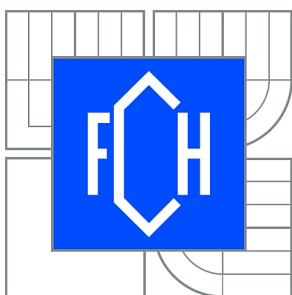




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

STUDIUM INTERAKCÍ A STABILITY V SYSTÉMU BIOPOLYMER-TENZID

STUDY OF INTERACTION IN BIOPOLYMER-SURFACTANT SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ŠÁRKA SOVOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. TEREZA KRUTIŠOVÁ

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0811/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Centrum materiálového výzkumu
Student(ka): **Šárka Sovová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Tereza Krutišová**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Studium interakcí a stability v systému biopolymer-tenzid

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o studiu stability a interakcí v systémech biopolymer-tenzid se zvláštním důrazem na interakce opačně nabitých částic.
2. Seznámit se s možnými metodami měření stability zmíněných systémů.
3. Navrhnout a provést základní experimenty pro porovnání stability systému při různých metodách přípravy.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití těchto systémů jako nosičů biologicky aktivních látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Šárka Sovová
Student(ka)

Ing. Tereza Krutišová
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Metodou dynamického rozptylu světla byly studovány interakce v systému biopolymer-tenzid a stabilita vznikajících komplexů. Byla zkoumána stabilita a interakce nativního hyaluronanu s kationaktivním tenzidem cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB) ve vodě v závislosti na způsobu přípravy těchto systémů. Systém byl připravován buď postupným přidáváním CTAB do hyaluronanu, čímž postupně vznikaly micely, nebo postupným přidáváním hyaluronanu do již vzniklých micel. Bylo zjištěno, že způsob přípravy ovlivňuje vlastnosti vzniklých agregátů. Molekulová hmotnost hyaluronanu neovlivňuje interakce, oproti tomu koncentrace hyaluronanu má na interakce značný vliv. Dále bylo zjištěno, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá vliv na disociaci hyaluronanu v roztoku.

ABSTRACT

Interaction between biopolymer-surfactant and stability of arising complexes were investigated using dynamic light scattering method. Stability of the system and interactions between native hyaluronan and cationic surfactant cetyltrimethyl-amonium bromide in aqueous solution depending on preparation method were investigated. System was prepared either adding CTAB to hyaluronan causing sequential micelle's formation, or adding hyaluronan to already formed micelles. It was found out that preparing method influences properties of arisen complexes. Molecular weight of hyaluronan has an inconsiderable effect on interaction against to concentration of hyaluronan, which influences interaction of component significantly.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzid, dynamický rozptyl světla, autotitrace

KEYWORDS

hyaluronan, surfactant, dynamic light scattering, autotitration

SOVOVÁ, Š. *Studium interakcí a stability v systému biopolymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Krutišová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Výskyt a výroba	8
2.1.2	Struktura.....	8
2.1.3	Polymerní struktura a struktura v roztoku	9
2.1.4	Metabolismus	10
2.1.5	Využití a funkce v organismu	10
2.2	Micelární koloidy.....	10
2.2.1	Struktura.....	10
2.2.2	Agregace	11
2.2.3	Kritická micelární koncentrace	11
2.3	Optické vlastnosti koloidních soustav	13
2.3.1	Dynamický rozptyl světla	13
2.3.2	Princip DLS	13
2.3.3	Měření velikosti částic	14
2.3.4	Uspořádání přístroje Zetasizer Nano pro měření velikosti částic	15
2.4	Elektrické vlastnosti koloidních soustav	16
2.4.1	Měření zeta potenciálu	17
2.4.2	Uspořádání přístroje Zetasizer Nano pro měření zeta potenciálu	18
2.5	MPT-2 Autotitrátor	19
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Materiály.....	23
4.2	Přehled experimentů	23
4.3	Příprava vzorků.....	24
4.3.1	Příprava zásobního roztoku hyaluronanu.....	24
4.3.2	Příprava zásobního roztoku CTAB.....	25
4.4	Měření a vyhodnocení dat	25
4.4.1	Automatická titrace	25
4.4.1.1	Velikost částic	25

4.4.1.2	Zeta potenciál	26
4.4.2	Statistika.....	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	Dynamický rozptyl světla.....	28
5.1.1	Titrace CTAB do hyaluronanu ($M_w = 116$ kDa) ve vodném prostředí.....	29
5.1.2	Titrace CTAB do hyaluronanu ($M_w = 1669$ kDa) ve vodném prostředí.....	30
5.1.3	Titrace hyaluronanu ($M_w = 116$ kDa) do CTAB ve vodném prostředí.....	32
5.1.4	Titrace hyaluronanu ($M_w = 1669$ kDa) do CTAB ve vodném prostředí.....	33
5.2	Disociace hyaluronanu.....	34
5.2.1	Titrace CTAB do hyaluronanu.....	34
5.2.2	Titrace hyaluronanu do CTAB.....	35
6	ZÁVĚR	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	39
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	42
8.1	Seznam zkratk.....	42
8.2	Seznam symbolů.....	42
9	PŘÍLOHY	43
9.1	Příloha 1 – titrace hyaluronanu (116 kDa, $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) do CTAB (1 mM).....	43

1 ÚVOD

Když se řekne kyselina hyaluronová, většina laické veřejnosti si představí televizní reklamu na omlazující krémy proti vráskám nebo zvlhčující nosní spreje. Většina lidí ale nemá tušení, že tuto jedinečnou látku nosí ve svém těle, ať už v očním sklivci, nervových tkáních, kůži, nebo že právě díky této látce necítí bolest při pohybu kloubů.

Hektický způsob života a s ním i spojená nesprávná životospráva přispěly k rozvinutí civilizačních chorob, na které ročně umírá čím dál více lidí. Druhá nejčastější příčina úmrtí je rakovina a právě kvůli této informaci se vědci z celého světa snaží vyvinout nový lék. Lék, který nezasáhne celé tělo pacienta a nezpůsobí svými vedlejšími účinky ztrátu vlasů a potlačení imunitního systému, ale lék, který bude účinný jen v místě nádoru.

Na povrchu rakovinných buněk se vyskytují receptory CD44 a RHAMM, které jsou schopny kyselinu hyaluronovou rozpoznat a vtáhnout ji dovnitř nádoru. Nejen díky již zmíněné afinitě k receptorům, ale také kvůli své biokompatibilitě a biodegradabilitě by právě kyselina hyaluronová mohla učinit převrat ve výzkumu nosičů léčiv. Kdyby se tedy vytvořilo cílené léčivo s kyselinou hyaluronovou, mohla by se zabezpečit distribuce a uvolnění léčiva přímo do nádorové buňky. Problémem bývá obvykle hydrofobnost léčiva, proto je nutné na kyselinu hyaluronovou, která je hydrofilní, navázat takovou látku, která v sobě umožní solubilizovat léčivo. Zástupcem těch látek by mohly být kationaktivní tenzidy tvořící ve vodném prostředí micely s hydrofobním jádrem. Teoreticky by se měl tenzid navázat na disociované karboxylové skupiny hyaluronanu a vytvořit tak komplex cíleného nosiče léčiv. Teorie ale nestačí, a proto je třeba interakce hyaluronanu a kationaktivního tenzidu důkladně prozkoumat.

Cílem této práce je porovnání interakcí jednotlivých komponent a stability vznikajících komplexů v závislosti na způsobu přípravy pomocí metody DLS.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

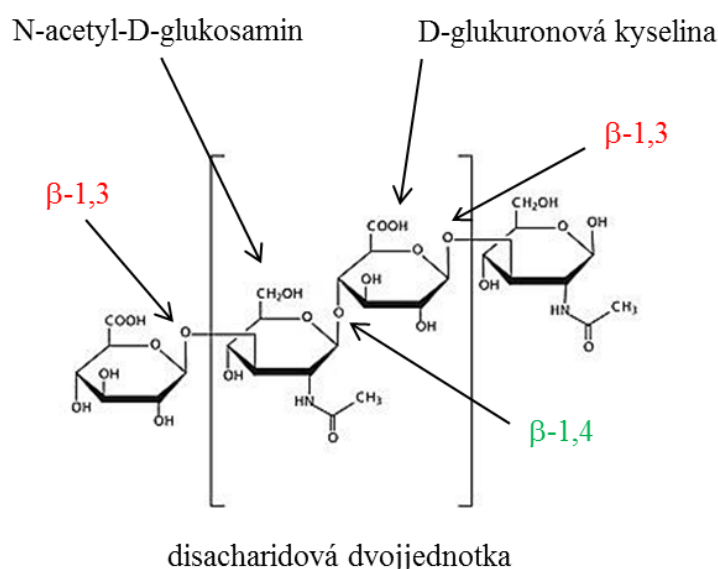
První zmínka o jedné z nejuniverzálnějších makromolekul v přírodě – kyselině hyaluronové, pochází z roku 1934. Tento kdysi neznámý glykosaminoglykan byl vyizolován z očního sklivce skotu v laboratoři doktora Karla Meyera a pojmenován podle místa nálezů – očního sklivce (hyaloideus – vztahující se ke sklivci [1]) a uronové kyseliny [2].

2.1.1 Výskyt a výroba

Kyselina hyaluronová se přirozeně vyskytuje u savců a některých mikroorganismů. Nejvíce je zastoupená v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži, je také součástí pojivových, epitelových a nervových tkání. V některých tkáních, jako např. v kůži, je hlavním stavebním prvkem. Komerčně se vyrábí fermentací bakterií *Streptococcusequi*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Bacillus subtilis*, které mohou být geneticky modifikované [3]. Při fyziologických podmínkách se kyselina hyaluronová vyskytuje ve formě polyaniontu – negativně nabitého a vysoce hydrofilního hyaluronanu obklopeného molekulami vody, které jsou spojeny vodíkovými můstky [4, 5].

2.1.2 Struktura

Kyselina hyaluronová (Obr. 1) je lineární nerozvětvený polysacharid složený z opakujících se disacharidových podjednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny střídajícími se β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami [4].



Obr. 1: Základní chemická struktura hyaluronanu.

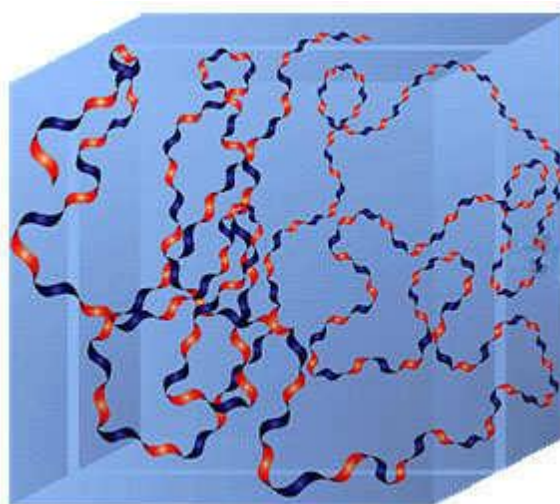
Hlavním důvodem vysoké energetické stability molekuly je její prostorové uspořádání. Oba cukry jsou prostorově spojeny glukózou, která v β -konfiguraci dovoluje prostorově

objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují méně stericky výhodné axiální polohy [2, 4].

2.1.3 Polymerní struktura a struktura v roztoku

Polymerní struktura hyaluronanu je tvořena z více než 30 000 opakujících se jednotek [6]. Molekulová hmotnost se v literatuře liší podle autora a také závisí na enzimech katalyzujících jeho syntézu, pohybuje se tedy v rozmezí 10^6 – 10^8 Daltonů [5]. Průměrná molekulová hmotnost hyaluronanu v lidské synoviální tekutině se pohybuje okolo tří až čtyř milionů Daltonů [4]. Vodný roztok je velice viskózní kvůli vysoké molekulové hmotnosti a silným intramolekulárním interakcím [5].

Molekula hyaluronanu zaujímá ve fyziologickém roztoku roztaženou nepravidelně stočenou strukturu zabírající širokou doménu, což je způsobeno chemickou strukturou. Molekula hyaluronanu je vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcemi s rozpouštědlem. Zkroucená „stuhovitá“ struktura (Obr. 2) je utvořena díky hydrofilním a hydrofobním doménám hyaluronanu. Axiální atomy vodíku formují nepolární, relativně hydrofobní domény, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní domény [2, 5].



Obr. 2: Struktura hyaluronanu v roztoku [2].

Modrá krychle na obrázku zobrazuje doménu molekuly v roztoku, červená oblast hydrofobní a modrá hydrofilní část stuhovité struktury. Důsledkem doménové struktury je omezená difúze molekul skrz síť hyaluronanu. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny se mohou volně šířit rozpouštědlem uvnitř domény. Velké molekuly, jako bílkoviny, jsou částečně vylučovány z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti, což vede k jejich nižší koncentraci v síti hyaluronanu oproti volným prostorům v okolí hyaluronanu. Řetězce hyaluronanu tvoří dynamický systém, z čehož vyplývá neustálá změna velikosti pórů v síti. Statisticky mohou existovat všechny velikosti póru, jen s různou pravděpodobností, z čehož vyplývá, že všechny molekuly mohou projít sítí hyaluronanu, ale s různým zpomalením v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [2].

2.1.4 Metabolismus

Kyselina hyaluronová je metabolizována velmi dynamicky a její konstantní koncentrace v tkáních je zajišťována vyrovnanými syntetickými a katabolickými reakcemi. V některých buňkách je syntetizována po celou dobu života tkáně, např. v keratinocytech v pokožce, kde je poločas rozpadu méně než jeden den, v krvi je poločas rozpadu velice krátký, v řádech několika minut. Oproti tomu v chondrocytech v chrupavce je tento poločas rozpadu až 3 týdny [2]. Tělo průměrného člověka (70 kg) obsahuje 15 gramů této kyseliny a během dne je jedna třetina metabolizována (syntetizována a degradována) [7].

2.1.5 Využití a funkce v organismu

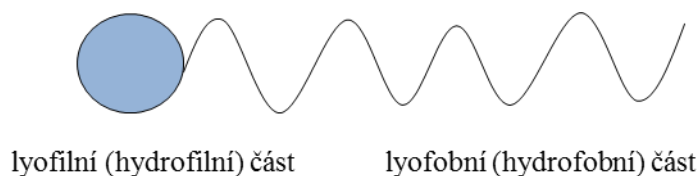
Dobrá snášenlivost kyseliny hyaluronové umožňuje její široké využití v kosmetice i v medicíně. Vodné roztoky kyseliny hyaluronové jsou velice viskózní, čímž v kloubech snižují tření a absorbují tlakové nárazy. Má nespočetné množství biologických funkcí, např. schopnost vázat na sebe vodu, pomáhá zabraňovat prostupu virů a bakterií k buňce, likviduje volné kyslíkové radikály, podporuje endogenní syntézu nové kyseliny hyaluronové buňkami synoviální membrány a zabraňuje degradaci kloubní chrupavky. Díky viskoelastickým vlastnostem působí v synoviální tekutině jako lubrikant a tlumič nárazů. V plastické chirurgii je hojně využívána jako výplň vtažených jizev nebo při zvětšení poprsí, dále je využívána v oční chirurgii nebo při léčbě osteoartrózy [8, 9]. Důležitou roli hraje kyselina hyaluronová při hojení ran – zabraňuje ukládání kolagenu, takže při hojení nevznikají jizvy [10]. V kosmetice se využívá především k vyplnění vrásek, omlazení a hydrataci pleti.

2.2 Micelární koloidy

Nízkomolekulární látky tvoří při velkém zředění ve vhodném rozpouštědle pravé roztoky. Při zvyšující se koncentraci však molekuly asociují a pravý roztok přejde na koloidní, útvary vzniklé asociací v roztoku se nazývají micely a látky, které jsou tyto micely schopné tvořit, se označují jako micelární (asociativní) koloidy. Micelární koloidy jsou reverzibilní systémy, které vznikají samovolným rozpuštěním a jejich vlastnosti závisí na okamžitých fyzikálních podmínkách systému, např. na teplotě, tlaku nebo koncentraci [11].

2.2.1 Struktura

Schopnost micelárních koloidů vytvářet micely je umožněna díky jejich zvláštní struktuře. Molekuly jsou amfifilní neboli amfipatické, tj. skládají se ze dvou rozdílných částí – lyofilní, která je schopna se ve vhodném (polárním) prostředí rozpouštět, a lyofobní, která je daným prostředím odpuzována a její neochota ke kontaktu s molekulami rozpouštědla způsobuje asociaci.



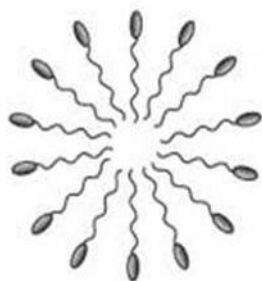
Obr. 3: Molekula tenzidu.

Ve vodném prostředí se tyto dvě části označují jako hydrofilní a hydrofobní. Hydrofobní, nepolární část tvoří jeden nebo více uhlovodíkových řetězců, oproti tomu silně hydrofilní část tvoří polární skupina zajišťující rozpustnost ve vodě [11, 12].

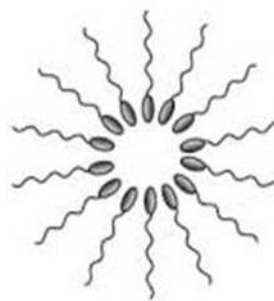
Látky s touto strukturou jsou označovány jako tenzidy neboli povrchově aktivní látky (PAL), detergenty. Podle schopnosti polární skupiny disociovat se micelární koloidy dělí na neionogenní (neutrální) nebo ionogenní (kationaktivní, anionaktivní nebo amfoterní). Neionogenní tenzidy ve vodném roztoku nedisociují na ionty, jejich rozpustnost je zajištěna polárními skupinami, které jsou navázané na dlouhém uhlovodíkovém řetězci. Anionaktivní tenzidy disociují za vzniku aniontů, nejvýznamnějším zástupci této skupiny jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin (přirozená mýdla). Kationaktivní tenzidy disociují za vzniku kationtů, typickým zástupcem jsou kvartérní amoniové soli, např. cetyltrimetylamonium bromid (CTAB). Při disociaci amfoterních tenzidů závisí jejich náboj na pH [11, 12, 13].

2.2.2 Agregace

Agregace micelárních koloidů do micel je umožněna jejich amfifilní povahou – polární a nepolární částí molekuly. Ve vodném prostředí je nepolární řetězec orientován dovnitř micely a polární skupina ven. Existence micel v roztoku hraje klíčovou roli pro solubilizaci nepolárních látek v roztoku. V jádru micely je nepolární prostředí, ve kterém lze rozpustit nepolární látky, např. léčiva. V nepolárním prostředí se vytváří obrácené micely [14]. Důležitou charakteristikou micel je agregační číslo, které udává průměrný počet molekul tenzidu na jednu micelu [15].



micela s hydrofobním jádrem
v polárním prostředí



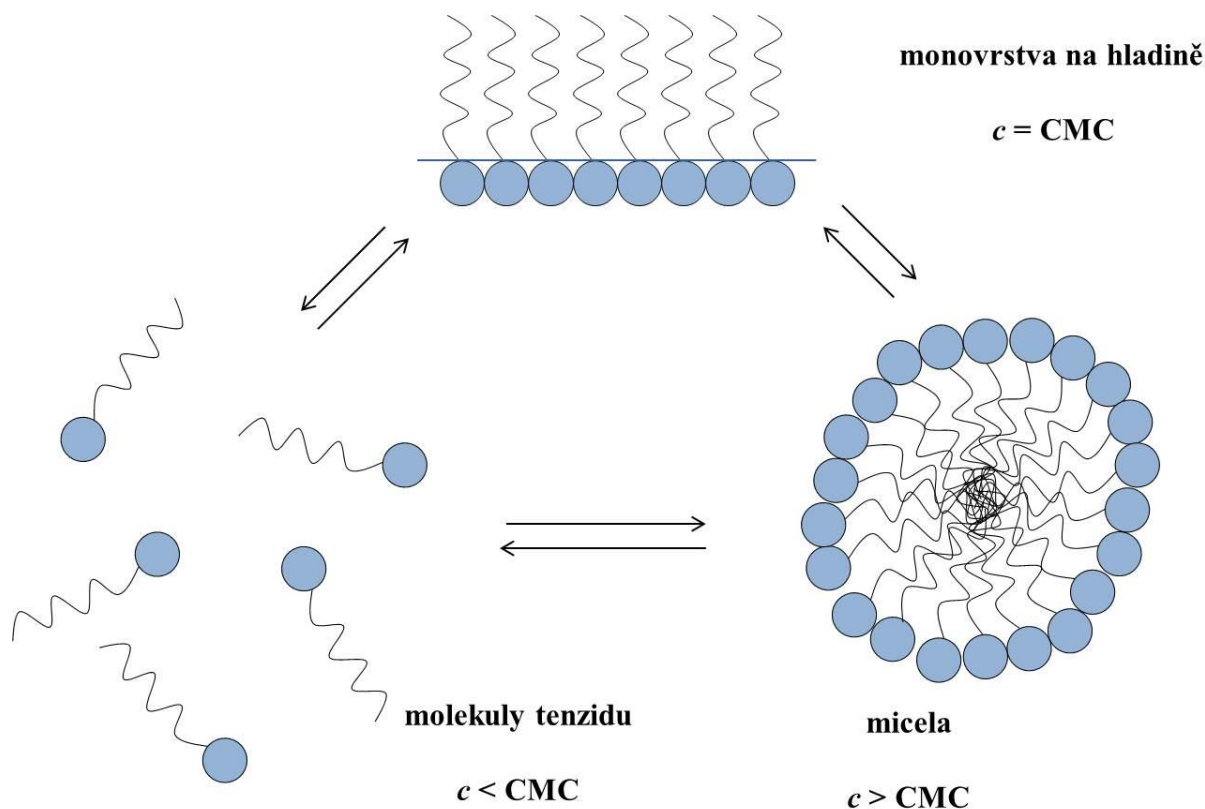
micela s hydrofilním jádrem
v nepolárním prostředí

Obr. 4: Uspořádání micel v polárním a nepolárním prostředí.

2.2.3 Kritická micelární koncentrace

Ve velkém zředění tvoří micelární koloidy pravé roztoky, avšak při zvyšování koncentrace tenzidu dochází k samovolné agregaci molekul a vzniku koloidního roztoku. Koncentrace, při které dochází k agregaci, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) a útvary, které agregací vznikají, se označují jako micely. Při nižší koncentraci existují PAL v roztoku pouze jako volné samostatné molekuly, nad hranici CMC agregují všechny molekuly do micel, z čehož vyplývá, že CMC je tedy nejvyšší možná koncentrace, při které se daná PAL ještě

vyskytuje ve formě unimerních molekul. Kritická micelární koncentrace se obvykle pohybuje v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm⁻³ [12, 14].



Obr. 5: Proces tvorby micel ve vodě.

Tvorba micel probíhá následujícím postupem. Při nízké koncentraci PAL v roztoku se amfifilní molekuly hromadí na povrchu kapaliny, hydrofobní části amfifilních molekul jsou orientovány ven z roztoku, aby minimalizovaly kontakt s vodou, a hydrofilní části dovnitř roztoku. Ve chvíli, kdy je celý povrch kapaliny zaplněn molekulami PAL, se již další přidané molekuly se zde již nemohou hromadit – v této chvíli je dosažena CMC. Po překročení CMC dochází ke vzniku micel. V polárním (vodném) rozpouštědle jsou amfifilní molekuly v micelle orientovány hydrofilní částí do roztoku a jádro micely je tvořeno propletenými nepolárními uhlovodíkovými řetězci amfifilních molekul, které se stále snaží minimalizovat kontakt s polárním prostředím. V případě ionogenních PAL polární skupiny disociují a vznikají tak nabitě micely obklopené elektrickou dvojrivrstvou tvořenou disociovanými protionty [16, 17].

Velikost i tvar micel jsou závislé na teplotě, molekulární struktuře PAL, koncentraci atd. Ve zředěných roztocích nad CMC vznikají malé sférické micely. Se vzrůstající koncentrací přibývají micely jiného tvaru a zvětšuje se i jejich rozměr, uhlovodíkové řetězce se v nich orientují rovnoběžně, až dojde ke vzniku laminárních micel. Ty jsou složeny ze dvou vrstev PAL orientovaných uhlovodíkovými řetězci k sobě [17].

2.3 Optické vlastnosti koloidních soustav

Při dopadu světelných paprsků (elektromagnetického záření) na koloidní soustavu dochází současně k pravé absorpci a rozptylu dopadajícího záření, avšak podle charakteru koloidní soustavy (chemické složení disperzní fáze, velikost částic) vždy jeden jev převládá.

K čistému rozptylu světla dochází, pokud je vlnová délka světla λ podstatně větší než poloměr r koloidních částic v soustavě, platí tedy podmínka $\lambda \gg r$. V opačném případě dochází k odrazu světla a v soustavě lze pozorovat zákal (hrubé disperzní soustavy). Při pohlcení kvanta světelné energie nedochází ke změně energetických stavů valenčních elektronů, ale kvantum přijaté energie je následně vyzářeno náhodně všemi směry beze změny vlnové délky, čímž můžeme pozorovat tzv. Tyndallův jev. Rozptyl záření je složitý jev, který zahrnuje podle okolností odraz, lom, ohyb a interferenci světla.

Při rozptylu světla platí obdoba Lambert-Beerova zákona – zmenšení intenzity dopadajícího světla I_0 na hodnotu I při průchodu vrstvou o tloušťce l lze vyjádřit vztahem:

$$I = I_0 \cdot \exp(-\tau \cdot l), \quad (1)$$

kde τ je turbidita, míra úhrnné energie rozptýlené při průchodu paprsku světla suspenzí o jednotkové tloušťce do všech stran [11, 13].

2.3.1 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla, někdy nazýván jako fotonová korelační spektroskopie, je neinvazivní a nedestruktivní technika, která se hojně využívá ke stanovení velikosti koloidních částic, přičemž výsledky jsou ve shodě s výsledky z elektronového mikroskopu. Určité rozdíly ve výsledcích mohou být způsobeny buď rozdílem mezi skutečným a hydrodynamickým poloměrem, který může zahrnovat i solvatační obal nebo neadsorbovanou vrstvu na povrchu částic, nebo změnou velikosti částice při přípravě (vysušování) vzorku pro elektronový mikroskop [18, 19].

2.3.2 Princip DLS

Principem metody dynamického rozptylu světla (DLS) je měření fluktuací intenzity světla, které je rozptýleno molekulami či částicemi ve vzorku v průběhu času. Při rozptylu světla molekulou se část dopadajícího světla rozptýlí – kdyby byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní. Jelikož se ale všechny molekuly v roztoku pohybují Brownovým pohybem vzhledem k detektoru, existují interference (pozitivní nebo negativní), které způsobují změnu intenzity [20, 21].

Intenzita rozptýleného světla se mění v závislosti na rychlosti difundujících částic – čím rychleji částice difundují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Difúzi molekul ovlivňují následující faktory:

- teplota – čím vyšší je teplota, tím se molekuly rychleji pohybují
- viskozita rozpouštědla – čím vyšší je viskozita rozpouštědla, tím se molekuly pomaleji pohybují
- velikost molekul – čím větší jsou molekuly, tím se pomaleji pohybují

Jsou-li teplota a rozpouštědlo známy a konstantní, pak je proměnlivost intenzity rozptýleného světla přímo úměrná velikosti molekuly, resp. veličině nazývané

hydrodynamický poloměr R_h . Hydrodynamický poloměr je poloměr koule, jejíž hydrodynamické chování je za dané teploty v daném rozpouštědle shodné jako chování sledované disperzní částice [20].

Autokorelační funkce $g(t)$ popisuje pro monodisperzní systém okamžitou hodnotu fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase t . Je definována vztahem

$$g(t) = \exp\left(\frac{-t}{t_c}\right), \quad (2)$$

kde t_c je relaxační čas, který je charakterizován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Hodnotu relaxačního času lze určit pomocí difúzního koeficientu D rozptylujících částic a rovnicí

$$t_c = \frac{1}{Dq^2}, \quad (3)$$

kde q je rozptylový vektor, jehož hodnota je funkcí vlnové délky dopadajícího záření, indexu lomu disperzního prostředí n a úhlu θ , pod kterým je měřena intenzita rozptýleného světla. Rozptylový vektor lze popsat rovnicí

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \cdot \sin \frac{\theta}{2}. \quad (4)$$

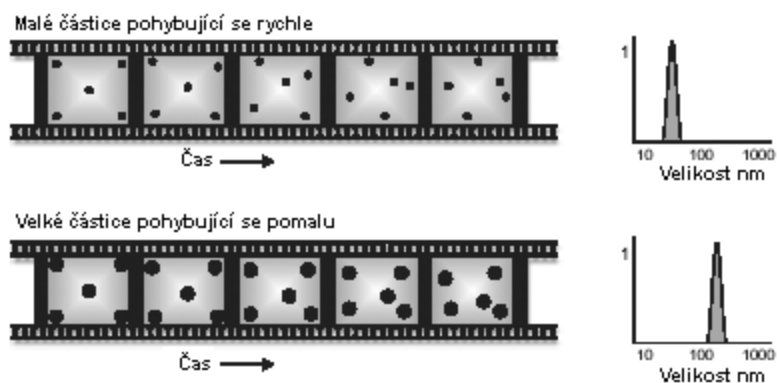
Pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice lze převést difúzní koeficienty měřených částic na velikosti částic:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (5)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je teplota, η je viskozita disperzního prostředí a D je translační difúzní koeficient [21, 22].

2.3.3 Měření velikosti částic

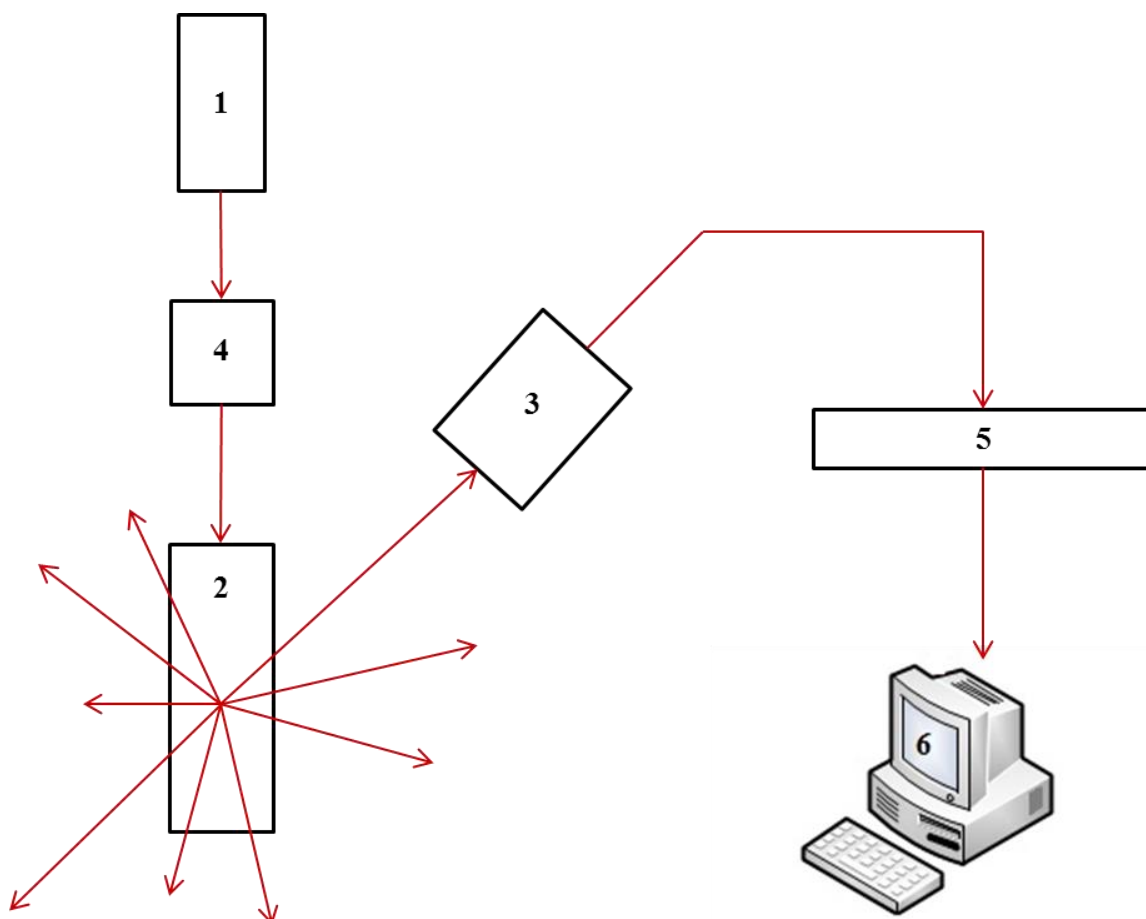
Velikost koloidních částic měřená pomocí DLS odpovídá průměru hypotetické koule, která by difundovala stejnou rychlostí, jaká byla změřena. Brownův pohyb se měří osvětlením částic koloidního roztoku laserem a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Je známo, že velké částice se v roztoku pohybují pomalu, naopak malé částice rychle, což je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6: Vliv velikosti částic na rychlosti pohybu [23].

2.3.4 Uspořádání přístroje Zetasizer Nano pro měření velikosti částic

Systém pro měření velikosti částic se skládá ze šesti hlavních komponent. Jako zdroj světla pro osvětlení částic uvnitř cely (Obr. 7 – 2) se používá laser (Obr. 7 – 1). Většina paprsků prochází skrz vzorek, ale některé jsou rozptýleny částicemi ve vzorku, pro měření intenzity rozptýleného světla se používá detektor (Obr. 7 – 3), který je umístěn pod úhlem 173° (detekce zpětného rozptylu).

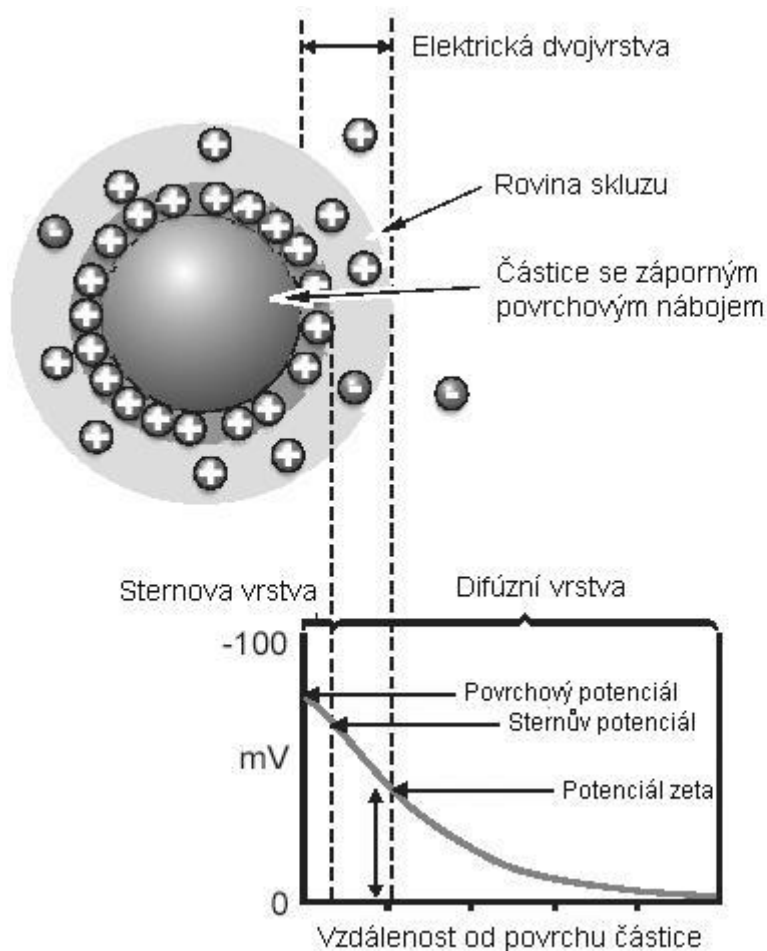


Obr. 7: Schéma zařízení Zetasizer Nano pro měření velikost částic [23].

Detektor je schopný změřit intenzitu rozptýleného světla pouze v určitém rozsahu, pokud by detekoval příliš mnoho světla, došlo by k jeho přetížení. Ke snížení intenzity laseru se používá zeslabovač (Obr. 7 – 4), který snižuje i intenzitu rozptylu. Signál intenzity rozptylu pro detektor projde na korelátor (Obr. 7 – 5), kde probíhá srovnávání intenzity rozptylu v několika po sobě jdoucích časových intervalech, z čehož korelátor odvodí rychlost, jakou se intenzita mění. Informace z korelátoru přejde do počítače (Obr. 7 – 6), kde speciální software analyzuje data a odvozuje informaci o velikosti částic [24].

2.4 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Koloidní soustavy jsou ovlivňovány vnějším elektrickým polem, který způsobuje pohyb koloidních částic v elektrickém poli – elektroforéza, či disperzního prostředí – elektroosmóza. Přítomnost částic disperzní fáze a široce rozvinutého fázového rozhraní v disperzních soustavách má za následek zvláštní ráz jejich elektrických vlastností a především vznik tzv. elektrokinetických jevů. Podobně jako malý jednoduchý ion kolem sebe vytváří iontovou atmosféru protiiontů, seskupují kolem sebe i nabitě částice malé ionty opačného znaménka. Na fázovém rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím dochází k uspořádání opačných nábojů a vzniká tak nabitá vrstva, která se nazývá elektrická dvojrstva [20, 13].



Obr. 8: Elektrická dvojrstva koloidních částic [23].

Na Obr. 8 je vidět, že elektrickou dvojrstvu lze rozdělit na dvě základní části. Pevná část blíže k povrchu, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, ve které lze adsorpční síly zanedbat. Mezi povrchem koloidní částice a roztokem lze rozlišit dva druhy potenciálových rozdílů – elektrochemický a elektrokinetický. Hodnota elektrochemického potenciálu je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a roztokem. Je odpovědný za jevy spojené s vedením elektrického proudu a za membránové potenciály. Elektrokinetický potenciál, nazýván také zeta potenciál (ζ potenciál), je dán potenciálovým rozdílem mezi roztokem a difúzní částí elektrické dvojrstvy [13, 20].

Jako první popsal strukturu elektrické dvojrstvy H. Helmholtz, ovšem jeho model předpokládal její nehybnost, což ovšem není možné vzhledem k tepelnému pohybu molekul disperzního prostředí. Reálnou představu dvojrstvy objasnil Stern, podle kterého je první vrstva, a s ní i několik vrstev protiiontů, přitahována k povrchu jak elektrostatickými, tak adsorpčními silami. Část protiiontů zůstává v blízkosti povrchu a dochází zde k prudkému poklesu elektrického potenciálu.

Stav povrchu koloidní částice z hlediska jejich elektrického náboje rozhoduje nejen o chování nabitých částic v elektrickém poli, ale hraje i důležitou roli při určování stability koloidních soustav [13]. Mírou tohoto náboje je zeta potenciál, který odpovídá náboji difúzní části dvojrstvy. Rozhraní, které charakterizuje, zda je systém stabilní či nikoli, je udávána hranicí ± 30 mV. Částice se zeta potenciálem zápornějším než -30 mV, nebo kladnějším než $+30$ mV považují za stabilní.

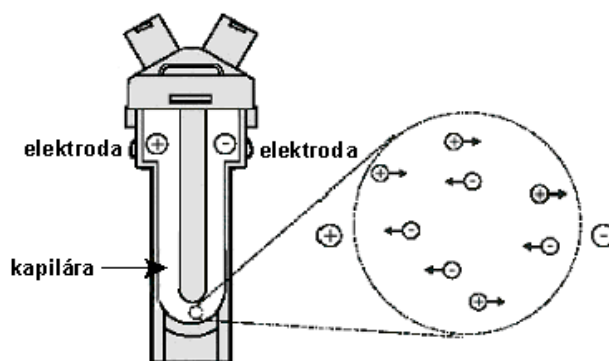
2.4.1 Měření zeta potenciálu

Při měření zeta potenciálu se nejdříve změří elektroforetická pohyblivost částic a poté se pomocí Henryho rovnice (odkaz) vypočte zeta potenciál:

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

kde U_E je elektroforetická mobilita, ε je dielektrická konstanta, ζ je zeta potenciál, η je viskozita rozpouštědla, $f(ka)$ vyjadřuje Henryho funkci, která je pro dané prostředí charakteristická. Pro určení $f(ka)$ se obecně používají jako aproximace dvě hodnoty – buď 1,5 pro polární média, nebo 1,0 pro nepolární.

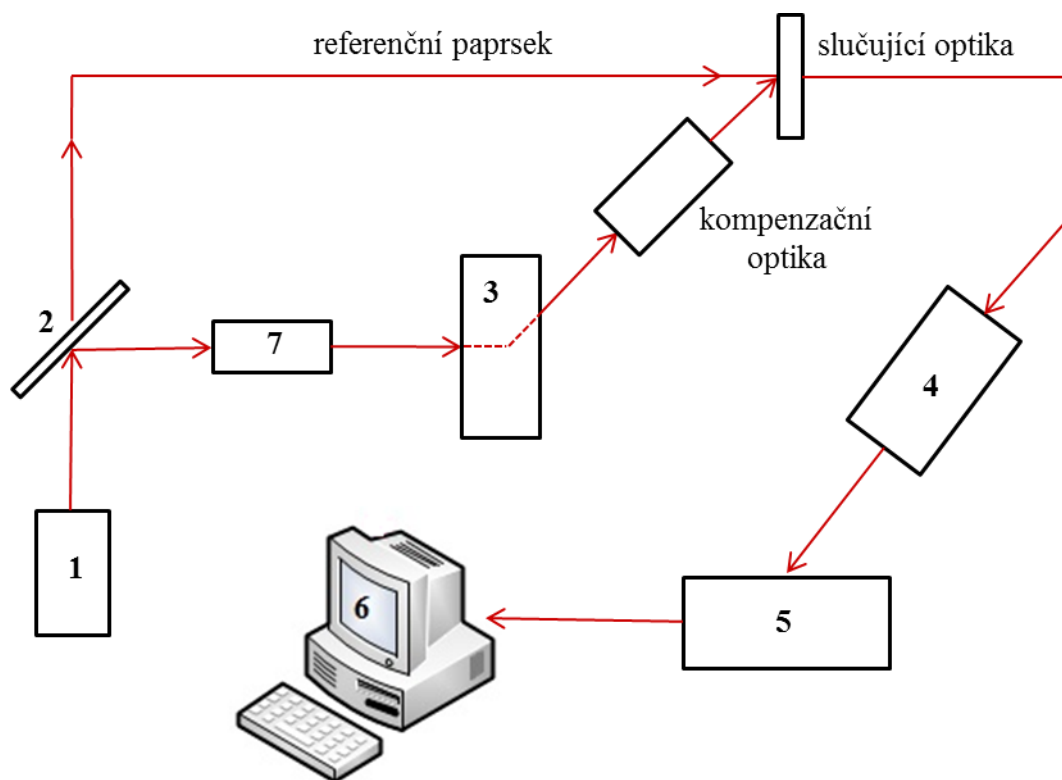
Elektroforetická pohyblivost se zjistí elektroforézou vzorku. Klasický mikroelektroforetický systém (Obr. 9) se skládá z cely, která má na každém konci elektrodu. Na elektrody je aplikován potenciál a částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Je měřena rychlost částic a vyjádřena v jednotkách intenzity pole jako jejich pohyblivost. Rychlost pohybu částic se měří metodou laserové Dopplerovy velocimetrie, při které se světlo rozptýlené v úhlu 17° kombinuje s referenčním paprskem, což vyvolá kolísající signál intenzity, přičemž poměr fluktuace je úměrný rychlosti částic [24].



Obr. 9: Princip pohybu částic při měření elektroforetické pohyblivosti [24].

2.4.2 Uspořádání přístroje Zetasizer Nano pro měření zeta potenciálu

Systém pro měření zeta potenciálu se skládá ze šesti hlavních komponent. Pro osvětlení částic ve vzorku se používá laser (zdroj světla, Obr. 10 – 1). Při měření zeta potenciálu je zdroj světla rozdělen pomocí děliče paprsků (Obr. 10 – 2) – poskytuje tedy dopadající paprsek a referenční paprsek. Laserový paprsek prochází kyvetou se vzorkem (Obr. 10 – 3) a je detekován rozptýl pod úhlem 17° . Když se na kyvetu aplikuje elektrické pole, všechny částice se začnou pohybovat k elektrodám, což způsobí, že detekovaná intenzita kolísá s frekvencí úměrnou rychlosti částice. Detektor (Obr. 10 – 4) posílá tuto informaci na digitální procesor signálu (Obr. 10 – 5) a informace následně přejde do počítače (Obr. 10 – 6). Software v počítači vytvoří frekvenční spektrum, ze kterého následně spočítá elektroforetickou pohyblivost a zeta potenciál. K zajištění ideální intenzity rozptýleného světla v kyvetě se používá zeslabovač (Obr. 10 – 7) [24].



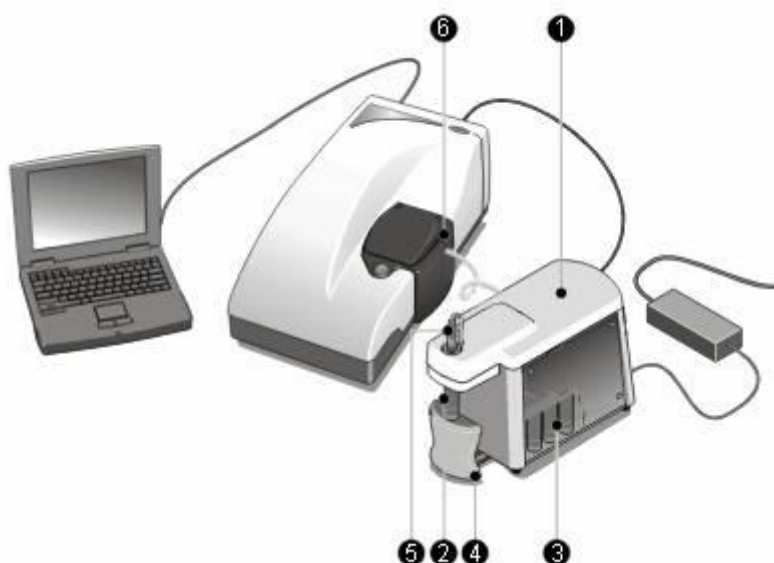
Obr. 10: Schéma zařízení Zetasizer Nano pro měření zeta potenciálu.

2.5 MPT-2 Autotitrátor

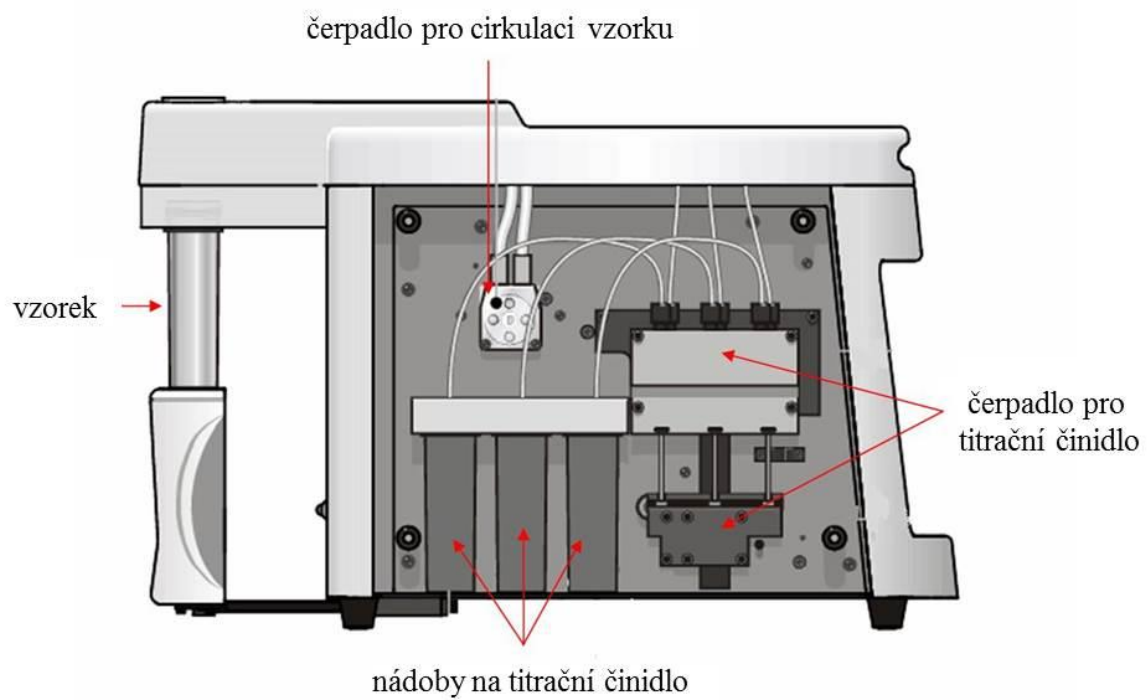
Titrační jednotka jako součást přístroje Zetasizer Nano ZS umožňuje zcela automatizovaným procesem měnit vlastnosti vzorku – pH nebo koncentraci – a při každé změně změřit zeta potenciál, intenzitu nebo velikost částic.

Schéma zařízení je zobrazeno na Obr. 11. Základní součástí zařízení je dávkovací jednotka (Obr. 11 – 1). Vzorek je umístěn v plastové lahvičce (Obr. 11 – 2). Dávkovací jednotka má k dispozici tři lahvičky na titrační činidlo (Obr. 11 – 3), které mohou obsahovat kyselinu, zásadu nebo jinou látku. Odtud je dopraveno potřebné množství titračního činidla do vzorku, který je po celou dobu měření míchán magnetickým míchadlem (Obr. 11 – 4). Dávkovací jednotka obsahuje čerpadlo, které má za úkol cirkulovat vzorek přes průtočnou kyvetu umístěnou v optické jednotce Zetasizer Nano (Obr. 11 – 6). pH elektroda (Obr. 11 – 5) průběžně monitoruje hodnotu pH po celou dobu měření, zatímco regulátor teploty v optické jednotce Zetasizer Nano udržuje teplotu na zvolené hodnotě.

Pomocí softwaru lze nastavit požadovaný rozsah pH nebo koncentrace ve vzorku a požadovaný počet přidavků, software poté po každém přidavku provede změření předem nastavených parametrů [25].



Obr. 11: Schéma zařízení Zetasizer Nano pro autotitrace [25].



Obr. 12: Detail dávkovací jednotky.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V dnešní době jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtnosti jak v České republice, tak i ve světě. Proto se stále více vědců z celého světa zabývá studiem a vývojem nosičů léčiv. Nosiče léčiv jsou v současnosti studovány v souvislosti s terapeutickými systémy, tzn. řízeným uvolňováním léčiv z lékových forem (tzv. drug delivery systems). Zvláštní důraz je kladem studiu jejich nejdůležitějších vlastností – biokompatibilita, biodegradabilita, schopnost vázat léčivo zároveň tak pevně, aby byla možná jeho doprava na místo určení a zároveň tak slabě, aby bylo možné jeho uvolnění a přechod na aktivní formu. Rozkladem nosičového systému také nesmí v těle vznikat pro organismus toxické látky, dále pak nesmí docházet k nežádoucímu ukládání škodlivých zbytků v těle. Právě tyto nosičové systémy by měly umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti s cílenou aktivací a selektivním účinkem na cílovou tkáň a navíc omezit i nežádoucí účinky terapie a zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných účinných látek.

Obecným principem cíleného transportu léčiv je enkapsulování léčiva do nanočástice, která umí buď sama, nebo pomocí rozpoznávacích elementů na jejím povrchu najít na základě specifických receptorů na povrchu buňky to pravé místo pro účinek [26, 27]. Díky výše zmíněným požadovaným vlastnostem je vývoj nosičů léčiv nelehkým úkolem pro vědce.

Častým problémem při vývoji nosičů léčiv bývá hydrofobnost účinných látek, tudíž i jejich nerozpustnost ve vodě. Možným řešením tohoto problému se jeví spojení účinných látek se systémem polyelektrolyt-tenzid. Tenzid, resp. hydrofobní prostředí vzniklé micely, zajistí rozpustnost hydrofobních účinných látek, a polyelektrolyt zajistí vnější ochranu agregátů a cílení na specifické místo. Kyselina hyaluronová je vhodným kandidátem z řad polyelektrolytů, nejen díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, ale především kvůli afinitě k CD44 receptoru.

Studiem interakcí mezi polyelektrolytem a tenzidem se zabývaly *Thralberg a Lindman* [28], kteří zkoumali interakce mezi hyaluronanem sodným a kationaktivním tenzidem TTAB pomocí barviva Orange OT. Zjistili, že barvivo je nerozpustné ve vodném roztoku hyaluronanu, ale rozpustné ve vodném roztoku hyaluronanu sodného (NaHya) a TTAB. Dále zjistili, že první solubilizační oblast se nachází při velmi nízké koncentraci TTAB, což odpovídá vytvoření komplexu Hya–TTAB. Při zvyšování koncentrace dochází k fázové separaci a také ke snížení koncentrace tohoto komplexu v supernatantu z důvodu vytvoření sraženiny. Poté následuje oblast nerozpustnosti barviva, kdy je část TTAB začleněna ve sraženině a část přítomna v roztoku ve formě volného monomeru. Po dosažení kritické micelární koncentrace dochází k vytvoření micel a rozpuštění barviva.

Autoři *Thalberg a kol.* [29] objasnili vliv délky řetězce alkyltrimethylamoniové soli (tenzidu) na interakce se sodnou solí kyseliny hyaluronové. Použili alkylové řetězce s 8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíky a systémy zkoumali pomocí fázové separace, měření vodivosti, NMR a solubilizačních experimentů a zjistili, že navázání tenzidu na hyaluronan je závislé na délce řetězce tenzidu, nastává pouze u tenzidů s počtem atomů vyšším než deset a při koncentraci o několik řádů nižší než je kritická micelární koncentrace. Zjistili, že postupným přidáváním tenzidu k roztoku hyaluronanu dochází nejprve k navázání molekul tenzidu na hyaluronan,

poté ke stabilizaci vznikajících agregátů a až poté se v roztoku začnou tvořit volné micely, které jsou větší než micely vázané na řetězec hyaluronanu.

Grundělová a kol. [30] studovali interakce mezi sodnou solí kyseliny hyaluronové (NaHya) a kvartérní solí benzalkonium chloridu (BAC). Na základě DLS experimentů, viskozimetrie a měření povrchového napětí došli k závěru, že NaHya má v roztoku konformaci náhodného klubka, které se postupným přidáváním BAC rozbaluje, čímž roste i střední velikost částic. Bylo také prokázáno, že od určité koncentrace BAC vznikají v roztoku agregáty. Zmíněné metody poukazují na to, že termodynamické upřednostňování interakcí BAC-BAC nebo NaHya-BAC v roztoku hyaluronanu závisí na koncentraci BAC.

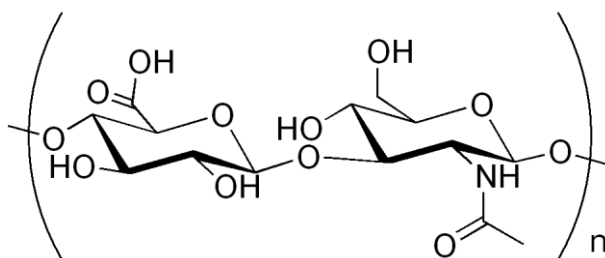
Hansson a Almgren [31] studovali fázové chování a agregační číslo alkyltrimethylamoniového tenzidu a polyakrylátem sodným (PA) a polystyren sulfonátem sodným (PSS) pomocí zhášení fluorescence, měření povrchového napětí a elektrodového měření. Zjistili, že CTAB tvoří tyčinkovité micely. Ve své práci poukazují na rozdílné chování systému PA a CTAB a PSS a CTAB. Při vysoké koncentraci soli v systému PA a CTAB dochází k oddělení fází. Dále bylo zjištěno, že kritická agregační koncentrace systému PSS se zvyšuje s jeho rostoucí koncentrací a k fázové separaci systému dochází při poměru PSS–DoTAB 1:1 jak ve zředěném, tak koncentrovaném roztoku (pozn. DoTAB je dodecyltrimethylamonium bromid). Uvádějí také, že doprovodný ion tenzidu nijak neovlivňuje agregační proces. V další jejich práci pod vedením *Almgrena* [32] opět poukazují na to, že agregační číslo nezávisí na doprovodném iontu ani na koncentraci, ale zvyšuje se se zvyšující délkou řetězce tenzidu, čímž došli ke stejnému závěru jako *Thralberg a kol.*[29].

Oyarzun-Ampuero a kol. [33] vyvinuli nosič léčiv na bázi hyaluronanových nanokapslí za pomoci CTAB. Použili kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti 29kDa a 160kDa. Tento nosič charakterizovali měřením velikosti metodou dynamického rozptylu světla a zjistili velikost okolo 200 nm, laserovou Dopplerovou velocimetrií změřili záporný zeta potenciál (−40mV) a pomocí transmisního elektronového mikroskopu kulový tvar, do něhož účinně enkapsulovali modelové hydrofobní cytostatikum docetaxel. Je nutné poznamenat, že nanokapsle jsou jednoduché na přípravu, nevyžadují kovalentní navázání, suspenze je stabilní při uchovávání a dokonce je možné ji lyofilizací přeměnit na prášek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

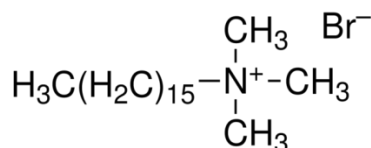
4.1 Materiály

Hyaluronan sodný Hya $M_w = 116$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 212-2859
Hya $M_w = 1669$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 2013-4722



Obr. 13: Strukturní vzorec hyaluronanu

Tenzid CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), $M_w = 364,46$ g·mol⁻¹,
CAS: 57-09-0, Sigma, Ultra ≥ 98,0%, šarže 117K0732



Obr. 14: Strukturní vzorec CTAB.

Rozpouštědlo Mili-Q voda (Milipore Akademic)

4.2 Přehled experimentů

Nejprve byly navrženy experimenty pro pozorování stability a interakcí v systému hyaluronan-tenzid v závislosti na způsobu přípravy – buď titrací roztoku hyaluronanu roztokem tenzidu CTAB nebo naopak.

Tabulka 1: Přehled experimentů při titracích hyaluronanu roztokem CTAB.

vzorek	M_w	c	titrační činidlo	c
Hya	116 kDa	15 mg·dm ⁻³	CTAB	5 mM
Hya	116 kDa	1 g·dm ⁻³	CTAB	50 mM
Hya	1669 kDa	15 mg·dm ⁻³	CTAB	5 mM
Hya	1669 kDa	1 g·dm ⁻³	CTAB	50 mM

Tabulka 2: Přehled experimentů při titracích CTAB roztokem hyaluronanu.

vzorek	c	titrační činidlo	M_w	c
CTAB	1 mM	Hya	116 kDa	$1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$
CTAB	1 mM	Hya	1669 kDa	$1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

V prvním případě byla koncentrace hyaluronanu zvolena pro porovnání nízké a vysoké koncentrace, konkrétně byl použit nativní hyaluronan o hmotnostní koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, který byl titrován roztokem CTAB o koncentraci 5 mM a nativní hyaluronan o hmotnostní koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, který byl titrován roztokem CTAB o koncentraci 50 mM. Koncentrace CTAB byla vždy dopočtena následujícím způsobem.

Příklad výpočtu potřebné koncentrace CTAB pro titraci Hya ($c = 15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) za předpokladu 100% disociace skupin hyaluronanu:

- na jedné jednotce (resp. dvojjednotce, tzn. monomeru) hyaluronanu existuje pouze jeden náboj (záporný) vzniklý disociací karboxylové skupiny
- na jedné molekule CTAB existuje také pouze jeden náboj (kladný) z kvartérní amoniové soli
- náboj na Hya = $\frac{c \text{ (g}\cdot\text{dm}^{-3})}{M_r(\text{monomer})} = \frac{15 \cdot 10^{-3}}{401,299} = 3,738 \cdot 10^{-5}$ molů náboje na 1 dm^{-3}
- objem vzorku je $10 \text{ cm}^3 \rightarrow$ koncentrace náboje je $3,738 \cdot 10^{-7}$ mol na 10 cm^3
- koncentrace zásobního roztoku CTAB zvolena 10krát větší, než je koncentrace náboje hyaluronanu v roztoku, $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3} = 5 \text{ mM}$

V případě, kdy roli titračního činidla tvořil hyaluronan, byla zvolena koncentrace tenzidu CTAB tak, aby byly v roztoku přítomné micely, tzn. okolo CMC a koncentrace hyaluronanu dopočtena obdobným způsobem jako v prvním případě, konkrétně byl tedy použit CTAB o koncentraci 1 mM a nativní hyaluronan o hmotnostní koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Pro porovnání vlivu molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakci či stabilitu byly vybrány dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu – 116 kDa a 1669 kDa. Prostředí jednotlivých systémů bylo tvořeno Mili-Q vodou.

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Nejprve bylo na analytických vahách odváženo potřebné množství práškového hyaluronanu a doplněno Mili-Q vodou na požadovaný objem. Roztok byl míchán na magnetické míchače alespoň 24 hodin a poté uchován v lednici, maximálně však týden. Byla zvolena hmotnostní koncentrace ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$) z důvodu polymerního charakteru hyaluronanu. Výsledná koncentrace zásobního roztoku byla $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ s molekulovou hmotností hyaluronanu 116 kDa a 1669 kDa.

4.3.2 Příprava zásobního roztoku CTAB

Potřebné množství tenzidu bylo naváženo na analytických vahách, doplněno vodou na požadovaný objem a důkladně rozmícháno na magnetické míchače. Zásobní roztok byl uchovávan při laboratorní teplotě, aby nedošlo k jeho vysrážení při nižší teplotě v lednici. Výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 1 mM, 5 mM a 50 mM.

4.4 Měření a vyhodnocení dat

4.4.1 Automatická titrace

Měření titrací bylo provedeno na zařízení Zetasizer Nano od společnosti Malvern Instruments. Titrace byly provedeny dvěma způsoby – titrace roztoku hyaluronanu roztokem CTAB a naopak v nastaveném rozsahu koncentrací.

Po každém přidavku titračního činidla a důkladném promíchání byly automaticky měřeny hodnoty zeta potenciálu, velikosti částic v režimu *autotitration*.

Obecný postup autotitrace byl následovný. Titrovaný roztok měl objem 10 cm^3 . Konstantní teplota po dobu měření byla zajišťována pomocí zabudovaného termostatu, konkrétně na teplotě $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Měření probíhalo v průtočné cele. Bylo zvoleno koncentrační rozmezí titračního činidla a nastaven počet bodů v tomto rozmezí, jednotlivé koncentrace byly nastaveny automaticky. Po spuštění měření přístroj změří po každém přidavku zeta potenciál a velikost částic. Výsledkem měření je graf závislosti zeta potenciálu a velikosti částic na koncentraci titračního činidla. Software také vyhodnotí isoelektrický bod (IEP).

4.4.1.1 Velikost částic

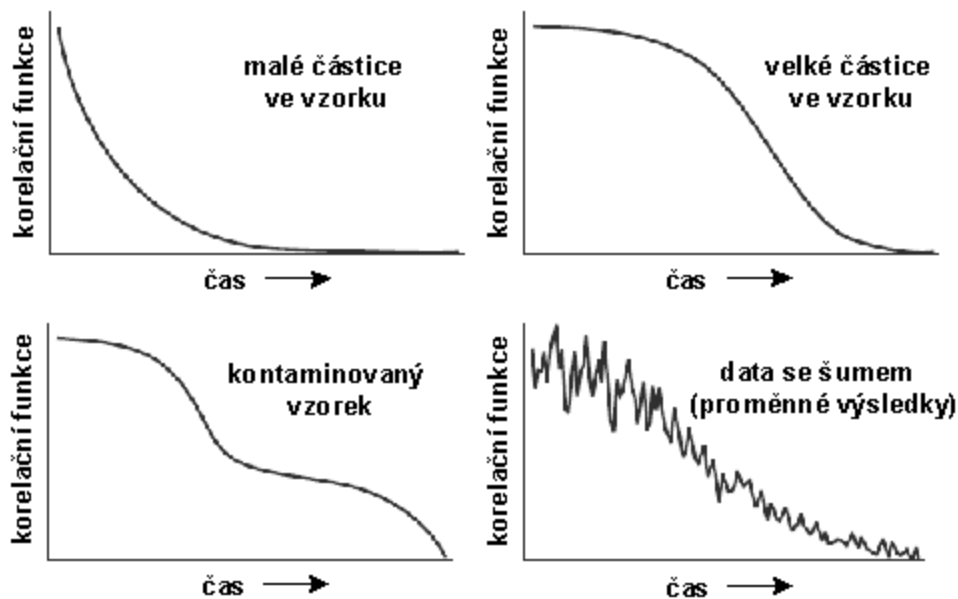
Při měření velikosti částic byl pozorován především průběh korelační křivky, podle které byly data vyhodnocovány. Na Obr. 15 jsou zobrazeny obecné korelační křivky pro vzorek s obsahem malých nebo velkých částic. Dále je zde zobrazena křivka pro kontaminovaný vzorek, což může vypovídat o obsahu prachových částic ve vzorku nebo polydisperzitě systému – systém obsahuje velké i malé částice.

Výsledkem je graf závislosti velikosti částic, tzv. z-average, na koncentraci titračního činidla. Hodnota z-average je podle ISO 22412 definovaná jako průměrná velikost harmonického průměru částice. Vzhledem k tomu, že je získaná průměrná velikost částic vážena podle páté mocniny, jsou velké částice velmi nadhodnoceny a může se stát, že velká intenzita záření rozptýleného na větších částicích zastíní frakce malých částic. Z-average (D_z) lze získat podle následující rovnice:

$$D_z \approx \frac{\sum D_i^6}{\sum D_i^5}, \quad (7)$$

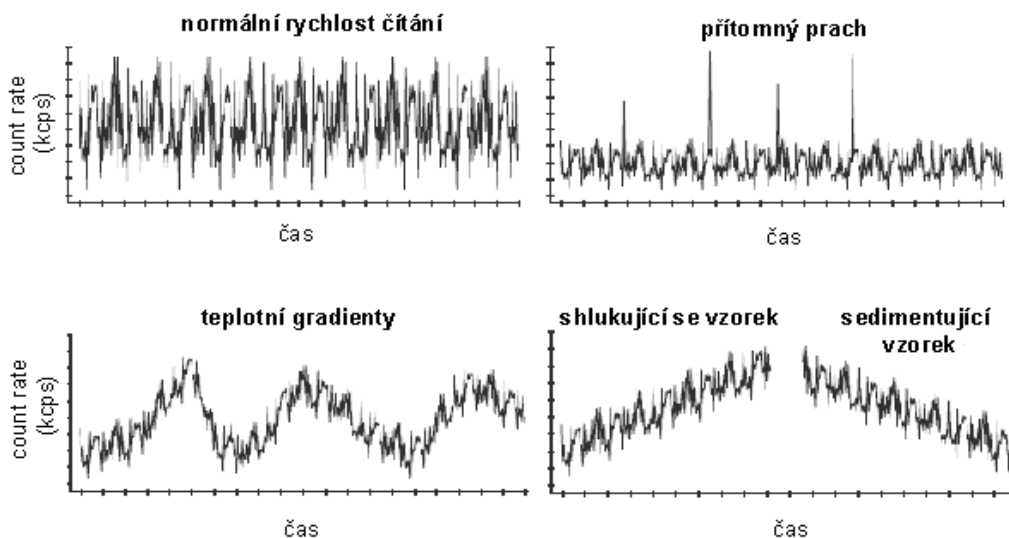
kde D_i odpovídá průměru i -té částice.

Hodnota z-average je porovnatelná s průměry změřenými jinými technikami pouze v případě kulovitých, nebo skoro kulovitých částic monodisperzního systému ve vhodném prostředí. Je to hydrodynamický parametr, proto ho lze použít pouze pro měření částic v disperzním prostředí nebo molekuly v roztoku [34].



Obr. 15: Korelační funkce v závislosti na kvalitě vzorku [24].

Dále byla sledována hodnota tzv. *count rate*, která vyjadřuje počet dopadajících fotonů za sekundu (viz Obr. 16). Lze tedy říci, že oba tyto parametry vypovídají o kvalitě vzorku.



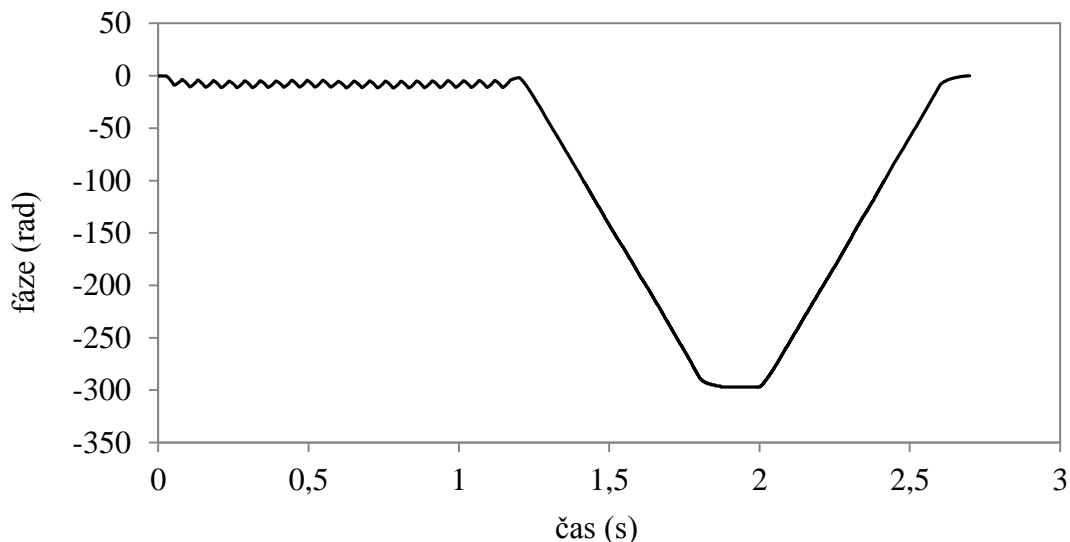
Obr. 16: Count rate v závislosti na kvalitě vzorku [24].

4.4.1.2 Zeta potenciál

Při měření zeta potenciálu byl sledován tzv. *phase plot* (fázové vynesení), který vyjadřuje fázovou odezvu na vložené napětí na elektrodách měřící cely. Na začátku měření dochází k přepólování elektrod měřící cely velice rychle – až 15krát za minutu, software určí elektroforetickou mobilitu a následně střední hodnotu zeta potenciálu. Jestliže je vodivost vzorku dostatečně nízká, dojde k pomalému pulzu napětí, díky kterému dojde k zpřesnění měření a hodnoty zeta potenciálu. Jestliže vodivost není dostatečně nízká, nedochází

k pomalému pulzu napětí, neboť by vložené napětí mohlo narušit vzorek nebo by mohlo dojít k zoxidování elektrod.

Je-li *phase plot* vyobrazen v kladných hodnotách, znamená to, že částice v systému mají vnější kladný náboj, v opačném případě mají částice náboj záporný (viz. Obr. 17).



Obr. 17: Vyobrazení *phase plot* systému s vnějším záporným nábojem.

4.4.2 Statistika

Všechny autotitrace byly provedeny minimálně třikrát. Měření velikosti částic a zeta potenciálu bylo provedeno třikrát v každém měření, prezentované závislosti jsou tedy průměrem z celkem devíti měření.

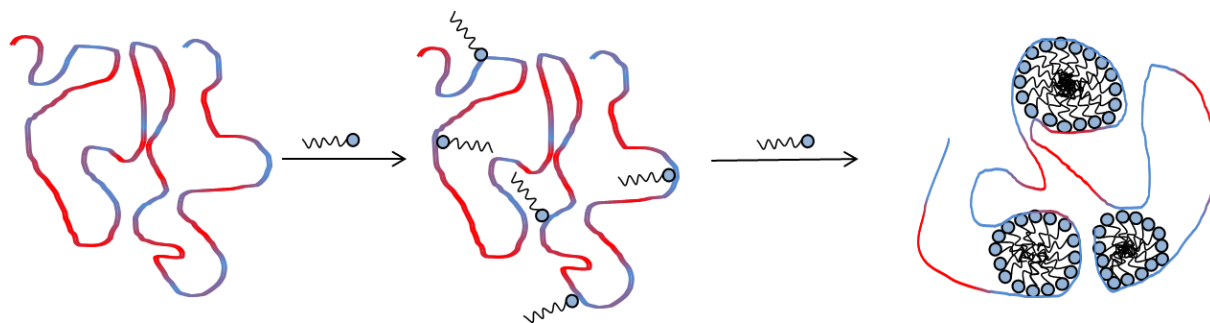
K jednotlivým hodnotám byla v programu MS Excel stanovena směrodatná odchylka a v grafech jsou získané směrodatné odchylky znázorněny pomocí chybových úseček.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Dynamický rozptyl světla

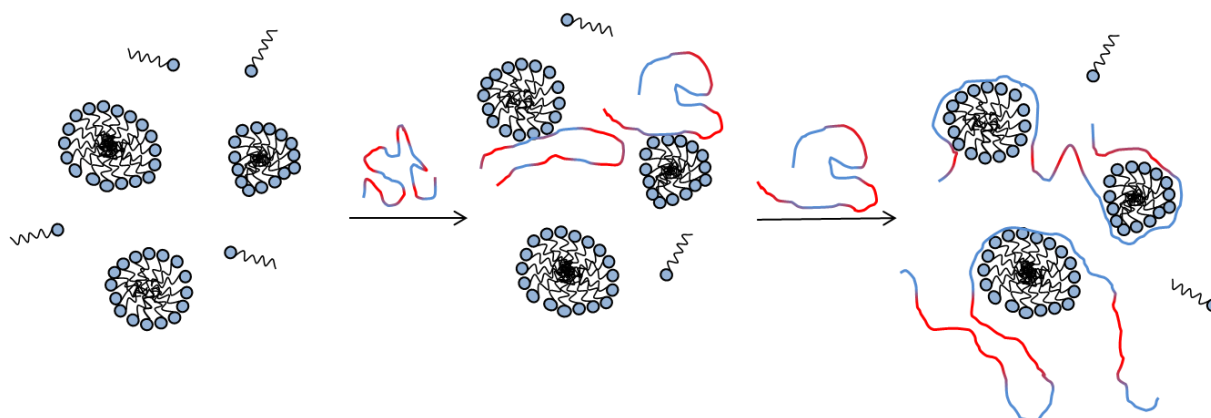
Na Obr. 18 a Obr. 19 je vyobrazen teoretický průběh titrace. Jak již bylo zmíněno výše, hyaluronan se v roztoku vyskytuje ve formě zkroucené stuhovité struktury. Červená oblast je relativně hydrofobní, zatímco modrá oblast více hydrofilní. Důsledkem doménové struktury je omezená difúze molekul skrz síť hyaluronanu, proto se mohou malé molekuly, jako je voda nebo právě molekuly tenzidu, volně šířit uvnitř domény.

Na Obr. 18 je vyobrazen teoretický průběh titrace roztoku CTAB do roztoku hyaluronanu. K roztoku hyaluronanu je po malých krocích přidáván roztok CTAB a jednotlivé molekuly tenzidu interagují s disociovanými karboxylovými skupinami hyaluronanu. V okamžiku, kdy je koncentrace tenzidu dostatečná, začnou se na disociovaných karboxylových skupinách řetězce hyaluronanu vytvářet drobné agregáty, tzv. minimicely, které jsou poutány elektrostatickými silami. Výsledkem je struktura nazývaná „perlový náhrdelník“. Při dosažení isoelektrického bodu dochází k interakci všech disociovaných karboxylových skupin hyaluronanu s molekulami CTAB, systém má tedy vnější nulový náboj. Při dalším přidávku CTAB již nedochází k dalším interakcím hyaluronanu s molekulami tenzidu, ale v roztoku se začnou tvořit volné micely.



Obr. 18: Průběh titrace tenzidu do hyaluronanu.

Na Obr. 19 je vyobrazen teoretický průběh titrace roztoku hyaluronanu do roztoku CTAB. K roztoku CTAB je pomalu přidáván roztok hyaluronanu. Jestliže je koncentrace tenzidu větší než CMC, jsou v roztoku přítomny micely. Postupným přidáváním roztoku hyaluronanu dochází k interakci kladných hlav micel s disociovanými karboxylovými skupinami hyaluronanu. K interakcím dochází tak dlouho, dokud jsou v roztoku přítomny kladně nabitě hlavy micel.



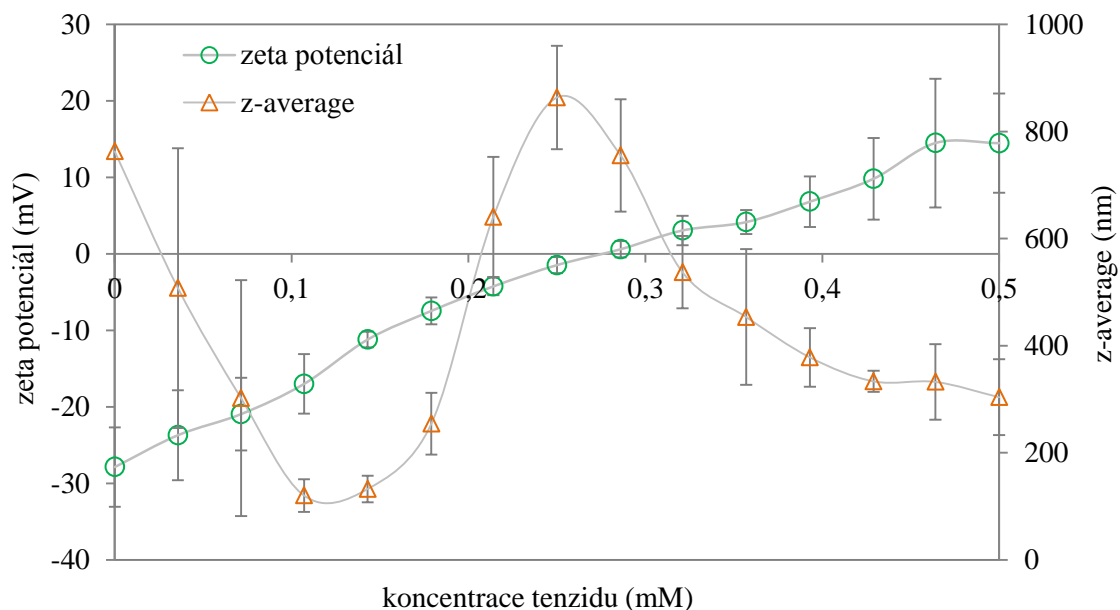
Obr. 19: Průběh titrace hyaluronanu do tenzidu.

5.1.1 Titrace CTAB do hyaluronanu ($M_w = 116$ kDa) ve vodném prostředí

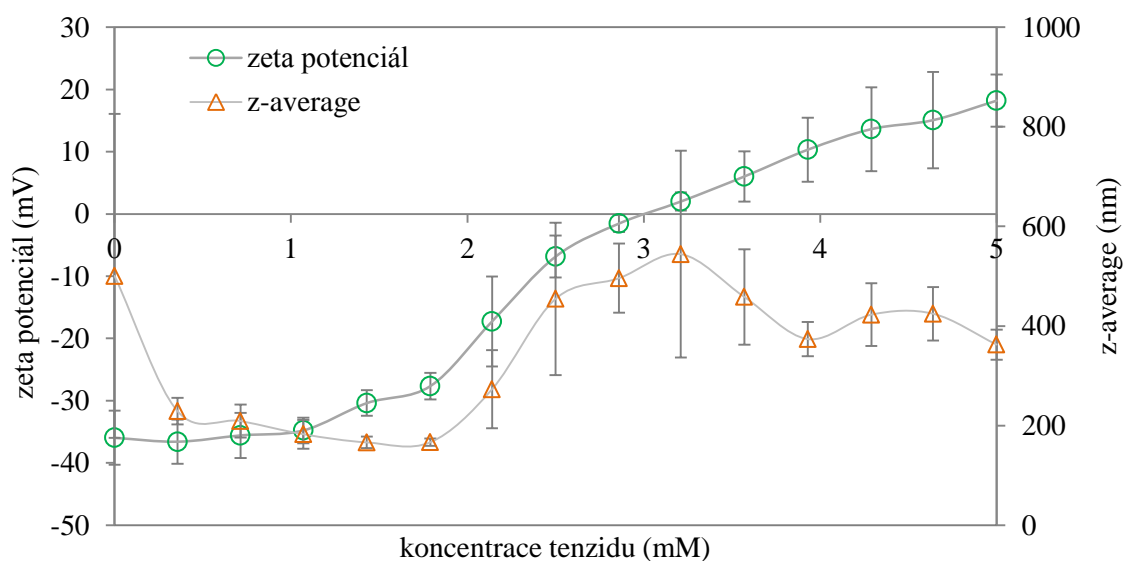
Obr. 20 a Obr. 21 zobrazují průběh titrace CTAB do hyaluronanu o molekulové hmotnosti 116 kDa a různé koncentraci hyaluronanu ve vodném prostředí.

Obr. 20 zobrazuje průběh titrace CTAB o koncentraci 5mM do hyaluronanu o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve vodném prostředí. Je zde vyobrazena závislost zeta potenciálu a velikosti částic na koncentraci přidávaného tenzidu ve vzorku. Roztok hyaluronanu má vnější záporný náboj, tudíž záporný zeta potenciál, který leží na hranici -30 mV , z čehož lze usoudit, že je systém zpočátku stabilní. Postupným přidáváním CTAB dochází k postupnému navázání kladných hlav molekul tenzidu na záporně nabitě disociované karboxylové skupiny hyaluronanu. Isoelektrický bod je dosažen při koncentraci tenzidu ve vzorku $0,275 \text{ mM}$. Poté získá roztok postupným přidáváním CTAB vnější kladný náboj, který však není dostatečně vysoký, aby bylo systém možno považovat za stabilní. Při dosažení isoelektrického bodu dochází k fázové separaci systému – vysrážení v důsledku vykompenzování nábojů v systému. Všechny disociované karboxylové skupiny hyaluronanu, které zajišťují rozpustnost řetězce hyaluronanu ve vodě, jsou „okupovány“ navázanými molekulami tenzidu. Na začátku titrace, kdy je v roztoku přítomen pouze hyaluronan, se velikost částic pohybuje v rozmezí $400\text{--}800 \text{ nm}$, tyto hodnoty jsou však zatíženy nezanedbatelnou chybou, což lze usuzovat podle chybových úseček. Již dříve bylo zjištěno, že samotný roztok hyaluronanu je velice polydisperzní, a proto jsou tyto hodnoty zatíženy velkou chybou [35]. Velikost částic těsně po fázové separaci se pohybuje okolo $600\text{--}800 \text{ nm}$, dalším přidavkem však dochází k rozpuštění vzniklých agregátů a velikost je v rozmezí $300\text{--}400 \text{ nm}$.

Obr. 21 zobrazuje průběh titrace CTAB o koncentraci 50 mM do hyaluronanu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve vodném prostředí. K dosažení isoelektrického bodu dochází při koncentraci CTAB ve vzorku $3,000 \text{ mM}$, což je přibližně 10krát větší hodnota IEP než u koncentrace $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, přičemž jeho koncentrace je přibližně 60krát větší. Z tohoto faktu lze usuzovat, že interakce v systému hyaluronan-tenzid jsou značně ovlivněny koncentrací hyaluronanu. V porovnání s Obr. 20 je průběh závislosti velikosti částic na koncentraci odlišný. Především zde nedochází k vytvoření velkých agregátů jako při nižší koncentraci, při dosažení IEP dochází k fázové separaci v menší míře a velikost částic se pohybuje okolo 500 nm .



Obr. 20: Průběh titrace CTAB (5 mM) do hyaluronanu ($c = 15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).



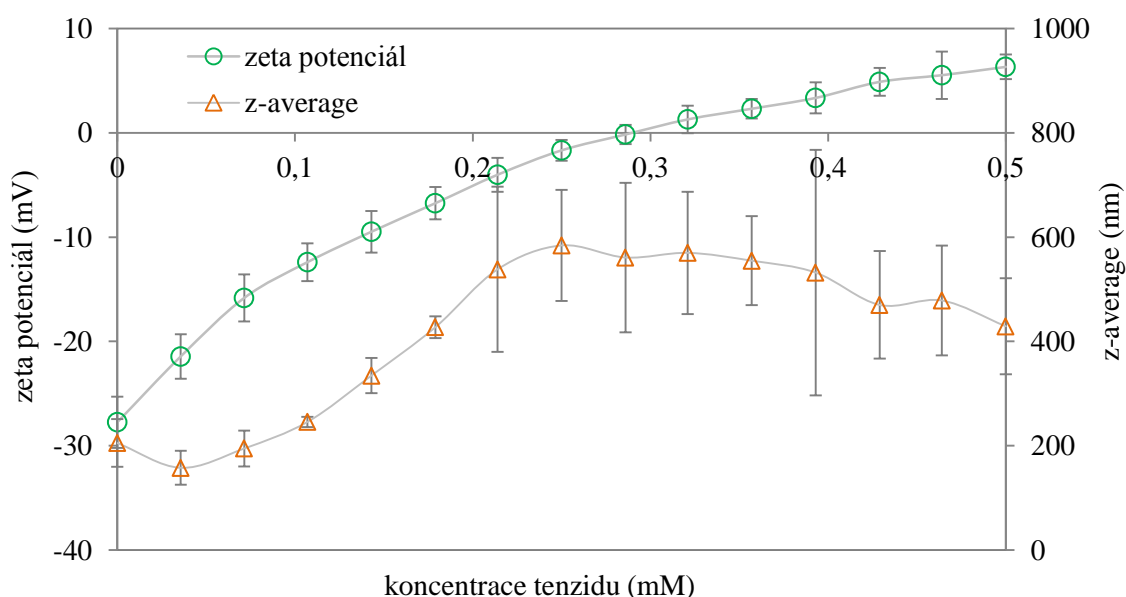
Obr. 21: Průběh titrace CTAB (50 mM) do hyaluronanu ($c = 1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$).

5.1.2 Titrace CTAB do hyaluronanu ($M_w = 1669 \text{ kDa}$) ve vodném prostředí

Obr. 22 a Obr. 23 zobrazují průběh titrace CTAB do hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1669 kDa a různé koncentraci hyaluronanu ve vodném prostředí.

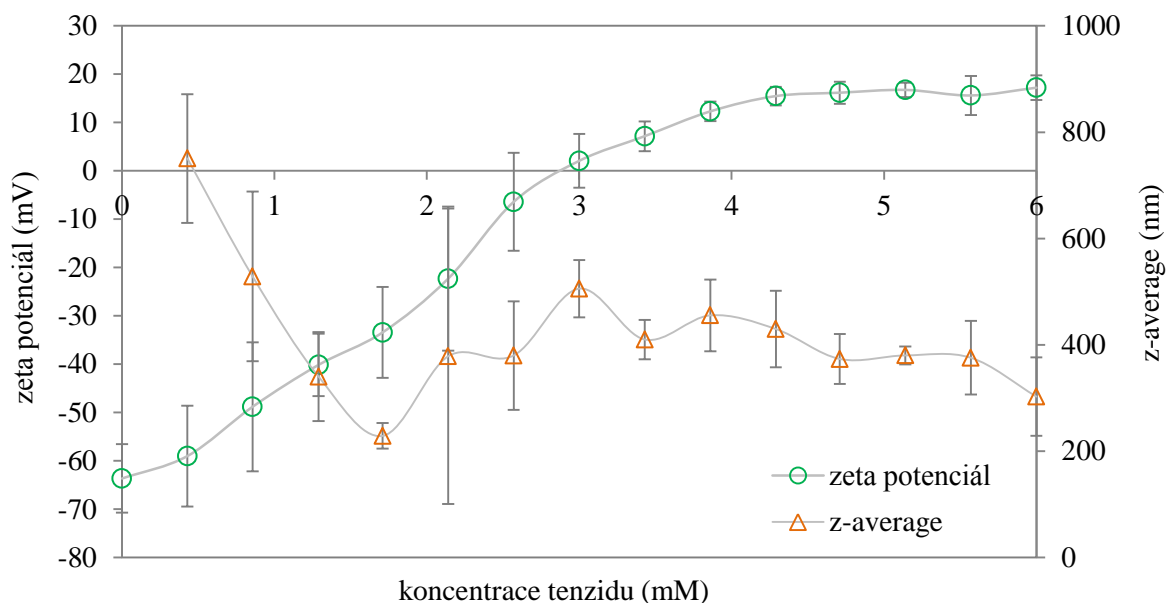
Obr. 22 znázorňuje průběh titrace CTAB o koncentraci 5 mM do hyaluronanu o koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve vodném prostředí. Je zde vyobrazena závislost zeta potenciálu a velikosti částic (z-average) na koncentraci přidávaného tenzidu do vzorku. Na začátku obsahuje systém pouze hyaluronan, tudíž má záporný zeta potenciál, postupným přidáváním CTAB docházelo ke zvyšování zeta potenciálu. K dosažení IEP dochází při koncentraci

tenzidu ve vzorku 0,290 mM. Průběh zeta potenciálu na Obr. 22 je podobný s průběhem na Obr. 22, má velice podobnou i hodnotu zeta potenciálu, z čehož lze usoudit, že hodnota IEP není ovlivněna molekulovou hmotností. Ze závislosti velikosti částic na koncentraci přidávaného tenzidu lze říci, že postupně dochází ke vzniku agregátů, ale při dosažení IEP nedochází k vysrážení ani k rozpuštění vzniklých agregátů a velikost částic se pohybuje kolem konstantní velikosti 500 nm. Ve vzorku bylo možné po skončení měření pozorovat jemnou bílou sraženinu.



Obr. 22: Průběh titrace CTAB (5 mM) do hyaluronanu ($c = 15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Na Obr. 23 je zobrazen průběh titrace CTAB o koncentraci 50 mM do hyaluronanu o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve vodném prostředí. Ze závislosti zeta potenciálu na koncentraci lze usuzovat o vysoké počáteční stabilitě systému, neboť zeta potenciál na počátku titrace je -63 mV . Po dosažení IEP při koncentraci 0,290 mM získává systém kladný zeta potenciál. Od koncentrace tenzidu v roztoku 3,8 mM má vzorek přibližně konstantní zeta potenciál okolo hodnoty 15 mV. Průběh závislosti velikosti částic na koncentraci je podobný jako v případě nízkomolekulárního hyaluronanu o stejné koncentraci viz Obr. 21, nejdříve jsou v roztoku přítomny větší částice samotného hyaluronanu, ovšem průběh korelační funkce není ideální. Tato kombinace koncentrací vede ke vzniku velice polydisperzního systému, který byl v mnoha případech neměřitelný z důvodu vysrážení systému. Z grafu je odebrán první bod z průběhu velikosti částic, neboť jeho velikost (5393 nm) zkreslovala všechny ostatní. Vysrážený systém je vyfocen na Obr. 24. V roztoku během titrace vznikaly bílé sraženiny, které znesnadňovaly měření. Ve většině případů nebylo titraci možné doměřit, neboť velikost vzniklých sraženin nebyl přístroj schopný změřit.



Obr. 23: Průběh titrace CTAB (50 mM) do hyaluronanu ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$).

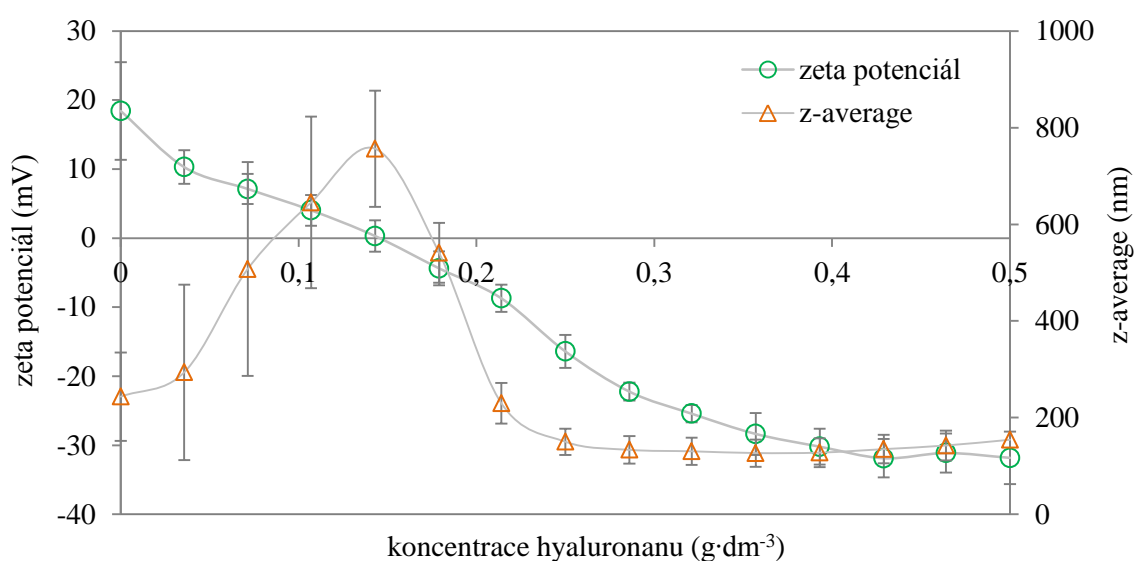


Obr. 24: Vzniklé sraženiny při titraci CTAB (50 mM) do hyaluronanu ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$).

5.1.3 Titrace hyaluronanu ($M_w = 116 \text{ kDa}$) do CTAB ve vodném prostředí

Na Obr. 25 je znázorněn průběh titrace hyaluronanu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a molekulové hmotnosti 116 kDa do CTAB o koncentraci 1 mM ve vodném prostředí. Na začátku titrace obsahuje vzorek pouze CTAB, tudíž má systém kladný zeta potenciál. Postupným přidáváním hyaluronanu dochází k interakcím kladného CTAB se záporným hyaluronanem a vnější náboj, tudíž i zeta potenciál se postupně snižuje. Nulového vnějšího náboje dosáhl systém

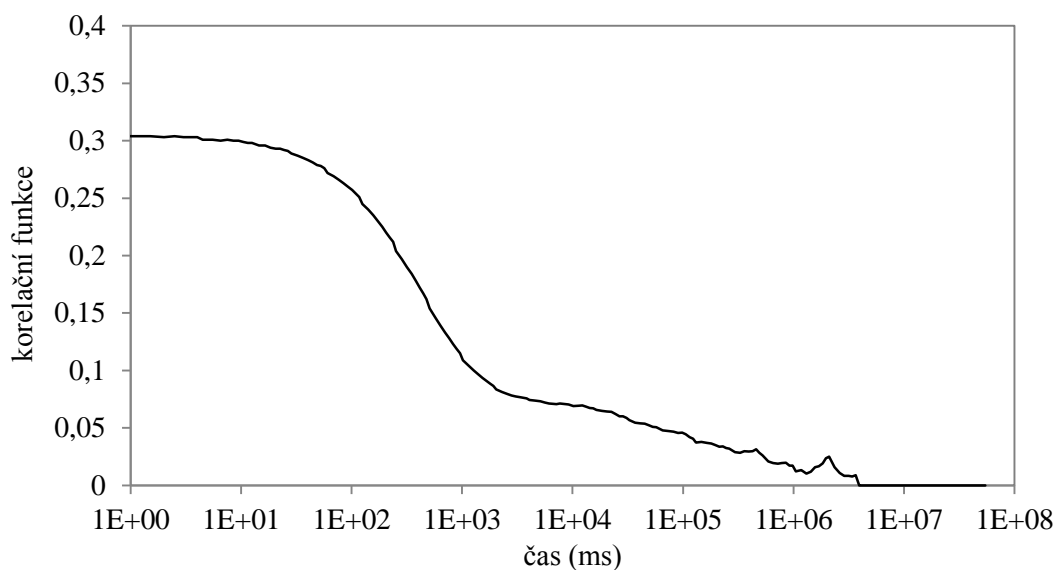
při koncentraci hyaluronanu v roztoku $0,144 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Dalším přidavkem hyaluronanu získává systém vnější záporný náboj, tudíž i zeta potenciál. Od koncentrace $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ se hodnota zeta potenciálu ustálila na hodnotě -30 mV , takže lze říci, že je systém stabilní. Dále je zde vyobrazena závislost z-average na koncentraci hyaluronanu v roztoku. Postupným přidáváním hyaluronanu dochází k interakcím a zvětšování velikosti částic – tvorbě agregátů. Největší částice jsou přítomny v roztoku při dosažení IEP – dochází k fázové separaci, poté se systém vrací do původního rovnovážného stavu a velikost částic se ustálí na hodnotě okolo 180 nm . Průběh korelačních funkcí je zobrazen v příloze 9.1. Na této velikosti se systém ustálí již od koncentrace hyaluronanu v roztoku $0,25 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Stejněho výsledku dosáhli ve svých experimentech i *Oyarzun-Ampuero a kol.* [33], kteří se stejným systémem naměřili velikost částic okolo 200 nm .



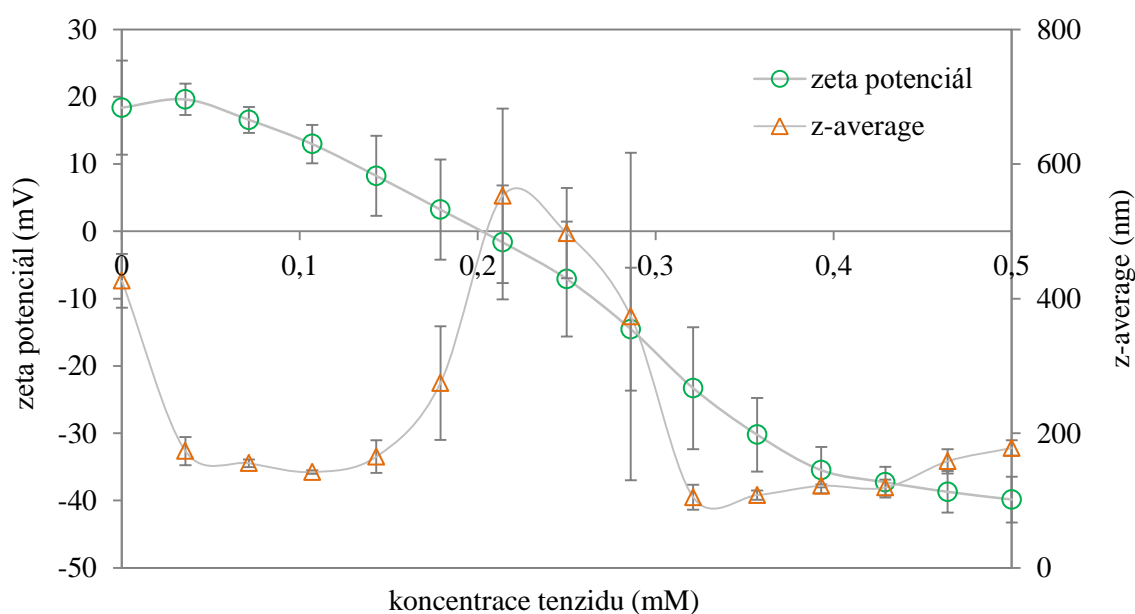
Obr. 25: Průběh titrace hyaluronanu ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) do CTAB (1 mM).

5.1.4 Titrace hyaluronanu ($M_w = 1669 \text{ kDa}$) do CTAB ve vodném prostředí

Na Obr. 27 je znázorněn průběh titrace hyaluronanu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a molekulové hmotnosti 1669 kDa do CTAB o koncentraci 1 mM ve vodném prostředí. Průběh závislosti zeta potenciálu na koncentraci hyaluronanu je podobný jako v případě nízkomolekulárního hyaluronanu. Isoelektrického bodu bylo dosaženo při koncentraci hyaluronanu v roztoku $0,210 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Závislost z-average na koncentraci hyaluronanu se zdá být také podobná, ale při bližším zkoumání systému bylo sledováním průběhu korelační funkce (viz. Obr. 26) zjištěno, že systém je po celou dobu velmi polydisperzní.



Obr. 26: Příklad neideální průběh korelační funkce při titraci hyaluronanu ($1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) do CTAB (1 mM) při nulovém přídavku hyaluronanu.



Obr. 27: Průběh titrace hyaluronanu ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) do CTAB (1 mM).

5.2 Disociace hyaluronanu

5.2.1 Titrace CTAB do hyaluronanu

Hyaluronan není v roztoku 100% disociován, reálnou disociaci lze vypočítat pomocí isoelektrického bodu zjištěného při titraci následujícím způsobem:

- předpokládáme disociaci všech karboxylových skupin hyaluronanu, což znamená, že vzorek (10 cm^{-3} , $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) obsahuje $3,738 \cdot 10^{-7}$ molů náboje (výpočet kapitola 4.2, náboj závisí na koncentraci hyaluronanu)

- při dosažení IEP má systém nulový vnější náboj, což znamená, že jsou všechny přístupné molekuly hyaluronanu obsazeny molekulami tenzidu, jehož koncentrace v roztoku je známa a lze z ní vypočítat náboj v roztoku
- reálnou disociaci lze vypočítat vydělením hodnoty koncentrace tenzidu v IEP hodnotou náboje při 100% disociaci

Tabulka 3: Disociace hyaluronanu při titraci CTAB do hyaluronanu.

vzorek	koncentrace	IEP	náboj Hya v 10 cm^{-3}	reálná disociace
Hya 116 kDa	$15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,274 mM	$3,738 \cdot 10^{-7}$ molů	73,5 %
Hya 1669 kDa	$15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,290 mM	$3,738 \cdot 10^{-7}$ molů	77,7 %
Hya 116 kDa	$1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$	3,000 mM	$2,492 \cdot 10^{-5}$ molů	12,0 %
Hya 1669 kDa	$1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$	2,810 mM	$2,492 \cdot 10^{-5}$ molů	11,3 %

Výsledná reálná disociace nízkomolekulárního hyaluronanu (116 kDa) je značně závislá na jeho koncentraci, stejně tak i reálná disociace vysokomolekulárního hyaluronanu (1669 kDa). Při koncentraci hyaluronanu $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ je zjištěná reálná disociace nízkomolekulárního hyaluronanu 73,5 %, což je porovnatelná hodnota s reálnou disociací vysokomolekulárního hyaluronanu o stejné koncentraci, 77,7 %. Při koncentraci hyaluronanu $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ je zjištěná reálná disociace nízkomolekulárního hyaluronanu 12,0 %, což je opět porovnatelná hodnota s reálnou disociací vysokomolekulárního hyaluronanu o stejné koncentraci, 11,3 %.

Z výsledků tedy vyplývá, že reálná disociace není závislá na molekulové hmotnosti hyaluronanu, jak by se dalo očekávat, ale pouze na jeho koncentraci. Tento jev je pravděpodobně způsoben uspořádáním hyaluronanu v roztoku. Hyaluronan má při nízké koncentraci jinou konformaci než při vysoké. Při nízké koncentraci se hyaluronan v roztoku nachází ve formě „nataženého“ řetězce s dobrou dostupností karboxylových skupin pro molekuly tenzidu. Oproti tomu při vysoké koncentraci se hyaluronan sbalí do klubka, čímž se stanou karboxylové skupiny špatně dostupné, což je příčinou zjištění nižšího stupně disociace hyaluronanu.

5.2.2 Titrace hyaluronanu do CTAB

Za předpokladu že je hyaluronan v roztoku 100% disociován a s pomocí zjištěného isoelektrického bodu při titraci lze reálnou disociaci hyaluronanu vypočítat následujícím způsobem:

- předpokládáme disociaci všech karboxylových skupin hyaluronanu, to znamená, že titrační činidlo obsahuje $2,492 \cdot 10^{-6}$ molů náboje v 1 cm^{-3}
- při dosažení IEP má systém vnější nulový náboj, takže všechny kladně nabitě hlavy tenzidu jsou vykompenzovány záporně nabitými disociovanými karboxylovými skupinami, jejichž koncentrace v roztoku je známa a lze z ní vypočítat reálný náboj v roztoku
- reálnou disociaci lze vypočítat podělením reálného náboje v roztoku a náboje při 100% disociaci

Tabulka 4: Disociace hyaluronanu při titraci hyaluronanu do CTAB.

vzorek	koncentrace	IEP	reálný náboj Hya v 1 cm⁻³	reálná disociace
Hya 116 kDa	1 g·dm ⁻³	0,144 g·dm ⁻³	3,597·10 ⁻⁷ molů	14,4 %
Hya 1669 kDa	1 g·dm ⁻³	0,210 g·dm ⁻³	5,233·10 ⁻⁷ molů	21,0 %

Výsledná reálná disociace nízkomolekulárního hyaluronanu při titraci do CTAB o koncentraci 1 mM je 14,4 %. Získaná reálná disociace vysokomolekulárního hyaluronanu je 21,0 %, což je porovnatelná hodnota s nízkomolekulárním hyaluronanem při stejném způsobu titrace.

Reálná disociace je poměrně nízká, což je pravděpodobně způsobeno odlišnou interakcí složek kvůli sterickému bránění. Systém hyaluronan-tenzid je velice dynamický systém, ve kterém dochází k neustálému přeuspořádání jednotlivých složek, které jsou vázány pouze elektrostatickými interakcemi. Zjištěné hodnoty reálné disociace hyaluronanu jsou proto ovlivněny dynamikou systému a nejedná se tedy o konečné a jednoznačné hodnoty.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení vlivu způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid na interakce a stabilitu vzniklých komplexů. Konkrétním studovaným systémem se stal komplex nativního hyaluronanu s kationaktivním tenzidem cetyltrimetylamonium bromidem. Byla provedena rešerše týkající se studia stability a interakcí v systémech biopolymer-tenzid se zvláštním důrazem na interakce opačně nabitých částic. Bylo zjištěno, že nebyla publikována žádná práce zabývající se studiem systému hyaluronan-tenzid pomocí autotitrace. Byly shromážděny literární poznatky zabývající se především interakcemi hyaluronanu a alkyltrimetylamoniových solí a zkoumání těchto systémů metodou dynamického rozptylu světla.

V této práci byla zkoumána stabilita a interakce nativního hyaluronanu a kationaktivního tenzidu CTAB ve vodném prostředí v závislosti na způsobu přípravy těchto systémů. Pro charakterizaci vlastností těchto systémů byla vybrána metoda dynamického rozptylu světla, konkrétně měření zeta potenciálu a velikosti částic. Pro porovnání byl použit nízkomolekulární a vysokomolekulární hyaluronan o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byly navrženy experimenty lišící se způsobem přípravy systému – buď titrací roztoku CTAB do roztoku hyaluronanu nebo naopak.

Při titracích CTAB do hyaluronanu byl po malých krocích přidáván tenzid a docházelo k postupnému navázání na hyaluronan a vzniku micel. V systému tedy docházelo k interakcím záporného hyaluronanu s kladně nabitým CTAB. K dosažení isoelektrického bodu (IEP) docházelo při vyrovnání nábojů jednotlivých složek v systému. V případě nízkomolekulárního hyaluronanu o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl dosažen IEP při podobné koncentraci tenzidu v roztoku jako u vysokomolekulárního hyaluronanu. Podobná shoda byla zjištěna i u koncentrace hyaluronanu $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při porovnání hyaluronanu o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ se hodnota IEP liší přibližně 10krát, ovšem koncentrace hyaluronanu přibližně 60krát. Lze tedy říci, že molekulová hmotnost hyaluronanu neovlivňuje interakce. Interakce jsou v tomto případě značně ovlivněny koncentrací hyaluronanu.

Při titracích hyaluronanu do CTAB byl do roztoku CTAB přidáván hyaluronan po malých krocích. Micely přítomné v roztoku tenzidu byly postupně obalovány hyaluronanem. K vyrovnání náboje docházelo při přibližně stejné koncentraci jak nízko- tak vysokomolekulárního hyaluronanu v roztoku.

Dále byla stanovena disociace hyaluronanu v roztoku. Reálná disociace nízkomolekulárního hyaluronanu o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ je velice podobná hodnotě disociace vysokomolekulárního hyaluronanu o stejné koncentraci. Konkrétně se hodnota disociace pohybuje okolo 75 %. V případě vyšší koncentrace hyaluronanu, $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, jsou hodnoty disociace podstatně nižší, než při koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Hodnoty disociace jsou opět velice podobné u nízko- i vysokomolekulárního hyaluronanu, konkrétně okolo 11,5 %. Ačkoli by měl být hyaluronan v roztoku disociován nezávisle na koncentraci, na základě naší metody tomu tak není. Důvodem je rozdílná konformace hyaluronanu v roztoku, hyaluronan o nízké koncentraci zaujímá v roztoku formu nataženého řetězce s dobrou dostupností karboxylových

skupin. Oproti tomu hyaluronan o vysoké koncentraci je v roztoku sbalen do klubka, což je příčinou špatné dostupnosti karboxylových skupin, což znesnadňuje interakce s tenzidem.

Nejvhodnějším systémem z hlediska využití jako nosiče biologicky aktivních látek se jeví systém o složení nízkomolekulární hyaluronan o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a CTAB o koncentraci 1 mM. Výhodou tohoto systému je především velikost agregátů v systému pod 200 nm v širokém rozmezí koncentrace hyaluronanu. Tato velikost je nutná k „přežití“ nosiče biologicky aktivní látky v těle pacienta, protože částice větší než 200 nm jsou napadeny bílými krvinkami a dochází k odstranění imunitním systémem. Lze konstatovat, že bylo dosaženo stejných výsledků, jako ve své práci uvádějí *Oyarzun-Ampuero a kol.* [33].

Na závěr lze konstatovat, že cíle bakalářské práce byly splněny. Práce poskytla základní informace o vlivu způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid. Na tuto práci by bylo vhodné navázat a pokračovat v charakterizaci systémů, například se zaměřit na stabilitu v čase či při fyziologické teplotě. Dále by bylo vhodné použít jako rozpouštědlo fyziologický roztok a prostudovat stabilitu těchto systémů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Velký lékařský slovník*. 2008 [cit. 2014-03-20]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/hyaloideus-1>
- [2] HASCALL, V. C. a T. C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] Známý neznámý hyaluronan. In: *Chempoint* [online]. 2011 [cit. 2014-03-20]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/znamy-neznamy-hyaluronan>
- [4] VASI, Ana-Maria, Marcel Ionel POPA, Maria BUTNARU, Gianina DODI a Liliana VERESTIUC. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications: Monolayers and Micelles. *Materials Science and Engineering: C*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2014, vol. 38, issue 1, s. 1-9. DOI: 10.1016/j.msec.2014.01.052. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114000605>
- [5] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications: the scientific and clinical evidence. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, issue 3, s. 469-489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681507001805>
- [6] PRICE, Richard D., M.G. BERRY a Harshad A. NAVSARIA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive*. 2007, vol. 60, issue 10, s. 1110-1119. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681507001805>
- [7] STERN, R a GIOVANNI ABATANGELO. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*. 2004, vol. 83, issue 7, s. 317-325. DOI: 10.1078/0171-9335-00392. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x>
- [8] ARNDT, Tomáš. Kyselina hyaluronová. In: *Celostnimediceina* [online]. 2009 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: www.celostnimediceina.cz/kyselina-hyaluronova.htm
- [9] NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, roč. 53, č. 8. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [10] CHEN, W. Y. JOHN a GIOVANNI ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999, vol. 7, issue 2, s. 79-89. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x>
- [11] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-708-0422-X.
- [12] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5th ed. Praha : VŠCHT Praha, 2005. P. 101. ISBN 80-7080-579-X
- [13] KVÍTEK, Libor. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 70 s. ISBN 978-80-244-1669-4.

- [14] MÜLLEROVÁ, Martina, ŠVÁB, Marek, MOREIRA DOS SANTOS, Manuela. Měření kritických micelárních koncentrací tenzidů ve vodných roztocích. *Chemické listy*, 2007, Roč. 101, č. 6, s. 509-514. ISSN: 0009-2770
- [15] THÉVENOT, Caroline, Bruno GRASSL, Guillaume BASTIAT a William BINANA. Aggregation number and critical micellar concentration of surfactant determined by time-dependent static light scattering (TDSLS) and conductivity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2005, vol. 252, 2-3. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.10.062. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775704007812>
- [16] Surfactants in Solution: Monolayers and Micelles. *Surfactant Science and Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2005-09-09. DOI: 10.1002/047174607X.ch4. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/047174607X.ch4>
- [17] LEE, Yoon S. *Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2008. ISBN 04-702-4883-1.
- [18] BERNE, Bruce J a Robert PECORA. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover ed. Mineola, N.Y.: Dover Publications, 2000, vii, 376 p. ISBN 04-864-1155-9.
- [19] PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. New York: Plenum Press, c1985. ISBN 03-064-1790-1.
- [20] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006.
- [21] KVÍTEK, Libor, NOVOTNÝ a Petr PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy*. 1998, č. 92, s. 431-433. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_431-433.pdf
- [22] PABST, W. a E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT Praha, 2007.
- [23] Krystalografická společnost [online]. 2001 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [24] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. Worcestershire, United Kingdom, 2007.
- [25] MPT-2 Autotitrator: User Manual. In: *Nanoscience Center* [online]. 2007 [cit. 2014-04-2]. Dostupné z: <http://nano.indiana.edu/Files/Zetasizer/MPT-2%20Autotitrator%20Manual.pdf>
- [26] Nádorová onemocnění. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2007 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>
- [27] ANALÝZA: Na co umíráme?. In: *Demografie* [online]. 2007 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: http://www.demografie.info/?cz_detail_clanku&artclID=463
- [28] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, vol. 93, issue 4, s. 1478-1483. DOI: 10.1021/j100341a058. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [29] THALBERG, Kyrre., Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10, s. 4289-4295. DOI: 10.1021/j100373a075. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100373a075>

- [30] GŘUNDĚLOVÁ, Lenka, Aleš MRÁČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Petr SMOLKA. The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 98, issue 1, s. 1039-1044. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171300653X>
- [31] HANSSON, Per a Mats ALMGREN. Interaction of Alkyltrimethylammonium Surfactants with Polyacrylate and Poly(styrenesulfonate) in Aqueous Solution: Phase Behavior and Surfactant Aggregation Numbers. *Langmuir*. 1994, vol. 10, issue 7, s. 2115-2124. DOI: 10.1021/la00019a017. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la00019a017>
- [32] ALMGREN Mats, Per HANSSON, Emad MUKHTAR a Jan VAN STAM. Aggregation of alkyltrimethylammonium surfactants in aqueous poly(styrenesulfonate) solutions: Phase Behavior and Surfactant Aggregation Numbers. *Langmuir*. 1992, vol. 8, issue 10, s. 2405-2412. DOI: 10.1021/la00046a011. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la00046a011>
- [33] OYARZUN-AMPUERO, Felipe A., Gustavo R. RIVERA-RODRÍGUEZ, Maria J. ALONSO a Dolores TORRES. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery: Phase Behavior and Surfactant Aggregation Numbers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, vol. 49, issue 4, s. 483-490. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.05.008. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098713001875>
- [34] *DYNAMIC LIGHT SCATTERING: COMMON TERMS DEFINED* [online]. 2011 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf
- [35] HEJNÁ, Jana. *Hyaluronové mikro- a nanočástice*. Brno, 2013. Diplomová práce. VUT FCH.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

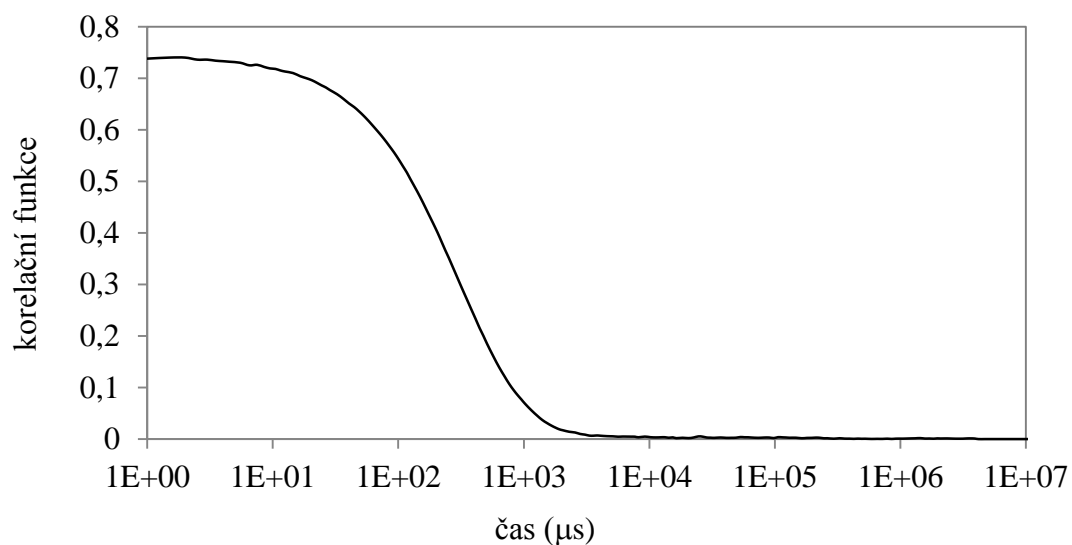
zkratka	význam
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, 1 Da odpovídá $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
DLS	dynamický rozptyl světla
Hya, NaHya	kyselina hyaluronová, hyaluronan
IEP	isoelektrický bod
PAL	povrchově aktivní látka
TTAB	tetradecyltrimetylammonium bromid
NMR	nukleární magnetické resonance
BAC	benzalkonium chlorid
PSS	polystyren sulfonát sodný
PA	polyakrylát sodný

8.2 Seznam symbolů

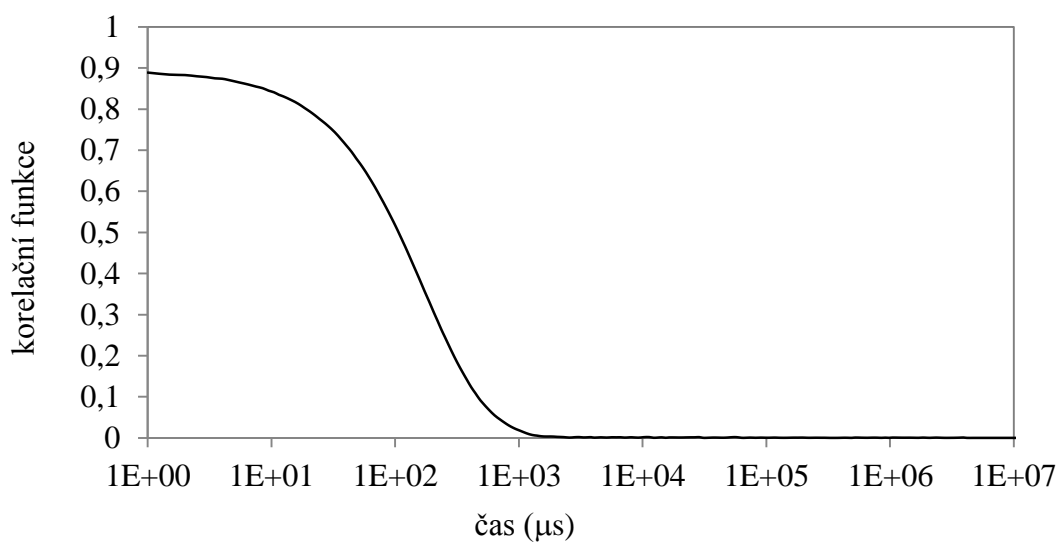
symbol	význam
kg	kilogram
λ	vlnová délka
r	poloměr částice
I	intenzita dopadajícího záření
I_0	intenzita prošlého záření
τ	turbidita
l	tloušťka vrstvy
ζ	zeta potenciál
U_E	elektroforetická mobilita
ε	dielektrická konstanta
η	viskozita rozpouštědla
$f(ka)$	Henryho funkce
M_w	molekulová hmotnost
t_c	relaxační čas
$g(t)$	autokorelační funkce
D	difúzní koeficient
q	rozptylový vektor
k	Boltzmannova konstanta
D_z	průměr, z-average
D_i	průměr i-té částice

9 PŘÍLOHY

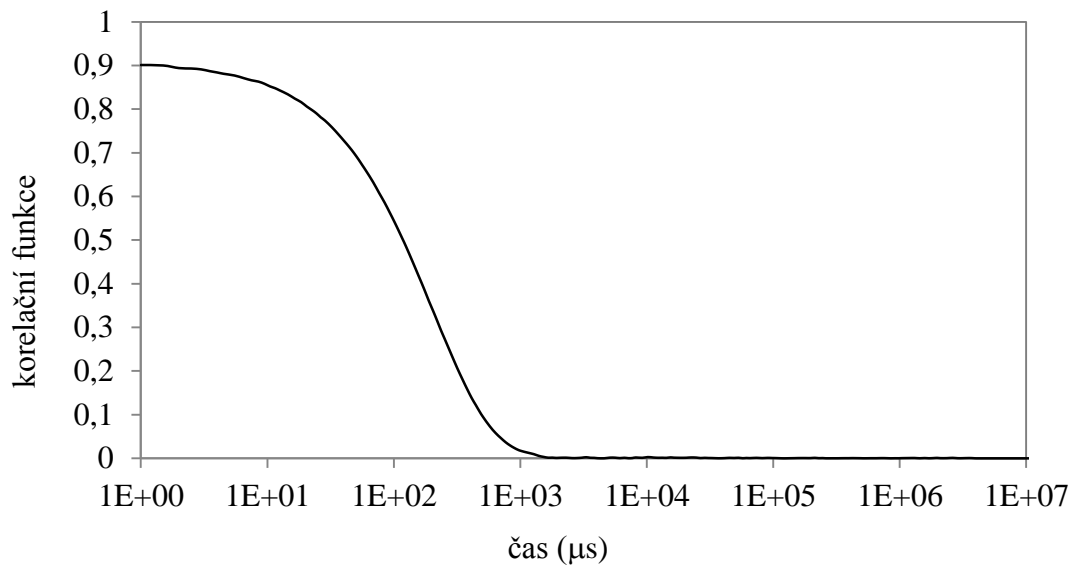
9.1 Příloha 1 – titrace hyaluronanu (116 kDa, $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) do CTAB (1 mM)



Obr. 28: Korelační funkce při nulovém přídavku hyaluronanu.



Obr. 29: Korelační funkce při isoelektrickém bodě.



Obr. 30: Korelační funkce na konci titrace.