta potenciálu

Na analytických vahách bylo naváženo příslušné množství hyaluronanu sodného o dané molekulové hmotnosti, které bylo následně rozpuštěno v 50 ml ultračisté vody. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky HA o koncentraci 1 g·dm<sup>-3</sup> (1400–1600 kDa), o koncentraci 2 g·dm<sup>-3</sup> (250–450 kDa) a o koncentraci 5 g·dm<sup>-3</sup> (8–15 kDa). Vzorky byly pro perfektní rozpuštění ponechány na magnetické míchačce po dobu cca 24 hodin. Připravené zásobní roztoky hyaluronanu sodného byly uchovávány v lednici při teplotě do 5 °C.

Zásobní roztoky kationických tenzidů (CTAB, Septonex) byly připraveny navážením příslušného množství tenzidu do lahve se šroubovacím uzávěrem a doplněny ultračistou vodou na požadovaný objem. Poté byla lahev se vzorkem ponechána na magnetické míchačce až do úplného rozpuštění tenzidu. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky CTAB i Septonexu o koncentraci 20 mmol·dm<sup>-3</sup>, které byly nadále uchovávány při laboratorní teplotě.

### 5.3.3 Příprava zásobních roztoků pro mikrokalorimetrii

Připravené zásobní roztoky hyaluronanu sodného o koncentraci 1, 2 i 5 g·dm<sup>-3</sup> pro měření velikosti částic byly využity také pro izotermickou titrační kalorimetrii.

Zásobní roztoky tenzidů pro ITC byly připraveny obdobným způsobem jako v bodě 5.3.2, s tím rozdílem, že byla zvolena koncentrace CTAB i Septonexu nejprve 50 mmol·dm<sup>-3</sup>. Taková koncentrace se později ukázala jako nevhodná, proto byly připraveny také zásobní roztoky tenzidů o koncentraci 35 mmol·dm<sup>-3</sup> rozpuštěním daného množství tenzidu v ultračisté vodě. Nádoby s připravovaným zásobním roztokem byly do úplného rozpuštění tenzidu ponechány na magnetické míchačce.

### 5.3.4 Příprava zásobních roztoků a vzorků pro měření na přístroji SEC-MALS

Zásobní roztoky hyaluronanu sodného o koncentraci 1, 2 a 5 g·dm<sup>-3</sup> byly připraveny stejným způsobem jako v bodě 5.3.2. Jednotlivé zásobní roztoky byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,45 μm do skleněné vialky o 2 cm<sup>3</sup>. Takto připravené

vzorky byly podrobeny měření na přístroji SEC-MALS za účelem charakterizace přesné molekulové hmotnosti HA.

S využitím výsledků z titračního stanovení kritických agregačních koncentrací tenzidů v roztocích hyaluronanu o dané molekulové hmotnosti na přístroji Zetasizer Nano ZS byly také připraveny systémy HA-CTAB a HA-Septonex za bodem této kritické agregační koncentrace. Vždy ke 2 ml zásobního roztoku HA o koncentraci 1, 2 a 5 g·dm<sup>-3</sup> bylo do skleněné vialky napipetováno příslušné množství 20 mmol·dm<sup>-3</sup> tenzidu, jak ukazuje následující tabulka:

Tab. 3: Příprava systému HA-CTAB a HA-Septonex pro analýzu SEC-MALS

Materiál	CTAB [μl]	CTAB [mM]*	Septonex [μl]	Septonex [mM]*
HMW HA	350	3,5	450	4,5
MMW HA	800	8	700	7
LMW HA	1000	10	900	9

\* konečná koncentrace tenzidu v roztoku

Takto připravené vzorky byly ponechány na magnetické míchačce po dobu několika hodin a poté přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,5 μm do skleněné vialky o 2 cm<sup>3</sup>. Cílem bylo ověřit, zda při filtraci dojde k odstranění vzniklých agregátů hyaluronan-tenzid a dojde tak k prudkému poklesu molekulové hmotnosti vzorku.

## 5.4 Popis nastavení měření

### 5.4.1 Měření na přístroji Zetasizer Nano ZS

Před každým měřením bylo napipetováno 10 ml zásobního roztoku hyaluronanu o dané molekulové hmotnosti do plastové zkumavky se závitem, do níž bylo vloženo magnetické míchadlo. Zkumavka s titrovaným roztokem byla následně připevněna k autotitrátoru MPT-2. Další zkumavka se závitem byla naplněna 20 mmol·dm<sup>-3</sup> zásobním roztokem CTAB nebo Septonexu a umístěna do pozice vyžadující nasávání titračního činidla. Rovněž byla k autotitrátoru připevněna kapilární kyveta DTS1070.

V softwaru Zetasizer (mód Size and Zeta Potencial) byl nastaven průběh titračních experimentů. Vzorky byly vytemperovány na 25 °C po dobu 60 s, přičemž byl roztok hyaluronanu titrován roztokem tenzidu. V nastavení softwaru byla jako materiál vybrána kyselina hyaluronová a jako rozpouštědlo voda.

Každý bod analýzy nám poskytl informaci vždy o třech měřeních zeta potenciálu a třech měřeních Z-průměru velikosti částic. Koncentrační rozmezí bylo nastaveno pro HMW HA od 0 do 5 mmol·dm<sup>-3</sup>, pro MMW HA a LMW HA-Septonex od 0 do 7 mmol·dm<sup>-3</sup> a pro analýzu LMW HA-CTAB bylo toto rozmezí nastaveno od 0 do 10 mmol·dm<sup>-3</sup> vzhledem k detekci izoelektrického bodu až nad hodnotami koncentrace 9 mmol·dm<sup>-3</sup>.

Získané hodnoty zeta potenciálu a velikosti částic z provedených měření byly v programu MS Excel zprůměrovány a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky. Tyto odchylky jsou v grafech zobrazeny v podobě chybových úseček.

#### 5.4.2 Měření na přístroji SEC-MALS

Jednotlivé vzorky byly mikrostríkačkou injektovány na příslušnou kolonu za současného přívodu mobilní fáze autosamplerem. Jako mobilní fáze byl použit dusičnan sodný o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  s přídavkem azidu sodného o koncentraci  $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Objem nástřiku každého analyzovaného vzorku do systému byl  $100 \text{ } \mu\text{l}$  a průtok tímto systémem byl nastaven na  $0,6 \text{ cm}^3$  za minutu, s výjimkou vzorků s HMW HA, u kterých byl průtok nastaven na  $0,4 \text{ cm}^3/\text{min}$  proto, aby bylo zabráněno tzv. degradaci „stříhem“ řetězce vysokomolekulární HA. Jako inkrement indexu lomu byla zadána hodnota  $0,165 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , která přísluší kyselině hyaluronové. Všechna naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Astra 6.1 a následně exportována do programu MS Excel, kde byla dále zpracována.

#### 5.4.3 Měření na přístroji TAM III

Před samotnou analýzou na přístroji TAM III bylo do cely o objemu  $1 \text{ ml}$  napipetováno  $750 \text{ } \mu\text{l}$  zásobního roztoku hyaluronanu sodného. Cella se vzorkem byla připevněna k nanokalorimetru s míchadélkem a ten vložen do kalorimetrického bloku přístroje TAM III. Referenční cello byla naplněna  $1 \text{ ml}$  destilované vody. Rychlost míchání byla nastavena prostřednictvím softwaru TAM Assistant<sup>TM</sup> na hodnotu  $100 \text{ rpm}$ .

Pomocí skleněné pipety byl vzorek tenzidu převeden do stríkačky s pístem a ocelovou kapilárou. Stríkačka byla umístěna do automatické pumpy a kapilára zasunuta skrz hřídel až do správné polohy v měřicí cele.

Pro takto připravený systém byly pomocí softwaru nastaveny parametry pro titrační experimenty a to tak, že vždy po  $15 \text{ minutách}$  došlo k přídavku  $5 \text{ } \mu\text{l}$  tenzidu (titračního činidla) do roztoku hyaluronanu, aby konečný počet přídavků dosáhl  $50$  (tedy zbývajících  $250 \text{ } \mu\text{l}$  do celkového objemu cely  $1 \text{ ml}$ ).

V každém bodě analýzy (po každém přídavku tenzidu) byla změřena tepelná změna systému a přístrojem vyhodnocena plocha každého píku v joulech. Plochy píků v závislosti na přídavku a aktuální koncentraci tenzidu v systému byly v programu MS Excel přepočítány na změnu entalpie  $\Delta H$  (kJ/mol). Následně byly sestrojeny grafy entalpické změny systému HA-CTAB a HA-Septonex v závislosti na koncentraci.

Stejným způsobem a za stejných podmínek byly také proměřeny slepé vzorky (blanky). K  $750 \text{ } \mu\text{l}$  zásobního roztoku hyaluronanu byla namísto tenzidu titrována destilovaná voda, vždy po  $5 \text{ } \mu\text{l}$  po  $15 \text{ minutách}$ . Naměřená data byla následně zpracována v programu MS Excel.



## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Charakterizace hyaluronanu

Pro charakterizaci přesné molekulové hmotnosti studovaných vzorků hyaluronanu byla využita metoda SEC-MALS, pracující na principu separace molekul na koloně podle molekulového síta. Výsledné chromatogramy s křivkami molekulových hmotností a jejich distribuce podél píku daného vzorku jsou uvedeny v příloze této diplomové práce.

Tab. 4: Charakteristika použitých vzorků LMW, MMW a HMW hyaluronanu

Materiál	Molekulová hmotnost [kDa]	Koncentrace HA [mg/ml]	MHS(a)
LMW HA	7,9±0,1	3,36±0,23	0,823±0,006
MMW HA	258,3±1,5	1,50±0,16	0,484±0,026
HMW HA	1420,1±16,5	0,72±0,10	0,498±0,010

Naměřená data vyhodnocená programem Astra 6.1 nám kromě přesné molekulové hmotnosti hyaluronanu také poskytují informace o přesné koncentraci hyaluronanu v roztoku. Stejně tak bylo možné pomocí detektoru VISCOSTAR II stanovit konformaci molekuly hyaluronanu prostřednictvím Mark-Houwink-Sakurada (MHS) grafu, vyjadřující vztah mezi vnitřní viskozitou roztoku a molární hmotností HA. Získané hodnoty MHS(a) pro nízkomolekulární hyaluronan napovídají, že se jedná o lineární polymer v dobrém rozpouštědle. Hodnoty středněmolekulárního a vysokomolekulárního HA blíží se 0,5 odpovídají klubkovité konformaci lineárního polymeru v theta rozpouštědle, viz Tabulka 4.

### 6.2 Srážecí experimenty

Vzhledem k tomu, že byl pro tyto experimenty zvolen hyaluronan sodný o nízké molekulové hmotnosti (8–15 kDa), byla jak u systému HA-CTAB, tak i u systému HA-Septonex pozorována pouhá změna zakalení roztoku. Se zvyšující se koncentrací tenzidu přechází roztok z transparentního, přes mírně zakalený až k mléčnému zbarvení. Předpokládá se, že změna v mléčné zbarvení značí počátek tvorby agregátů a vznik PE systému HA-tenzid, který se ukázal znatelnější u systému HA-CTAB.



Obr. 22 Vizuální pozorování vzniku systému HA-CTAB a HA-Septonex pomocí srážecích experimentů

Obrázek 22 představuje fotografii pořízenou během srážecích experimentů, která zachycuje směsi tenzidů s hyaluronanem během vizuálního pozorování. Lze odvodit, že u vzorků HA-CTAB by se možná kritická agregační koncentrace tenzidu v roztoku mohla pohybovat mezi 5–10 mmol·dm<sup>-3</sup>, u systému HA-Septonex dochází k sytějšímu zakalení až v oblasti kolem 10 mmol·dm<sup>-3</sup>.

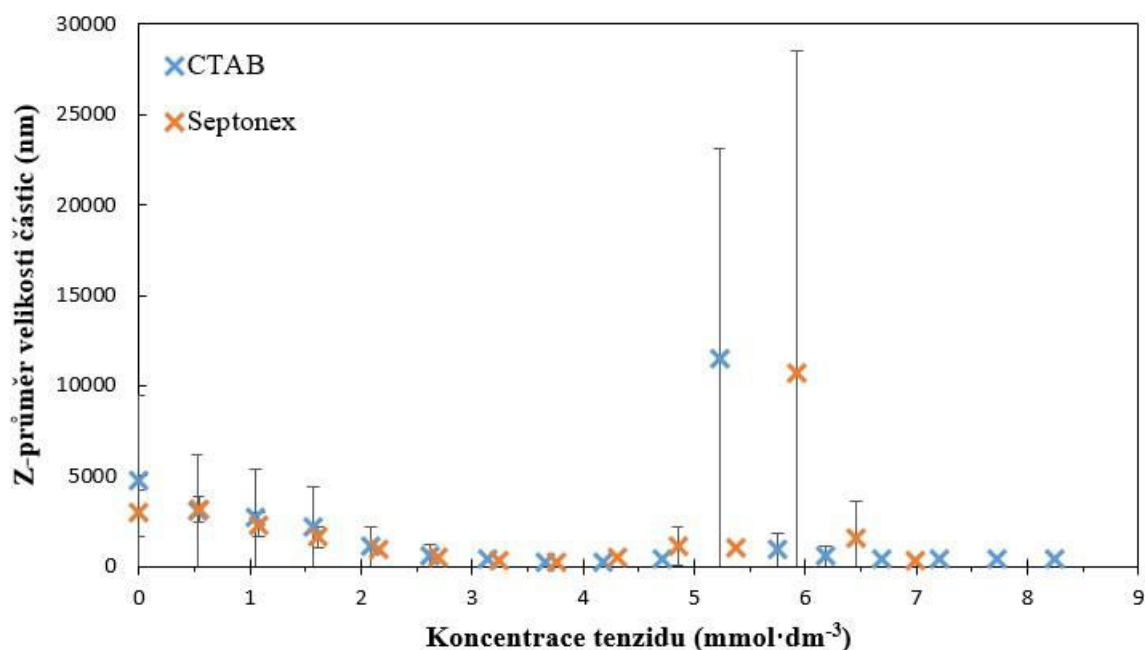
Vyozorované koncentrační rozmezí tenzidů bylo využito pro nastavení parametrů měření na přístroji Zetasizer Nano ZS, avšak přesné koncentrace tenzidů pro detekci agregace tenzidu s biopolymerem byly nalezeny až během těchto titračních experimentů.

### 6.3 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

Titrační analýza směsí tenzidů s hyaluronanem různých molekulových hmotností poskytuje dokonalý přehled o počátku agregace a vzniku polyelektrolytového komplexu, který je charakterizován sledováním změn velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na přídatku tenzidu. Titrace doprovází také změna polydispersity systému.

Pro titrační experimenty byly použity roztoky kationických tenzidů – CTAB a Septonexu, které byly titrovány do příslušného roztoku hyaluronanu o koncentraci 1 g·dm<sup>-3</sup>, 2 g·dm<sup>-3</sup> nebo 5 g·dm<sup>-3</sup>.

Obrázek 23 představuje titrační křivky získané během titrace 20 mmol·dm<sup>-3</sup> tenzidu do roztoku středněmolekulárního hyaluronanu (2 g·dm<sup>-3</sup>).



Obr. 23: Graf závislosti Z-průměru velikosti částic na koncentraci tenzidu; titrace CTAB/Septonexu do roztoku MMW HA

Z naměřených dat byla sestrojena závislost Z-průměru velikosti částic (nm) na koncentraci (resp. na přídatku) tenzidu v mmol·dm<sup>-3</sup>. Z Obrázku 23 je zřejmé, že k nárůstu velikosti částic dochází při koncentraci cca 4,3 mmol·dm<sup>-3</sup> Septonexu v systému a při koncentraci přibližně 4,7 mmol·dm<sup>-3</sup> CTAB v systému.

Pro určení hodnoty kritické agregační koncentrace byla zvolena metoda průsečíku dvou rovnic regresních přímek. Z výše uvedených závislostí (Obrázek 23) je možné pozorovat agregaci molekul při skokovém nárůstu Z-průměru velikosti částic. Byly proto vybrány vhodné body před a po této agregaci, které byly následně proloženy přímkami s odlišnými směrnici. Průsečík těchto přímek odpovídá hledané CAC, která značí počátek agregace provázející vznik polyelektrolytového komplexu.

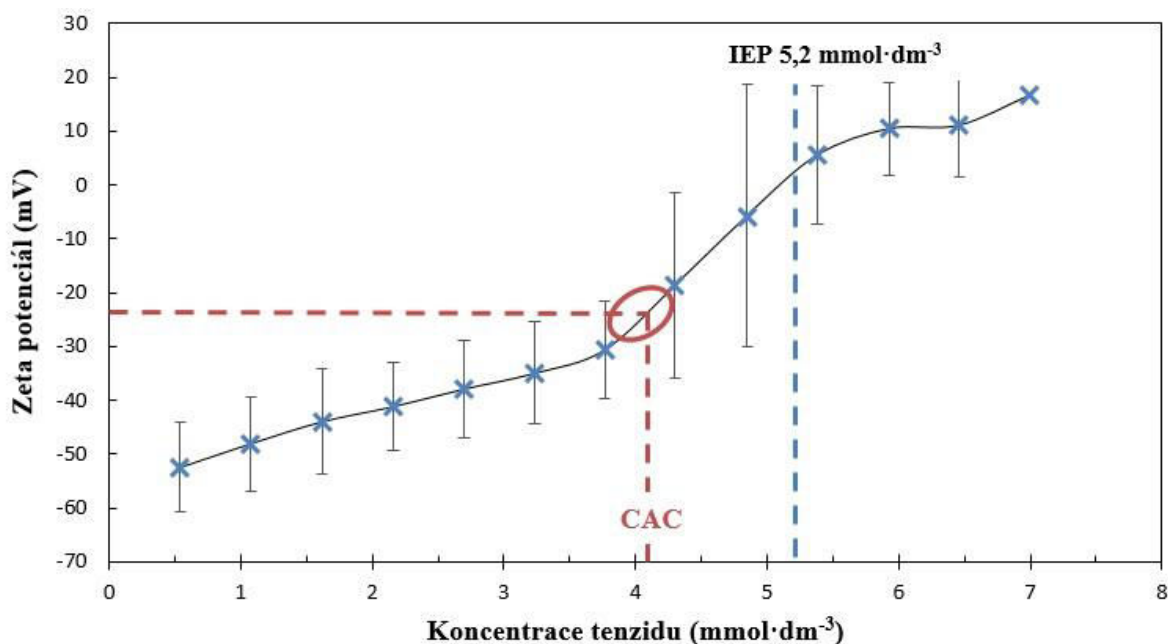
Tabulka 5: Kritická agregační koncentrace systému hyaluronan-tenzid, Zetasizer Nano ZS

Materiál	Kritická agregační/micelární* koncentrace ( $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	
	CTAB	Septonex
voda*	0,92–1 [27]	0,8 [32]
HMW HA	2,0±0,4	2,0±0,2
MMW HA	4,0±0,4	4,0±0,2
LMW HA	-----	6,0±0,2

Ze získaných hodnot CAC je zřejmé, že se snižující se molekulovou hmotností hyaluronanu se zvyšuje CAC tenzidu v systému a naopak. Tato skutečnost platí pro oba studované systémy, HA-CTAB i HA-Septonex. Stanovená hodnota CAC u vzorků vysokomolekulárního HA s CTAB je vyšší než v systému se Septonexem. CAC daná titrační analýzou tenzidu do roztoku MMW HA je pro CTAB i Septonex téměř totožná.

Titrací  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  CTAB do roztoku nízkomolekulárního hyaluronanu bylo zjištěno, že ke skokovému nárůstu Z-průměru velikosti částic dochází až v koncentrační oblasti tenzidu 9–10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Vzhledem k tomu, že titrace je omezená maximálním možným objemem 20 ml a v systému HA-CTAB se v tomto okamžiku nacházel stejný podíl hyaluronanu i tenzidu, titrace neproběhla do úplného konce tak, aby byl bod vzniku PE systému zřejmý. Aby bylo možné tuto titraci dokončit, pravděpodobně by bylo potřeba navýšit koncentraci tenzidu, abychom získali požadovaná data pro sestavení titračních křivek CAC. Z časových důvodů nebylo možné titrace tenzidu o vyšší koncentraci do roztoku nízkomolekulárního hyaluronanu provést.

Během titrační analýzy systémů HA-tenzid byla také změřena mobilita částic převedená na velikost zeta potenciálu (mV).



Obr. 24: Závislost zeta potenciálu na koncentraci tenzidu; titrace Septonexu do roztoku MMW HA

Z měření zeta potenciálu během titračních experimentů vyplývá, že s rostoucím přírůstkem kationického tenzidu k záporně nabitému hyaluronanu se absolutní hodnoty zeta potenciálu přibližují k nule, přičemž systém dosahuje tzv. izoelektrického bodu. Hodnota IEP je charakteristickým bodem, který vyjadřuje nejmenší stabilitu daného systému a jeho zeta potenciál je roven nule.

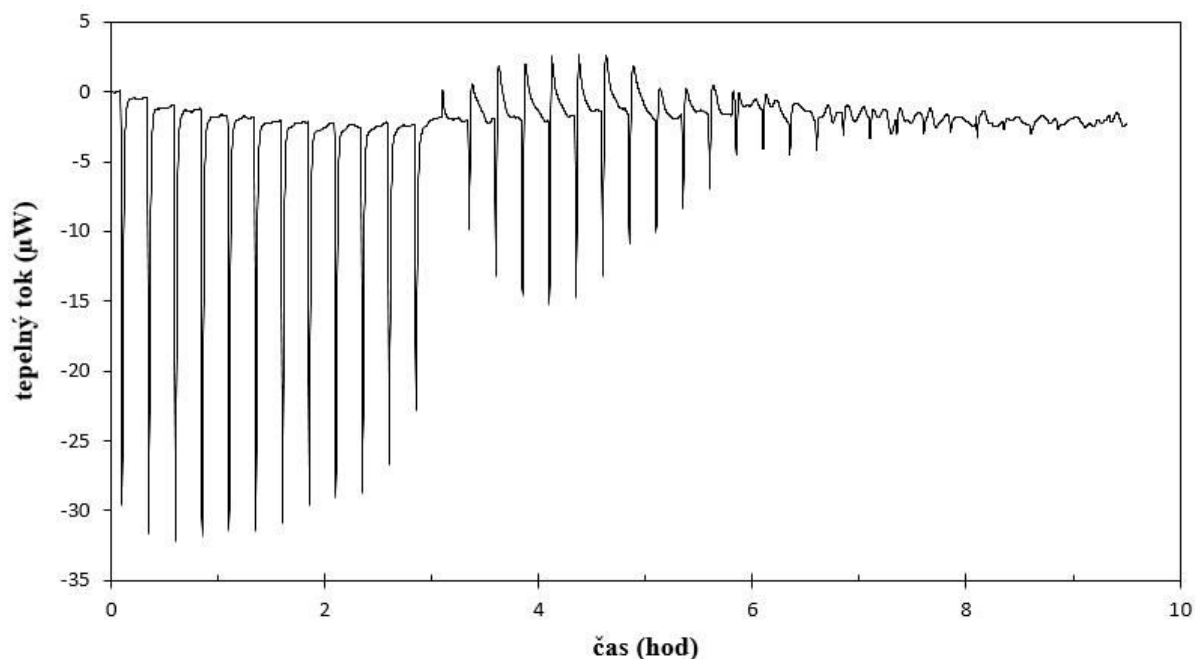
Obrázek 24 zobrazuje naměřené hodnoty zeta potenciálu během titrací Septonexu ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) do roztoku středněmolekulárního HA. Tyto hodnoty byly v programu MS Excel zprůměrovány a vyneseny do grafu včetně jejich směrodatných odchylek v podobě chybových úseček. Hodnoty se zanedbatelnou odchylkou nejsou opatřeny chybovými úsečkami. Z Obrázku 24 lze vyčíst, že zpočátku titrace nabývá systém hyaluronan-tenzid výrazně záporných hodnot zeta potenciálu ( $-52 \text{ mV}$ ), které se s rostoucí koncentrací tenzidu přibližují IEP. Právě v okolí nulového zeta potenciálu dochází k fázové separaci systému, který se následně snaží zaujmout co nejstabilnější charakter a zeta potenciál se blíží ke kladným hodnotám (až  $17 \text{ mV}$ ).

Systém zprvu vykazuje poměrně stabilní chování, kdy jsou hodnoty zeta potenciálu pod  $-30 \text{ mV}$ . V oblasti okolo  $-30 \text{ mV}$  začíná být systém nestabilní, což se projevuje rychlým poklesem absolutní hodnoty zeta potenciálu směrem k nule. Vynesená přerušovaná čára v grafu zobrazuje body  $[4,1;-22]$ , znázorňující počáteční nestabilitu systému, kterou provází vznik agregátů. Tato úvaha je v souladu s článkem [56], který uvádí, že částice se zeta potenciálem v rozmezí  $-30 \text{ mV}$  až  $+30 \text{ mV}$  se považují za nestabilní a mohou s jinými částicemi v systému vytvářet nadmolekulární útvary.

#### 6.4 Analýza polyelektrolytových komplexů pomocí ITC

Další metodou pro analýzu chování systémů hyaluronan-tenzid a stanovení kritické agregační koncentrace tenzidů v těchto systémech byla izotermická titrační kalorimetrie.

Výstupem z analýzy jednotlivých vzorků byl vždy titrační záznam sledující tepelné změny systému po přidavku 5  $\mu\text{l}$  v daném čase.



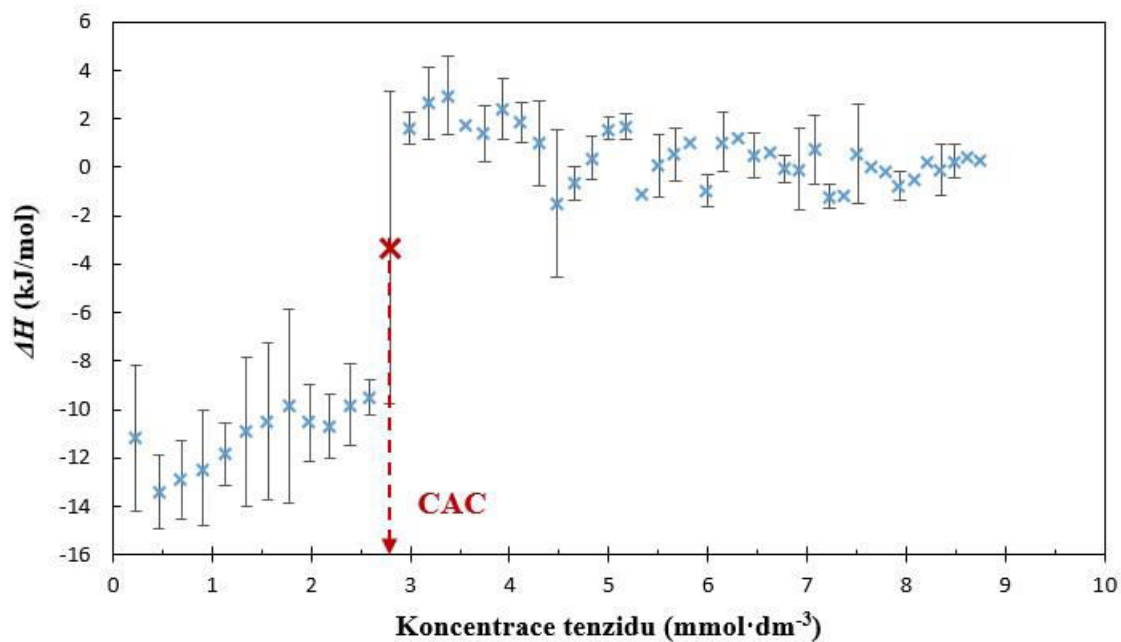
Obr. 25: Typický titrační záznam systému hyaluronan-tenzid z mikrokolorimetru TAM III (titrace 35  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  CTAB do HMW HA při 25  $^{\circ}\text{C}$ )

Obrázek 25 znázorňuje příklad surových dat titrace 35  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  CTAB do roztoku vysokomolekulárního hyaluronanu. Je zřejmé, že z počátku titrace dochází k extrémním tepelným výkyvům v systému HA-tenzid a probíhající reakce jsou endotermického charakteru.

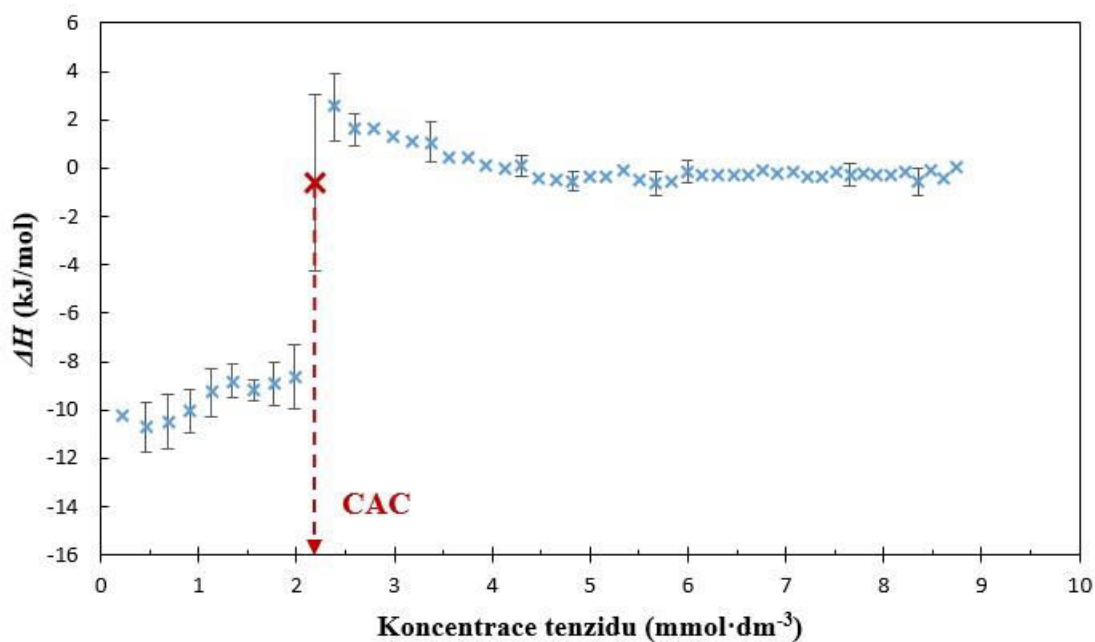
V okolí koncentrace tenzidu 3  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  dochází k převrácení směru píku nad osu x, což odpovídá vzniku PE komplexu. Při zvyšující se koncentraci tenzidu nad tuto hodnotu dochází k rozmívání ostrého tvaru píku, což je způsobeno vznikem dalších agregátů v cele a současně prudkým nárůstem viskozity vzorku doprovázené případnou tvorbou nehomogenní struktury, díky přítomnosti gelové fáze nebo sraženiny. Na konci experimentu, od koncentrace tenzidu zhruba 6,5  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pozorujeme již velmi slabou intenzitu signálu, kdy je všechen hyaluronan v měřicí cele vytitrován tenzidem.

Plochy píků byly zintegrovány a získané teplo reakce v jednotkách  $\text{kJ/mol}$  bylo použito pro vytvoření entalpogramu znázorňujícího změnu tepla v závislosti na koncentraci tenzidu CTAB (Obrázek 26) nebo Septonexu (Obrázek 27).

Každý vzorek byl proměřen nejméně dvakrát a naměřené hodnoty byly v programu MS Excel zprůměrovány a vyneseny do grafu včetně jejich směrodatných odchylek. Tyto odchylky jsou v grafu zobrazeny v podobě chybových úseček. U některých bodů nejsou chybové úsečky zobrazeny z důvodu zanedbatelné hodnoty směrodatné odchylky.



Obr. 26: Titrace CTAB do roztoku vysokomolekulární HA (1400–1600 kDa)



Obr. 27: Titrace Septonexu do roztoku vysokomolekulární HA (1400–1600 kDa)

Obrázky 26 a 27 znázorňují průběh tepelných změn systémů HA-CTAB a HA-Septonex za stejných podmínek. S-křivky vykazují z počátku titrace endotermický děj, kdy  $\Delta H$  dosahuje hodnot  $< 0$  až do hodnoty inflexního bodu, ve kterém začíná systém nabývat exotermického charakteru. V tomto bodě je zřejmá formulace PE komplexu za tvorby agregátů a lze určit hodnotu CAC tenzidu.

Vyhodnocení kritické agregační koncentrace tenzidu každého měřeného vzorku bylo provedeno prostřednictvím programu Origin 7.5. Z naměřených dat byla sestrojena závislost

změny entalpie na koncentraci tenzidu a z derivace této křivky v programu Origin byla zjištěna hodnota CAC.

Tabulka 6: Výsledné hodnoty kritické agregační koncentrace systému hyaluronan-tenzid, ITC

Materiál	Kritická agregační/micelární* koncentrace ( $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )	
	CTAB	Septonex
voda*	0,9–1 [27]	0,8 [32]
HMW HA	3,0±0,3	2,0±0,1
MMW HA	6,0±0,5	5,0±1,0
LMW HA	-----	-----

Stanovené hodnoty CAC tenzidu v analyzovaném systému HMW i MMW HA-CTAB se obecně ukázaly vyšší než u systému HMW a MMW HA-Septonex. Lze tedy říci, že vznik agregátů za tvorby PE komplexu je zdatelnější u systému s přídatky Septonexu. Zároveň je patrné, že se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu se snižuje CAC tenzidu a ke tvorbě polyelektrolytů dochází dříve, než s o řád nižší molekulovou hmotností HA.

Získaná data z titrací destilované vody do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech nám poskytla informace o signálech velmi zanedbatelné intenzity, které tímto potvrzují fakt, že přídatky tenzidu do roztoku hyaluronanu zásadně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti daného systému.

Vhodnou koncentraci tenzidu pro ITC bylo nutné několika měřeními nalézt. Nejprve byla zvolena stejná koncentrace tenzidu jako u titračních experimentů na přístroji Zetasizer Nano ZS, tedy  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , nicméně tepelná změna a přechod v exotermický děj nebyly dostatečně zdatelné. Proto byla provedena také titrační analýza daných systémů s tenzidy o nižší i vyšší koncentraci. Vhodnou koncentrací tenzidu pro ITC se ukázala koncentrace  $35 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , avšak pouze pro systémy s hyaluronanem o střední nebo vysoké molekulové hmotnosti. Systémy s nízkomolekulární HA se nepodařilo touto metodou proměřit tak, aby bylo možné z naměřených dat stanovit hodnotu CAC tenzidu.

## 6.5 Analýza polyelektrolytových komplexů pomocí SEC-MALS

Pro charakterizaci již vzniklých polyelektrolytových komplexů na bázi hyaluronan-tenzid byla využita metoda SEC-MALS.

Tab. 7: Naměřená data směsí hyaluronan-tenzid za bodem agregace, SEC-MALS

Tenzid	Koncentrace hyaluronanu						
	1 mg/ml		2 mg/ml		5 mg/ml		
	pík 1		pík 1		pík 1		pík 2
	$M_w$ [kDa]	c [mg/ml]	$M_w$ [kDa]	c [mg/ml]	$M_w$ [kDa]	c [mg/ml]	$M_{w2}$ [kDa]
CTAB	11	0,03	15	0,03	3	0,6	60
Septonex	1425	0,01	8	0,01	3	1	31

Tabulka 7 zahrnuje hodnoty molekulové hmotnosti a příslušné koncentrace fragmentu hyaluronanu, který byl detekován v přefiltrovaném roztoku původní směsi CTAB/Septonexu s LMW, MMW a HMW hyaluronanem. Vysoká hodnota molekulové hmotnosti 1425 kDa u systému HMW HA se Septonexem naznačuje, že v odfiltrovaném roztoku pravděpodobně zůstala původní molekula hyaluronanu, nicméně z koncentračního záznamu je zřejmé, že se jedná pouze o stopové množství. Nízké molekulové hmotnosti u HMW a MMW HA s CTAB i Septonexem naznačují, že téměř všechny hyaluronan zagregoval s daným tenzidem a v eluátu zůstala nepatrná část původní molekuly HA. Veškeré změny molekulových hmotností, tedy i koncentrací, se při získávání dat projevíly vznikem píku. U přefiltrovaného roztoku původní směsi nízkomolekulárního hyaluronanu s CTAB i Septonexem zůstala převážná část hyaluronanu (vzhledem k naměřené poměrně vysoké koncentraci) nezagregována (Tabulka 7, pík 1), přesto bylo možné v roztoku detekovat i agregáty o vyšší molekulové hmotnosti (Tabulka 7, pík 2).

*Tab. 8: Koeficient polydisperzity pro polyelektrolytový komplex hyaluronan-tenzid, SEC-MALS*

<b>Systém</b>	<b>Koeficient polydisperzity [Mw/Mn]</b>
<b>HMW HA/CTAB</b>	1,17
<b>MMW HA/CTAB</b>	1,06
<b>LMW HA/CTAB</b>	1,04
<b>HMW HA/Septonex</b>	1,65
<b>MMW HA/ Septonex</b>	1,49
<b>LMW HA/ Septonex</b>	1,06

Tabulka 8 charakterizuje polyelektrolytové komplexy vytvořené agregací kationického tenzidu se záporně nabitým hyaluronanem o různých molekulových hmotnostech z hlediska velikosti částic obsažených v systému, vyjádřených jako koeficient polydisperzity. Pro monodisperzní systém se tento koeficient rovná 1 a roste s rostoucí polydisperzitou systému. Naměřená data potvrzují, že se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu v systému přibývá počet částic různých velikostí ve vzorku a zvyšuje se tak neuniformita systému. Vyšší polydisperzitu v našem případě vykazuje systém HA-Septonex.



## 6.6 Porovnávání výsledků z jednotlivých metod

Tato kapitola poskytuje přehledný souhrn a porovnání výsledků z titrační analýzy systémů hyaluronan-tenzid prostřednictvím metody rozptylu světla a změny tepelného toku.

Tabulka 9: Porovnání výsledných hodnot CAC získaných metodou rozptylu světla a ITC

Materiál	Kritická agregační koncentrace ( $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )			
	Zetasizer		ITC	
	CTAB	Septonex	CTAB	Septonex
HMW HA	2,0 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1
MMW HA	4,0 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,0
LMW HA	-----	6,0 $\pm$ 0,2	-----	-----

Pro porovnání výsledných hodnot CAC získaných vybranými metodami byla pro přehled zhotovena Tabulka 9. Pro oba zkoumané systémy HA-CTAB i HA-Septonex (oběma metodami) platí, že se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu klesá hodnota CAC a změnu fázové separace lze detekovat při nižší koncentraci tenzidu v systému. CAC pro systém s HMW HA byla přibližně stejná pro CTAB i Septonex jak u metody rozptylu světla, tak i izotermické titrační kalorimetrie, přestože výchozí koncentrace tenzidů se lišily (DLS: 20  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; ITC: 35  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Komplex MMW HA-Septonex dosáhl oběma metodami přibližně stejné CAC, ale u systému MMW HA-CTAB se tato hodnota lišila. Vyšší CAC byla určena z dat naměřených metodou ITC. Obecně platí, že u systému HA-Septonex dochází k fyzikálně-chemickým změnám dříve než u systému HA-CTAB.

Vzhledem k vysoké hodnotě IEP u LMW HA-CTAB nebylo možné stanovit prostřednictvím Zetasizeru CAC tohoto systému. Ani metodou ITC nebylo možné získat CAC, jelikož při titraci tenzidu do roztoku nízkomolekulárního HA došlo pouze k nepatrným tepelným změnám.

Z měření vyplývá, že metoda s využitím dynamického rozptylu světla je vhodná pro charakterizaci systému HA-tenzid, ačkoliv by bylo třeba u systémů s LMW HA-CTAB zvýšit koncentraci tenzidu tak, aby byl laserový paprsek schopen vznikajícím koloidním systémem projít. Izotermická titrační kalorimetrie je metodou vhodnou k charakterizaci systému HA-tenzid pouze v oblasti vysoké a střední molekulové hmotnosti HA (250–1600 kDa) a pouze v určitém koncentračním rozmezí daného tenzidu (cca 35  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

## 7 ZÁVĚR

Interakce záporně nabitého hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a kationických povrchově aktivních látek byly studovány ve vodných roztocích různými fyzikálně-chemickými metodami s cílem optimalizovat tyto metody pro účely charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů typu biopolymer-tenzid a zároveň získat přehled o agregačním chování vybraných povrchově aktivních látek (CTAB a Septonexu).

Nejprve byly provedeny srážecí experimenty v průhledných vialkách pro vizuální pozorování agregace systému hyaluronan-tenzid jako simulace měření v přístrojích, které nám poskytly rozmezí koncentrací vhodných pro titrační experimenty. Z prostého pozorování bylo zřejmé, že u systému HA-CTAB byl počátek agregace znatelnější, než u systému HA-Septonex, z důvodu vzniku sytějšího zákalu.

Polyelektrolytové komplexy byly následně podrobeny titrační analýze s využitím dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS. Agregace systému byla sledována měřením Z-průměru velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na přídatku tenzidu. Z naměřených hodnot velikosti částic byly stanoveny hodnoty CAC pro jednotlivé systémy hyaluronan-tenzid, s výjimkou systému LMW HA-CTAB, u kterého je pravděpodobně nutné zvýšit koncentraci tenzidu pro detekci CAC. Pro oba zkoumané systémy (HA-CTAB, HA-Septonex) platí, že se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu se snižuje CAC a naopak. Hodnoty zeta potenciálu nám poskytly přehled o stabilitě daných systémů, resp. komplexů. Bylo zjištěno, že k formulaci PE komplexů dochází již při záporných hodnotách zeta potenciálu a s rostoucím přídatkem tenzidu se tyto hodnoty přibližují bodu IEP, narůstá počet agregátů v systému, dochází k fázové separaci a systém vykazuje nestabilní chování. Po dosažení IEP se systém opět snaží co nejrychleji zaujmout stabilní charakter, což vyjadřuje nárůst zeta potenciálu směrem ke kladným hodnotám.

Titračními experimenty jsme získali přesné koncentrace povrchově aktivních látek, při kterých dochází ke vzniku agregátů s hyaluronanem. Abychom si ověřili, zda je opravdu veškerý hyaluronan vytitrován roztokem tenzidu, byly připraveny směsi hyaluronan-tenzid za bodem agregace. Tyto systémy byly podrobeny SEC-MALS analýze sledující molekulovou hmotnost a koncentraci hyaluronanu a index polydisperzity daného komplexu. Stanovené nízké hodnoty molekulových hmotností HA a jeho koncentrací potvrzují, že téměř veškerý hyaluronan zagregoval s daným tenzidem, nicméně u původní směsi LMW HA s CTAB i Septonexem zůstala převážná část hyaluronanu nezagregována. Z toho lze usuzovat, že interakce LMW HA s těmito tenzidy probíhají odlišným způsobem a tenzidy se na kratší řetězec HA vážou za jiných vazebných podmínek. Hodnoty PDI rostly se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu; v systému tedy přibývají částice různých velikostí a zvyšuje se neuniformita systému. Vyšší polydisperzitu obecně vykazuje systém HA-Septonex.

Metodou SEC-MALS byly také stanoveny přesné molekulové hmotnosti použitých vzorků hyaluronanu a zároveň jeho konformační uspořádání v roztoku.

Poslední část experimentální práce byla zaměřena na studium polyelektrolytových komplexů z termodynamického hlediska s využitím izotermické titrační kalorimetrie. Data byla vyhodnocena ve formě tepelné změny během probíhající interakce HA-tenzid doprovázené vznikem agregátů. Fázovou separaci systému naznačují titrační křivky a stejně

jako v případě titrační analýzy na Zetasizeru také vizuální pozorování komplexu hyaluronan-tenzid v měřicí cele po skončení experimentu. Metoda poskytla hodnoty CAC pouze pro systémy s HMW a MMW HA, kdy je fázová změna systému s CTAB pozorována při vyšších koncentracích oproti systémům se Septonexem. I tato metoda potvrdila, že molekulová hmotnost HA má vliv na počátek agregace; čím vyšší byla molekulová hmotnost HA, tím byly detekovány nižší hodnoty CAC tenzidu v roztoku.

Přestože byla charakterizace polyelektrolytových komplexů v podstatě omezena pouze na systémy s HMW a MMW HA a s určitými koncentracemi tenzidů, použité techniky se ukázaly vhodnými pro charakterizaci tvorby polyelektrolytových komplexů v systému hyaluronan-tenzid. Vzhledem k tomu, že byly interakce mezi HMW a MMW hyaluronanem a povrchově aktivními látkami prokázány a zároveň byly zjištěny hodnoty CAC vybraných tenzidů, lze považovat vzniklé koloidní systémy za vhodné matrice pro začlenění účinných látek, využitelných v cílené distribuci léčiv.

Výsledky této práce mohou otevřít prostor pro další studie stejného či obdobného systému typu hyaluronan-tenzid a zároveň může přispět k nastavení vhodných poměrů hyaluronanu a kationických tenzidů při přípravě těchto hydrogelových systémů s následnou aplikací v oblasti medicíny.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, 53.8: 397-411.
- [2] DICKER, K. T., et al. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*[online]. 2014, **10**(4), 1558-1570 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.019. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113006156>
- [3] KOOLMAN, J., RÖHM, K-H. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [4] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 1998, 98.8: 2663-2684.
- [5] Sodium hyaluronate – laboratory. In: *CONTIPRO* [online]. [cit. 2017-12-02]. Dostupné z: <https://www.contipro.com/portfolio/manufacturer-of-pharmaceutical-sodium-hyaluronate>
- [6] Structure of Hyaluronan. In: *Bloomage Freda Biopharm Co., Ltd.* [online]. 2014 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <http://www.bloomagefreda.com/tech01en/id/36.html>
- [7] BLUNDELL, Ch. D., DEANGELIS, P. L., ALMOND, A. Hyaluronan: the absence of amide–carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models. *Biochemical Journal* [online]. 2006, **396**(3), 487-498 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1042/BJ20060085. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20060085>
- [8] Function of Hyaluronan. In: *TRB Chemedica UK, VISMED* [online]. 2016 [cit. 2017-12-02]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/function-of-hyaluronan>
- [9] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. Hyaluronát–nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, 75-79 s.
- [10] BROWN, M. B, JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2005, **19**(3), 308-318 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x. ISSN 0926-9959. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>
- [11] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **29**(1), 17-25 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>

- [12] HALASOVÁ, T., KROUSKÁ, J., MRAVEC, F., PEKAŘ, M. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2011, **391**(1-3), 25-31 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775711003621>
- [13] DEBELE, T. A., MEKURIA, S. L., TSAI, H-Ch. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **68**, 964-981 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.121. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116305513>
- [14] BLAŽEJ, A., a kol. *Tenzidy*. Bratislava: Alfa, 1977. s. 481. ISBN 63-173-77.
- [15] SALAGER J.-L. *SURFACTANTS, Types and Uses*. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingenieria, Escuela de Ingenieria Quimica [online]. 2002, ver. 2 [cit. 2017-12-02]. Dostupný z: <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>
- [16] FARN, R. J. *Chemistry and technology of surfactants*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, s. 315. ISBN 9781405126960.
- [17] Autor neznámý, Fyzikální, chemické a technické vlastnosti povrchově aktivních látek, Distanční text, CEPAC Morava, Projekt OP RLZ Opatření 3.2-0309. [online]. 2007 [cit. 2017-12-02]. Dostupný z vlastních zdrojů.
- [18] KOREC, A. Tenzidy. *Pharminfo* [online]. 2016 [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <https://www.pharminfo.cz/technologie/tenzidy>
- [19] SEDLAŘÍKOVÁ, J. *Chemie a technologie tenzidů II* [elektronická skripta]. [cit. 2017-12-13]. Po bezplatné registraci a přihlášení je plný text dostupný z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [20] BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. ver. 3. New York: Informa Healthcare, 2009, 869 s. ISBN 1420069632.
- [21] MYERS, D. *Surfactant Science and Technology*. ver. 3. Hoboken, N.J.: J. Wiley, 2006, 380 s. ISBN 0471680249.
- [22] TEXTER, J. *Reactions and synthesis in surfactant systems*. New York: Marcel Dekker, 2001, 909 s. Surfactant science series, v. 100. ISBN 0824702557-.
- [23] TADROS, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*. ver. 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 634 s. ISBN 3527306293.
- [24] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, s. 421–427
- [25] Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2009 – Doplněk 2015. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.

- [26] Cetyltrimethylammonium Bromide. In: *Santa Cruz Biotechnology* [online]. [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: <https://www.scbt.com/scbt/product/cetyltrimethylammonium-bromide-57-09-0>
- [27] Cetyltrimethylammonium bromid. In: *SIGMA—ALDRICH* [online]. [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/h5882pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h5882pis.pdf)
- [28] Cetyltrimethylammonium bromide. In: *The European Bioinformatics Institute: Part of the European Molecular Biology Laboratory* [online]. [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=3567>.
- [29] KRATOCHVÍL, F. Cetrimonium Bromide. In: *Slovník INCI substancí a pojmů* [online]. [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/index.php?inc=inci&filtr=C>
- [30] Ophthamo-Septonex oční kapky: Souhrn údajů o přípravku. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0200863&tab=texts>
- [31] Carbethopendecinii bromidum: Karbethopendeciniumbromid. In: *Český lékopis 1997* [online]. [cit. 2017-12-21]. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_6\\_1\\_Carbethopendecinii\\_bromidum.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecinii_bromidum.htm)
- [32] KOPECKÝ, F., VOJTEKOVÁ, M., OREMUSOVÁ, J., GREKSÁKOVÁ, O. Micellization of [1-(Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium Bromide Studied by Conductometry and Potentiometry. *Chemical papers* [online]. 1993, 47 (1), 55-59 [cit. 2017-12-21]. Dostupné z: [https://www.chempap.org/file\\_access.php?file=471a55.pdf](https://www.chempap.org/file_access.php?file=471a55.pdf)
- [33] KOTOUČEK, J. *Charakterizace koloidních částic pomocí deprotonace v excitovaném stavu za použití pokročilých fluorescenčních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 96 s.
- [34] KVÍTEK, L., PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [35] Polyelectrolytes. In: *Polymer Properties Database* [online]. 2015 [cit. 2017-12-02]. Dostupné z: <http://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Polyelectrolyte%20type.html>
- [36] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii*. [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2017-12-02]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/)
- [37] MEKA, V. S., et al. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, 22(11), 1697-1706 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.06.008. ISSN 13596446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644617301265>

- [38] LANKALAPALLI, S., KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **71**(5), 481- [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.4103/0250-474X.58165. ISSN 0250-474x. Dostupné z: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2009/71/5/481/58165>
- [39] VERMA, Anu., VERMA, Ank. Polyelectrolyte Complex – An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research* [online]. 2013, **4**(5), 1684-1691 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.4(5).1684-91. ISSN 0975-8232. Dostupné z: <http://ijpsr.com/bft-article/polyelectrolyte-complex-an-overview/?view=fulltext>
- [40] FERREIRA, G. A., LOH, W. Liquid crystalline nanoparticles formed by oppositely charged surfactant-polyelectrolyte complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2017, **32**, 11-22 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.cocis.2017.08.003. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029417300055>
- [41] GOSWAMI, M., et al. Surfactant-Mediated Polyelectrolyte Self-Assembly in a Polyelectrolyte–Surfactant Complex. *Macromolecules* [online]. 2015, **48**(24), 9050-9059 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b02145. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.5b02145>
- [42] CHATTERJEE, A., MOULIK, S.P., MAJHI, P.R., SANYAL, S.K. Studies on surfactant–biopolymer interaction. I. Microcalorimetric investigation on the interaction of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS) with gelatin (Gn), lysozyme (Lz) and deoxyribonucleic acid (DNA). *Biophysical Chemistry* [online]. 2002, **98**(3), 313-327 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00107-2. ISSN 03014622. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462202001072>
- [43] ĎURECH, M., TRČKA, F., VOJTĚŠEK, B., MÜLLER, P. Methods for Analysis of Protein-protein and Protein-ligand Interactions. *Klinická onkologie* [online]. 2014, **27**(Suppl 1), S75-S81 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.14735/amko20141S75. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4488/>
- [44] KOGA, S., MANN, S. Mesostructured silica hybrids from liquid polyelectrolyte-surfactant-aminosilanol complexes. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2010, **20**(27), 5736- [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1039/c0jm00332h. ISSN 0959-9428. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0jm00332h>
- [45] KROUSKÁ, J., PEKAŘ, M., KLUČÁKOVÁ, M., ŠARAC, B., BEŠTER-ROGAČ, M. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 1837-1843 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.069. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716313315>

- [46] CHYTIL, M., STRAND, S., CHRISTENSEN, B.E., PEKAŘ, M. Calorimetric and light scattering study of interactions and macromolecular properties of native and hydrophobically modified hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, **81**(4), 855-863 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.03.059. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710002390>
- [47] MALÁ, M. *Solubilizační vlastnosti komplexů hyaluronan – tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 65 s.
- [48] VELEBNÝ, V. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství: Hyaluronan – biopolymer for tissue engineering : teze habilitační práce*. Brno: VUTIUUM, 2012. ISBN 978-80-214-4420-1.
- [49] HERZOG, M. *Interakce hyaluronan tenzid - dynamická tenziometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 30 s.
- [50] KALBÁČOVÁ, M., VERDÁNOVÁ, M., MRAVEC, F., HALASOVÁ, T., PEKAŘ, M. Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, **460**, 204-208 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.048. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775713009655>
- [51] VENEROVÁ, T., PEKAŘ, M. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **170**, 176-181 [cit. 2017-12-02]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.087. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717304836>
- [52] DAUTZENBERG, H., ROTHER, G., HARTMANN, J. Light-Scattering Studies of Polyelectrolyte Complex Formation. SCHMITZ, K. S., ed. *Macro-ion Characterization* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 1993, s. 210-224 [cit. 2017-12-02]. ACS Symposium Series. DOI: 10.1021/bk-1994-0548.ch016. ISBN 0-8412-2770-5. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1994-0548.ch016>
- [53] KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav* [online]. Olomouc: Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc [cit. 2016-12-02]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [54] Dynamický rozptyl světla. *Technický týdeník* [online] 2015 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: [https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/dynamicky-rozptyl-svetla\\_30935.html](https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/dynamicky-rozptyl-svetla_30935.html)
- [55] KALINA, M. Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity. *Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně* [online]. 2012 [cit. 2017-11-03]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- [56] Malvern Zetasizer Nano ZS. *Department of Condensed Matter Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University* [online]. 2008 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/>



- [57] ŠEVČÍKOVÁ, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., KREJČÍ, J., VLTAVSKÁ, P. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014, vol. 108, iss. 5, s. 479-482. [cit. 2017-12-02]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue\\_5-volume\\_108-year\\_2014.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_5-volume_108-year_2014.html).
- [58] BERANOVÁ, L., HUMPOLÍČKOVÁ, J., HOF, M. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_02\\_125-129.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf).
- [59] Zetasizer Nano ZS. In: *Malvern Panalytical Ltd.* [online]. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/index.html>
- [60] *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 1.1 vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2013, 250 s.
- [61] SCARLETT, B. Electrophoretic Light Scattering, ed. *Particle Characterization: Light Scattering Methods* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, s. 289-343 [cit. 2017-12-02]. Particle Technology Series. DOI: 10.1007/0-306-47124-8\_6. ISBN 0-7923-6300-0. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/0-306-47124-8\\_6](http://link.springer.com/10.1007/0-306-47124-8_6)
- [62] KALINA, M. Využití disperzního analyzátoru Zetasizer Nano ZS pro charakterizaci disperzních soustav. *Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně* [online]. 2014 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-disperzniho-analyzatoru-zetasizer-nano-zs-pro-charakterizaci-disperznich-soustav>
- [63] FAN, W., FAN, X., TIAN, W., ZHU, X., ZHANG, W. Differential analysis on precise determination of molecular weight of triblock copolymer using SEC/MALS and MALDI-TOF MS. *Polymer Testing* [online]. 2014, **40**, 116-123 [cit. 2017-12-03]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2014.08.014. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941814001974>
- [64] SOME, D., KENRICK, S. Characterization of Protein-Protein Interactions via Static and Dynamic Light Scattering. CAI, Jianfeng, ed. *Protein Interactions* [online]. InTech, 2012 [cit. 2017-12-03]. DOI: 10.5772/37240. ISBN 978-953-51-0244-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/protein-interactions/characterization-of-protein-protein-interactions-via-static-and-dynamic-light-scattering>
- [65] *GPC/SEC Start-up Kit*. Agilent Technologies, Spojené království, 2013, 20 s.
- [66] MIRZAEI, H., CARRASCO, M. *Modern proteomics – sample preparation, analysis and practical applications*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-319-41446-1.
- [67] PODZIMEK, S. *Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. John Wiley & Sons, 2011, s. 371. ISBN 978-0-470-38617-0.
- [68] GAUR, D. Gel Permeation Chromatography. *DRGP Institute* [online]. 2014 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://drgpinstitute.wordpress.com/2014/12/26/gel-permeation-chromatography/>

- [69] *A guide to multi-detector gel permeation chromatography*. Agilent Technologies, Spojené království, 2012, 24 s.
- [70] NOBBMANN, U. Multi Angle Light Scattering (MALS). In: *Malvern Panalytical* [online]. 2014 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <http://www.materials-talks.com/blog/2014/08/12/multi-angle-light-scattering-mals/>
- [71] SONG, Ch., ZHANG, S., HUANG, H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Frontiers in MICROBIOLOGY* [online]. 2015, **6**, [cit. 2017-12-03]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01049. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01049/abstract>
- [72] Isothermal Titration Calorimetry (ITC). In: *Malvern Panalytical Ltd.* [online]. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/technology/isothermal-titration-calorimetry>
- [73] FREIRE, E., MAYORGA, O. L., STRAUME, M. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **62**(18), 950A-959A [cit. 2017-12-03]. DOI: 10.1021/ac00217a002. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00217a002>
- [74] *Microcalorimetry*. TA Instruments, 2012, 60 s.
- [75] MURASAWA, N., KOSEKI, H. Investigation of Heat Generation from Biomass Fuels. *Energies* [online]. 2015, **8**(6), 5143-5158 [cit. 2017-12-03]. DOI: 10.3390/en8065143. ISSN 1996-1073. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1073/8/6/5143/>
- [76] ŘEHÁK, K. Stanovení termodynamických dat pomocí titrační kalorimetrie. *Ústav fyzikální chemie VŠCHT Praha* [online]. 2007 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: [http://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013982/01a\\_ITC.pdf?redirected](http://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013982/01a_ITC.pdf?redirected)
- [77] THALBERG, K., LINDMAN, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of physical chemistry*, 1989, 93.4: 1478-1483.
- [78] FUKADA, K., SUZUKI, E., SEIMIYA, T. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions 1. *Langmuir* [online]. 1999, **15**(12), 4217-4221 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1021/la9811822. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la9811822>
- [79] DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte Complex Formation in Highly Aggregating Systems. 1. Effect of Salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the Presence of NaCl. *Macromolecules* [online]. 1997, **30**(25), 7810-7815 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1021/ma970803f. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma970803f>

- [80] DAUTZENBERG, H., ROTHER, G. Response of Polyelectrolyte Complexes to Subsequent Addition of Sodium Chloride: Time-Dependent Static Light Scattering Studies. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2004, **205**(1), 114-121 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1002/macp.200350083. ISSN 1022-1352. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/macp.200350083>
- [81] LAPITSKY, Y., PARIKH, M., KALER, E.W. Calorimetric Determination of Surfactant/Polyelectrolyte Binding Isotherms. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2007, **111**(29), 8379-8387 [cit. 2018-01-14]. DOI: 10.1021/jp0678958. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0678958>
- [82] BAO, H., LI, L., GAN, L. H., ZHANG, H. Interactions between ionic surfactants and polysaccharides in aqueous solutions. *Macromolecules* [online]. 2008, **41**(23), 9406-9412 [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1021/ma801957v. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma801957v>
- [83] KROUSKÁ, J. *Interakce hyaluronanu a povrchově aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 101 s.
- [84] KRUTIŠOVÁ, T., PEKAŘ, M., HEJNÁ, J. Nanoparticles formed by self-assembly of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. In: *NANOCON 2013 Conference Proceedings*. 1st. Ostrava: TANGER, Ltd., Keltickova 62, 710 00 Ostrava, Czech Republic, EU, 2013. s. 595-599. ISBN: 978-80-87294-47- 5.
- [85] PILGROVÁ, T., PEKAŘ, M. Stability of the complex nanoparticles of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. In *NANOCON 2014, Conference Proceedings*. 1st edition, 2014. Ostrava: Tanger Ltd., 2014. s. 1-5. ISBN: 978-80-87294-55- 0.
- [86] OYARZUN-AMPUERO, F. A., RIVERA-RODRÍGUEZ, G. R., ALONSO, M. J., TORRES, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **49**(4), 483-490 [cit. 2018-01-04]. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.05.008. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098713001875>
- [87] WATERS, J., LEISKE, D. Characterization of Hyaluronic Acid with On-Line Differential Viscometry, Multiangle Light Scattering, and Differential Refractometry. *LCGC North America* [online]. 2005, 302-310 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://www.wyatt.com/files/literature/publications/lcgc3-61-05e.pdf>
- [88] LALEVÉE, G. et al. Polyelectrolyte complexes via desalting mixtures of hyaluronic acid and chitosan – Physicochemical study and structural analysis. *Carbohydrate polymers*, 2016, 154: 86-95.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 9.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
HA	kyselina hyaluronová (hyaluronic acid)
DMSO	polární rozpouštědlo dimethylsulfoxid
HAS	hyaluronansyntázy, enzymy zodpovědné za syntézu hyaluronanu
UDP-cukry	uridindifosfát navázaný na molekulu sacharidu, který nabývá aktivní formy; pyrimidinový nukleotid; prekurzor uridintrifosfátu
CD44	receptor HA glykoproteinové povahy vyskytující se na povrchu buněk
RHAMM	receptor pro HA zprostředkovávající buněčnou mobilitu
LYVE-1	HA receptor značící endotelie lymfatických cév
HARE	HA receptor pro endocytózu
Layilin	integrální membránový receptor HA
TLR4	molekulární receptor vedoucí k produkci zánětlivých cytokinů, vyvolávajících aktivaci vrozeného imunitního systému
PAL	povrchově aktivní látka
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha (hydrofobic-lipophilic balance)
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micellar concentration)
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
PE	polyelektrolyt (polyelectrolyte)
PEC	polyelektrolytový komplex (polyelectrolyte complex)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
PES-C	polyelektrolyt-surfaktant komplex (polyelectrolyte-surfactant complex)
CAC	kritická agregační koncentrace (critical aggregation concentration)
IEP	izoelektrický bod (isoelectric point)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
PCS	fotonová korelační spektroskopie (photon correlation spectroscopy)
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography)
FFF	frakcionace tokem v poli (field flow fractionation)
NIBS	neinvazivní detekce zpětného rozptylu (non-invasive back-scatter)
ELS	elektroforetický rozptyl světla (electrophoretic light scattering)
LDV	laserová Dopplerova velocimetrie (laser Doppler velocimetry)
MALS	statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (multi-angle light scattering)
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra (ultraviolet-visible)
dRI	diferenční refraktometr (differential refractive index detector)
RI	index lomu (refractive index)

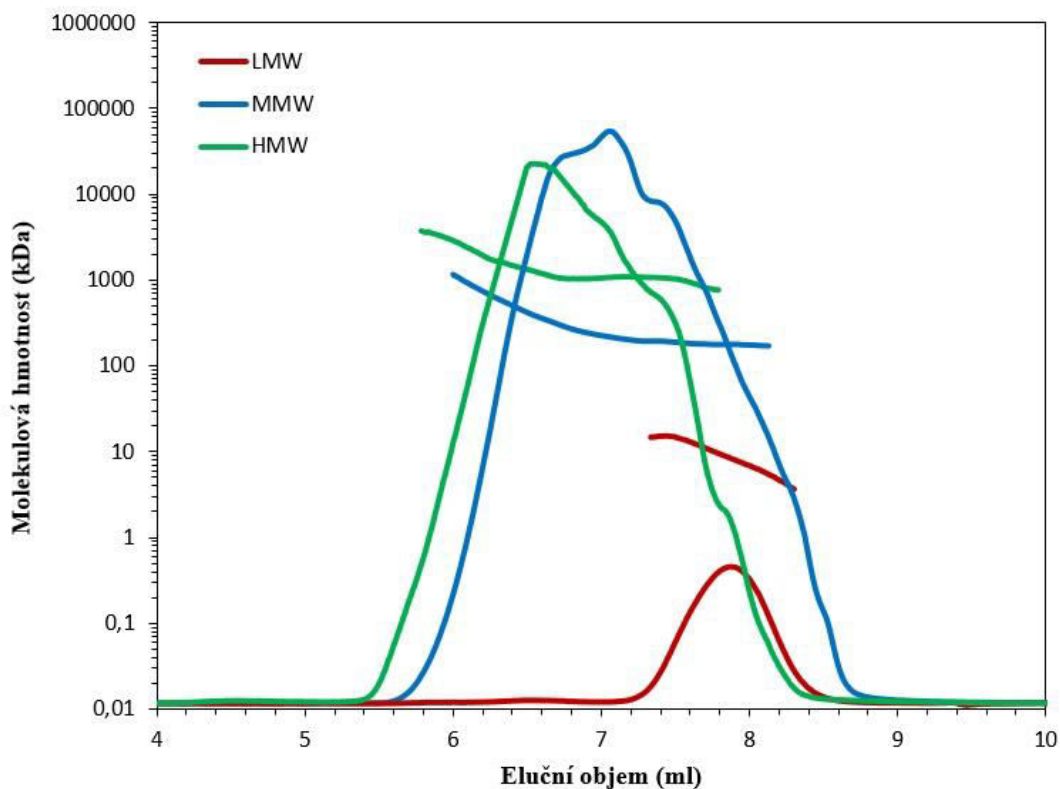
ITC	izotermická titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
DTAB	dodecyltrimethylamonium bromid
Na-PSS	polystyren sulfonát sodný (sodium polystyrene sulfonate)
Na-PMA	polymetakrylát sodný (sodium polymethacrylate)
PDADMAC	poly (diallyldimethylamonium chlorid)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
BKC	benzalkonium chlorid (benzalkonium chloride)
HMW	vysoká molekulová hmotnost (high molecular weight)
MMW	střední molekulová hmotnost (medium molecular weight)
LMW	nízká molekulová hmotnost (low molecular weight)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)

## 9.2 Seznam symbolů

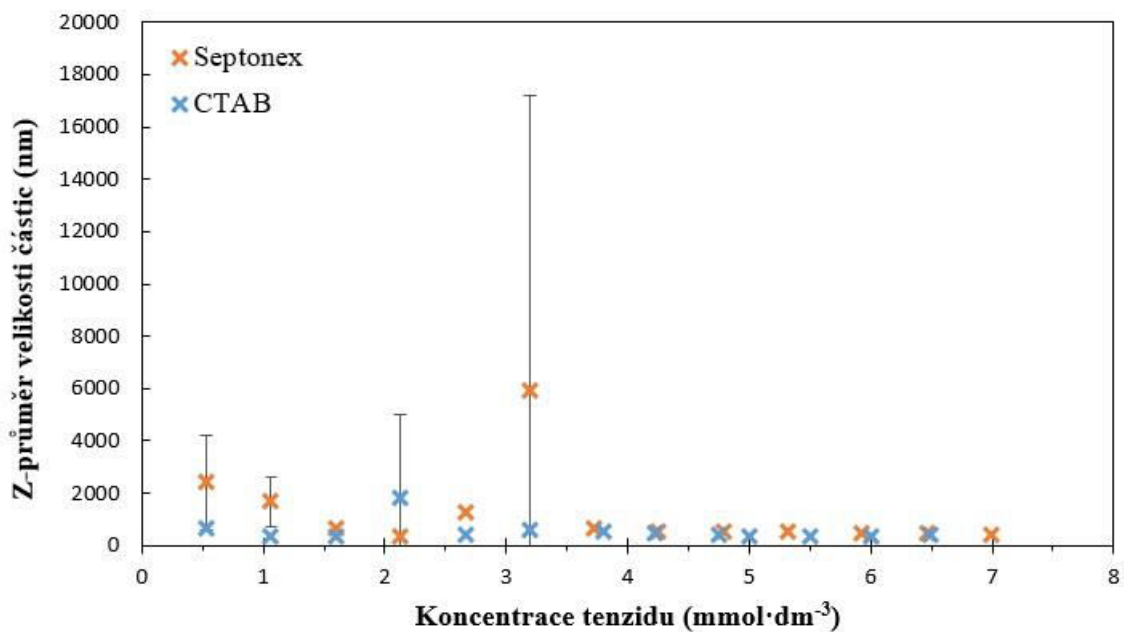
Symbol	Název veličiny
Da	Dalton
nm	nanometr
mg	miligram
ml	mililitr
g	gram
mmol	milimol
dm <sup>3</sup>	decimetr krychlový
°C	stupeň Celsia
$\alpha$	stupeň ionizace
pKa	disociační konstanta
$\Delta H$	změna entalpie
kJ	kilojoule
$g(\tau)$	autokorelační funkce
$D$	difuzní koeficient
$q$	velikost rozptylového faktoru
$\pi$	Ludolfovo číslo
$\lambda_0$	vlnová délka dopadajícího světla ve vakuu
$\theta$	úhel rozptylu
$R_H$	hydrodynamický poloměr částic
$k_B$	Boltzmannova konstanta
$T$	absolutní teplota
$\eta_0$	dynamická viskozita disperzního prostředí
$\mu\text{m}$	mikrometr
$A_2$	druhý viriální koeficient
$k_D$	interakční parametr
$U_E$	elektroforetická pohyblivost částic
$\varepsilon$	dielektrická konstanta

$\eta$	viskozita prostředí
$f(ka)$	Henryova funkce
$z, \zeta, Z$	zeta potenciál
mV	milivolt
$M_w$	molekulová hmotnost
$K$	optická konstanta
$c$	koncentrace makromolekuly
$P_\theta$	funkce úhlové závislosti na rozptýleném světle
$R_\theta$	Rayleighův poměr
$\Delta H$	změna entalpie
$\Delta S$	změna entropie
$\Delta G$	Změna Gibbsovy energie
R	univerzální plynová konstanta
$\mu\text{cal}$	mikrokalorie
kcal	kilokalorie
r	poměr nábojů
n	počet molekul
kDa	kilodalton
$\mu\text{l}$	mikrolitr
cm	centimetr
MDa	megadalton
$\text{cm}^3$	centimetr krychlový
d	průměr částice

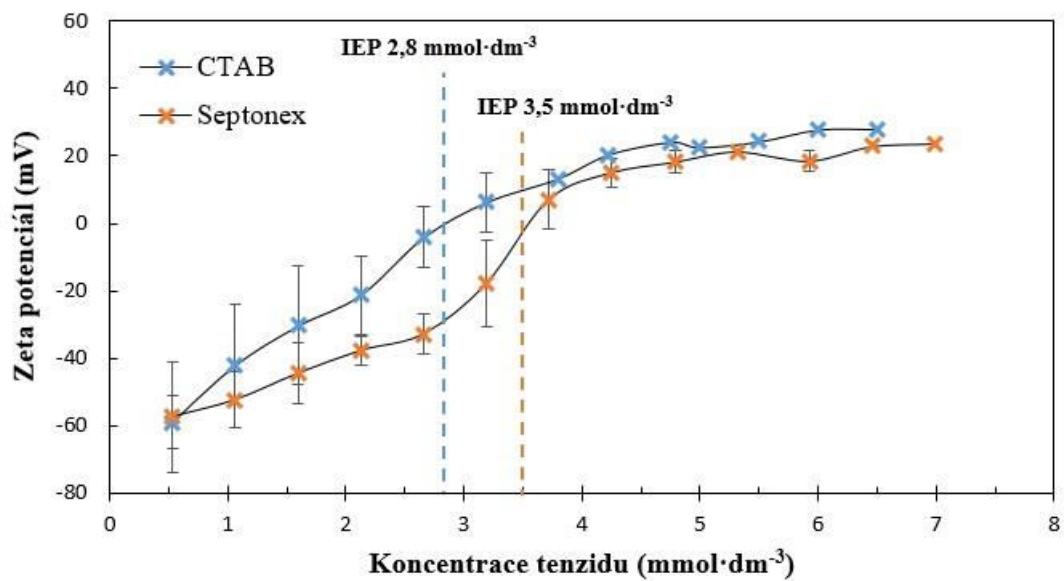
## 10 PŘÍLOHY



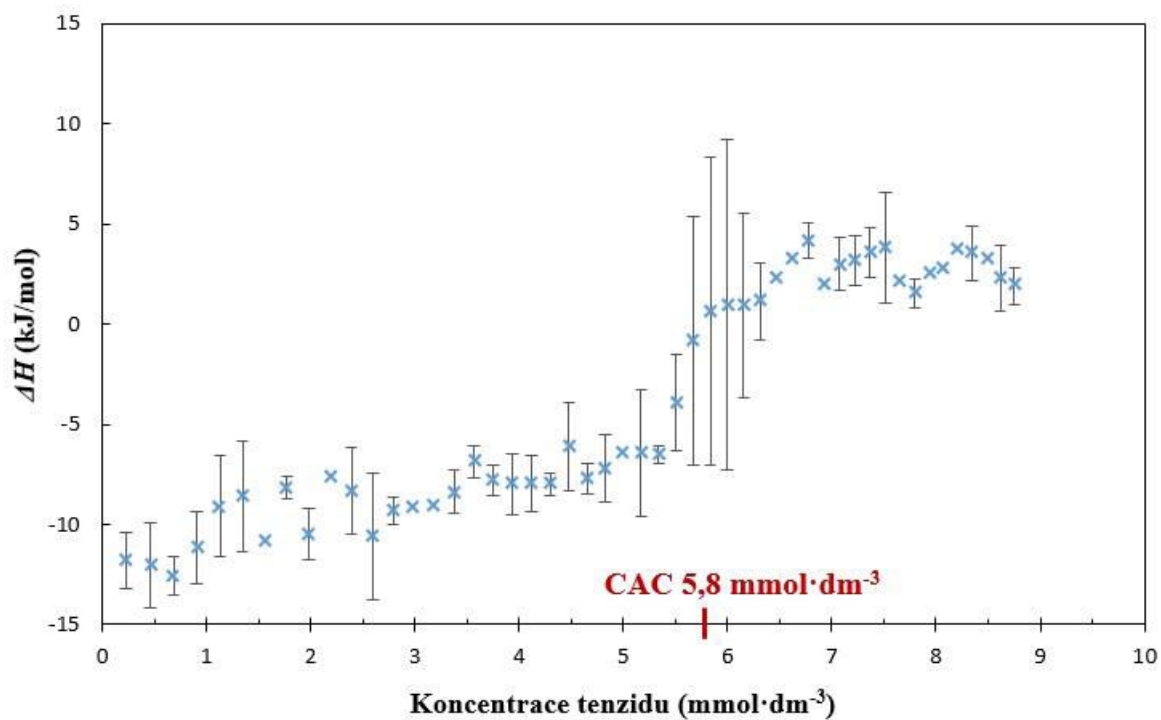
Příloha 1: SEC-MALS, Chromatografický signál vzorků HA a jejich molekulová hmotnost



Příloha 2: DLS, Graf závislosti Z-průměru velikosti částic na koncentraci tenzidu; titrace CTAB/Septonexu do roztoku MMW HA

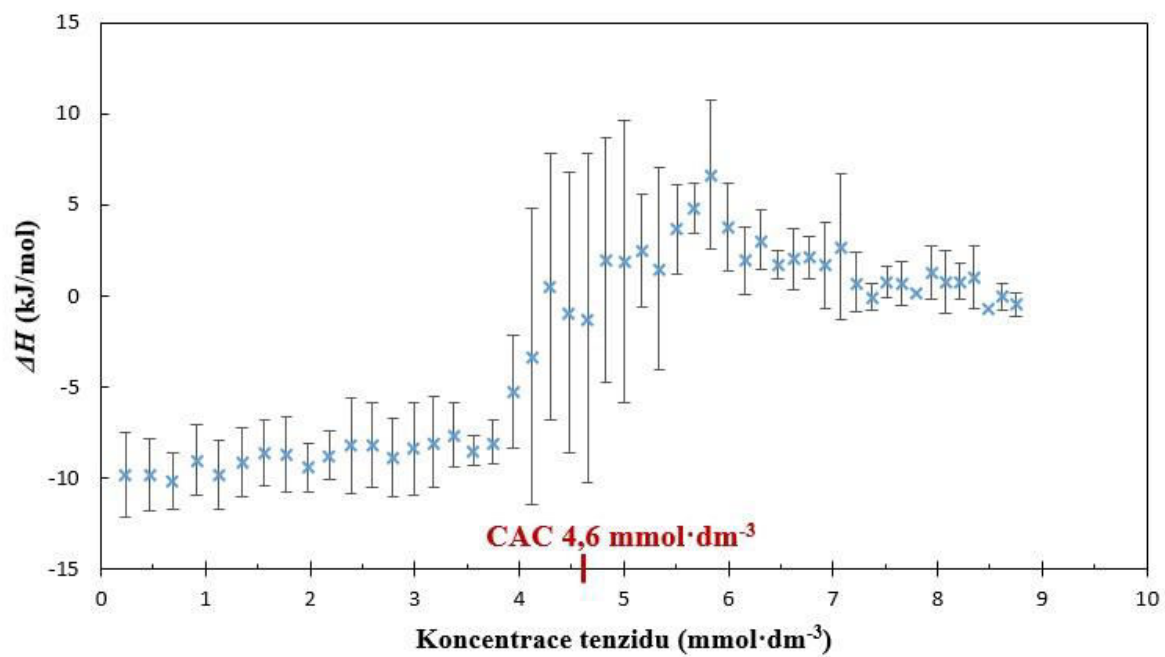


Příloha 3: DLS, Graf závislosti zeta potenciálu na koncentraci tenzidu; titrace CTAB/Septonexu do roztoku HMW HA



Příloha 4: ITC, Titrace CTAB do roztoku středněmolekulární HA (250–450 kDa)





Příloha 5: ITC, Titrace Septonexu do roztoku středněmolekulární HA (250–450 kDa)