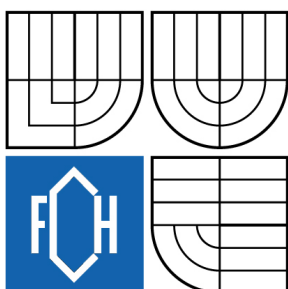




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE A AGREGACE V SYSTÉMECH HYALURONAN-AMINOKYSELINY-TENZID

INTERACTIONS AND AGGREGATION IN HYALURONAN-AMINOACID-SURFACTANT SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

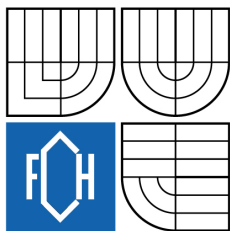
Bc. TEREZA HALASOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0305/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Tereza Halasová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce:	doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid

Zadání diplomové práce:

Základní rešerše na téma využití fluorescenčních sond v dané problematice.

Návrh experimentů včetně výběru sond a tenzidů s uvažováním aplikace v oblasti přípravy nosičových systémů pro nepolární biologicky aktivní látky.

Realizace a vyhodnocení experimentů.

Posouzení vhodnosti studovaných systémů pro využití jako nosičových systémů.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Tereza Halasová
Student(ka)

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pomocí fluorescenční spektroskopie byl zkoumán vliv přídavku nativního hyaluronanu na CMC vybraných tenzidů (Tween 20, BETADET THC 2, SDS, CTAT a CTAB) ve fyziologickém roztoku (0,15 M NaCl). Jako fluorescenční sondy byly použity nilská červeň a pyren. Největší vliv na CMC byl zaznamenán u kationaktivních tenzidů. Blíže byl zkoumán systém cetyltrimethylamonium bromid-hyaluronan. Byly provedeny solubilizační experimenty s použitím hydrofobního barviva súdánové červeně G a pomocí zhášení fluorescence bylo měřeno agregační číslo systému. Jako zhášeč byl použit cetylpyridinium chlorid (CPC) a jako zhášená molekula pyren. Bylo zjištěno, že přídavek hyaluronanu (nativního i hydrofobizovaného) snižuje agregační číslo systému.

ABSTRACT

The effect of native hyaluronan addition on CMC of excluded surfactants (Tween 20, BETADET THC 2, SDS, CTAT a CTAB) in physiological solution (0,15 M NaCl) has been investigated by fluorescence spectroscopy with Pyrene and Nile red as probes. The greatest influence on CMC has been observed in systems with cationic surfactant. System of cetyltrimethylamonium bromid has been closely studied. Solubilization experiments with a hydrophobic dye Sudan red has been realized and aggregation number of this system has been determined via fluorescence quenching with cetylpyridinium chloride as quencher and Pyrene as fluorescence probe. Addition of hyaluronan (native or hydrophobically modified) reduces aggregation number of system.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, interakce, tenzidy, fluorescenční spektroskopie, pyren, nilská červeň

KEYWORDS

hyaluronan, interaction, surfactants, fluorescence spectroscopy, pyrene, nile red

HALASOVÁ, T. *Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 60 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

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 využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Miloslavu Pekařovi, Csc. za odborný dohled a zaštitění mojí práce. Dále srdečně děkuji Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za obětavou spolupráci a kreativní rady v celém průběhu práce. V neposlední řadě chci také poděkovat za podporu mým nejbližším, bez které by tato práce nevznikla.

Tato práce je součástí řešení projektu MŠMT č. OC08004

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Hyaluronan.....	8
2.1.1	Hyaluronan a uspořádaná struktura v roztoku	9
2.1.2	Sít'ování hyaluronanu	10
2.2	Biosyntéza hyaluronanu.....	11
2.2.1	Bakteriální syntéza	12
2.2.2	Syntéza hyaluronanu v lidských buňkách	12
2.2.3	Metabolismus hyaluronanu	12
2.3	Vlastnosti vody jako hlavního biologického prostředí	12
2.3.1	Hydratace	13
2.3.2	Uspořádání amfifilních látek ve vodě	13
2.3.3	Micely	14
2.3.4	Vznik micel	14
2.3.5	Solubilizace	15
2.4	Fluorescence	15
2.4.1	Fluorescenční sondy	17
2.4.2	Zhášení	17
2.4.3	Excimer jako forma zhášení	18
2.4.4	Stanovení agregačního čísla pomocí zhášení	18
2.4.5	Instrumentace	18
2.4.6	Nelinearita a vnitřní filtrační efekt	19
2.5	Současný stav řešené problematiky	20
3	MATERIÁLY A METODY	23
3.1	Materiály	23
3.2	Metody	25
3.2.1	Příprava vzorků	25
3.2.2	Měření a vyhodnocení dat	26
3.3	Korekce	28
3.4	Statistika	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	Tween 20.....	31
4.2	BETADET THC 2	34
4.3	SDS	36
4.4	CTAT	39
4.5	CTAB.....	41
4.5.1	CTAB s přidavkem hydrofobně modifikovaného derivátu.....	44
4.5.2	Excimer v systémech CTAB-HyA	45
4.5.3	Solubilizační experimenty se súdánovou červení	46
4.5.4	Agregační číslo.....	48
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	56

7.1	Seznam zkratk	56
7.2	Seznam symbolů	56
8	SEZNAM PŘÍLOH	57
9	PŘÍLOHY	58
9.1	Příloha 1	58
9.2	Příloha 2	59
9.3	Příloha 3	60
9.4	Příloha 4	60

1 ÚVOD

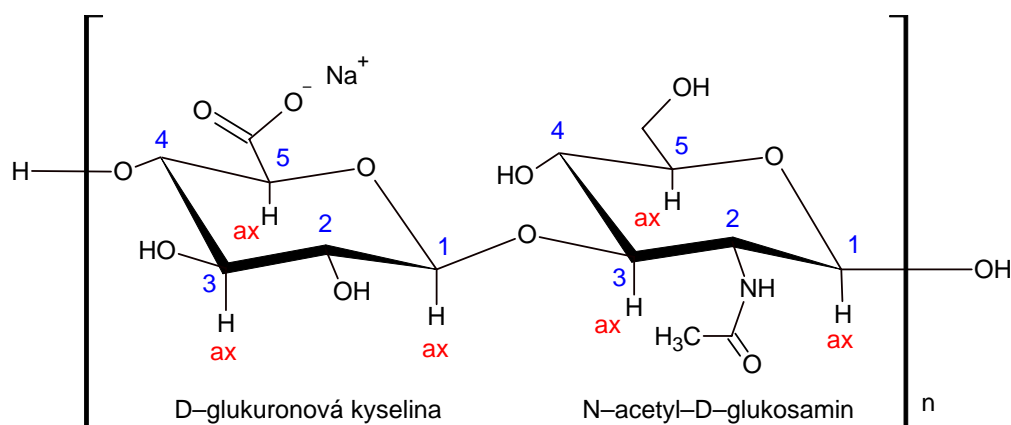
Představme si neznámou substanci. Tato látka vypadá na první pohled velice obyčejně. Nemá žádnou zvláštní barvu, je prostě jen bílá. Nevoní ani nezapáchá. Mohla by se dokonce zdát nezajímavá. Jestli si něco podobného myslel i její objevitel, když ji poprvé v roce 1934 izoloval, to už se nedozvíme. V každém případě však objevil sloučeninu, která se stala fenoménem dnešní doby a to nejen díky svým unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem, ale také proto, že hraje důležitou roli v těle každého z nás. Podílí se mimo jiné i na samotném vzniku nového života, kdy je přítomna v raných stadiích vývoje embrya. Tehdy v roce 1934 byla objevena na první pohled nezajímavá bílá substance, jež je už dlouhá léta zkoumána a s neutuchajícím zájmem bude zkoumána dál, protože se toho o ní musíme ještě mnoho dozvědět. Kyselina hyaluronová.

Následující práce je zaměřena na výzkum interakcí a agregačního chování v roztocích obsahujících anionaktivní polyelektrolyt hyaluronan a vybrané tenzidy. Jako jednoduchý model fyziologického roztoku je použit 0,15 M roztok NaCl. V první části je pomocí fluorescenční spektroskopie s využitím dvou různých fluorescenčních sond (pyren, nilská červeň) sledován vliv přídavku nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu na kritickou micelární koncentraci tenzidu. Jako tenzidy byly použity Tween 20 (neionogenní), SDS (anionaktivní), CTAT, CTAB (kationaktivní) a BETADET THC 2 (amfoterní) jako zástupce ze skupiny alkylovaných betainů spojujících strukturu tenzidu a aminokyseliny v jedné molekule. V druhé části je blíže zkoumán systém obsahující kationaktivní tenzid CTAB, nativní hyaluronan o dvou molekulových hmotnostech a hydrofobně modifikovaný derivát hyaluronanu. U těchto systémů je za pomoci zhášení fluorescence stanovováno agregační číslo a s použitím hydrofobního barviva jsou sledovány solubilizační vlastnosti systémů. Hlavním cílem práce je získat poznatky o výše uvedených systémech s ohledem na jejich možné využití jako cílených nosičů léčiv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan

Tento polysacharid se v živém organismu nevyskytuje ve formě kyseliny, ale převážně v disociované formě sodné a draselné soli. Ve vodném roztoku je polyaniontem. Název hyaluronan zahrnuje kyselou formu i sůl. Molekula této biologicky multifunkční látky je přísně lineární polymer složený z opakujících se disacharidových jednotek obsahujících D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin, které jsou střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou. Tyto vazby jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky. Primární struktura molekuly má charakteristické důsledky pro její sekundární strukturu v roztoku. Glukóza v β konfiguraci, se kterou jsou spojeny oba cukry, dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují méně stericky výhodné axiální polohy. Jedním z důsledků tohoto uspořádání je výskyt hydrofobních oblastí v řetězci tzv. „hydrophobic patch“, které jsou tvořeny již zmíněnými axiálními vodíky viz (Obr. 1) [1].



Obr. 1: Základní struktura molekuly hyaluronanu obsahujícího β 1 \rightarrow 3-glykosidickou vazbu a β 1 \rightarrow 4-glykosidickou vazbu.

Pravděpodobně mnoho z biologických rolí hyaluronanu závisí na jeho amfifilní struktuře a tím potažmo na schopnosti interagovat s membránami, protože díky „hydrophobic patch“ je schopen vázat se na fosfolipidy, které jsou hlavní komponentou membrán. Bylo prokázáno, že hyaluronan zvyšuje flexibilitu membrány červených krvinek a že se aktivně účastní biologických procesů jako buněčná adheze, migrace a proliferace [4].

Nejvýznamnějším místem výskytu hyaluronanu jsou tkáně obratlovců. Je hlavní součástí extracelulární matric, ve kterých se diferencuje většina tkání, ale je také nepostradatelnou součástí tkání dospělých, kde se stává strukturálním organizátorem extracelulární matric díky tomu, že je schopen vázat se na jeho ostatní komponenty, jako je například hyalektinová třída proteoglykanů [5]. V určitých případech zastává hyaluronan roli hlavní komponenty např.: ve sklivci lidského oka, synoviální tekutině nebo oocytech, kde ovlivňuje ovulaci. Dále je důležitou součástí chrupavek. Jeho vodné roztoky jsou velmi viskózní. Současné mechanické studie synoviální tekutiny dokazují, že vysokomolekulární hyaluronan hraje důležitou roli v kloubech, kde snižuje tření a tlumí nárazy [6].

Průmyslově se hyaluronan dříve vyráběl z kohoutích hřebínků a někteří výrobci tohoto způsobu stále využívají, ale poté co bylo zjištěno, že některé kmeny Streptokoků obsahují

polysacharid, který má shodnou strukturu se savčím hyaluronanem, zaměřila se průmyslová výroba spíše na jejich využití. Jedním z výhod této technologie je příprava velmi čistého polymeru.

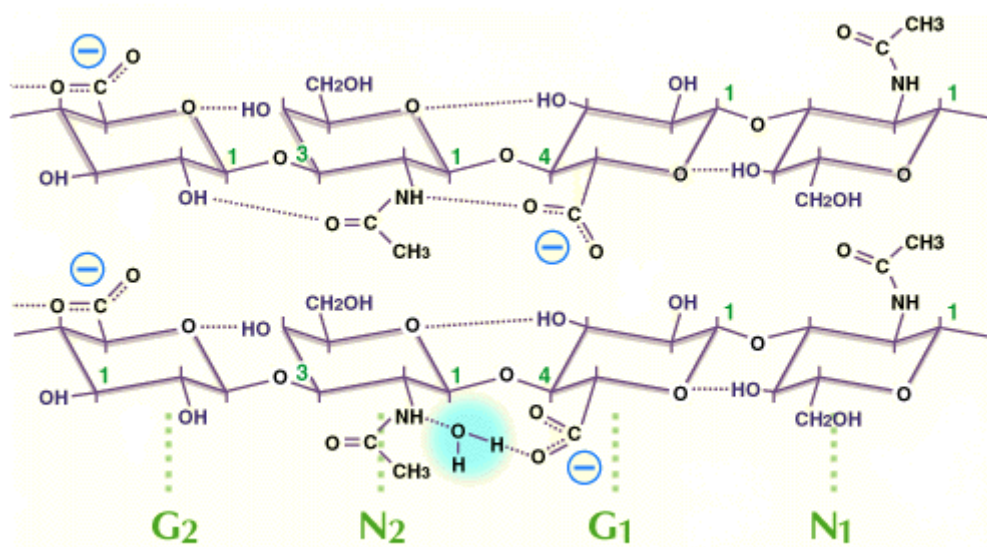
2.1.1 Hyaluronan a uspořádaná struktura v roztoku

S ohledem na primární a sekundární strukturu hyaluronanu vyslovil *Scott* předpoklad, že řetězce hyaluronanu zaujímají v roztoku strukturu, kterou popisuje jako náhodně svinutou stuhu „random coil“ [4]. Náhodnost systému hyaluronan ve vodě je však v rozporu s podstatou evoluce živých organismů. Čím více je totiž systém náhodný, tím méně informací takový systém nese a tento fakt se prakticky vylučuje se strategií pokroku živých organismů, která spočívá ve schopnosti redukovat entropii a předat tak co nejvíce informací, což vede k reprodukovatelnosti a schopnosti vývoje. Proto vznikla snaha pohlížet na biomolekulu hyaluronanu, zastávající v organismu mnoho klíčových funkcí, jako na systém zaujímající preferované tvary.

Řetězec hyaluronanu obsahuje dva druhy vazeb. Jedním druhem jsou vazby v cukerných kruzích, které jsou poměrně neměnné a do jisté míry fixují tvar jednotlivých cukerných zbytků. Mezi těmito rigidními jednotkami je pak další druh vazeb tzv. glykosidické vazby, které se skládají z kyslíkového atomu spojujícího jeden cukr s druhým. Tyto glykosidické vazby jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky označenými na Obr. 2 tečkovanou čarou. Jak je také z obrázku vidět, voda hraje důležitou roli ve stabilizaci struktury. Z kyslíkového atomu zapojeného do glykosidického můstku vycházejí dvě vazby mající tvar písmene „V“. Substituenty připojené na jejich koncích mohou rotovat o 360° . Ačkoli výpočty a molekulární modelování ukázaly, že ze sterických důvodů nemají cukerné kruhy naprostou svobodu v tom jakou konfiguraci kolem kyslíkového atomu zaujmou, přesto je zde několik možných uspořádání pro každý druh glykosidického můstku. Násobek těchto možností počtem můstků v dlouhém řetězci hyaluronanu vyjadřuje enormní počet možných tvarů jedné molekuly. Proto se uspořádání řetězce může zdát náhodným, ale není.

Nukleární magnetická resonance potvrdila přítomnost uspořádané struktury řetězce hyaluronanu v roztoku, ve které je každá disacharidová jednotka pootočena o 180° vůči té před ní a za ní v řetězci. Dvě otáčky (celkově 360°) přináší zpět původní orientaci. Z tohoto důvodu je tato struktura popisována jako dvakrát stočená šroubovice „two-fold helix“ (ne dvojitá šroubovice, „double helix“ ve které jsou zapleteny dva řetězce jak tomu je např. u DNA). Zajímavé je, že chondroitin, keratan nebo dermatan také preferují ve vodném roztoku podobnou dvojitě stočenou šroubovici „two-fold helix“. Význam této sekundární struktury, jako důsledek jednoduché sekvence cukrů, se stává zřejmější, pokud vezmeme v úvahu, že hyaluronan ve „two-fold helix“ má v řetězci po zhruba stejně dlouhých úsecích hydrofobní oblasti tzv. „hydrophobic patch“, jako důsledek axiální orientace vodíků v sekundární struktuře [4]. Přítomností hydrofilních i hydrofobních oblastí se tak molekula řadí do rodiny amfifilních látek. Nepolární oblasti v molekule jsou tvořeny axiálními vodíkovými atomy, zatímco ekvatoriální strana řetězce tvoří více polární hydrofilní oblast. Následkem toho molekula hyaluronanu zaujímá ve fyziologickém roztoku strukturu, jež je poměrně náročná na prostor a zabírá rozlehlou doménu. V závislosti na koncentraci polymeru se domény jednotlivých molekul mohou navzájem překrývat. Doménová struktura hyaluronanu má velmi zajímavé a neméně důležité důsledky. Malé molekuly jako je voda, elektrolyty nebo živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem uvnitř domény. Avšak velké molekuly jako jsou proteiny budou z domény částečně vypuzovány z důvodu jejich hydrodynamické velikosti v

roztoku. Čím budou molekuly větší, tím méně prostoru pro ně v doméně hyaluronanu bude. To vede k pomalejší difúzi velkých makromolekul skrz a k jejich vyšší zádrži oproti okolnímu prostředí, kde se hyaluronan nevyskytuje. Zajímavé je, že efektivní velikost pórů v síti se kontinuálně mění. Statisticky tedy mohou existovat póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností. To v principu znamená, že molekuly všech velikostí mohou projít skrz síť hyaluronanu, ale s různým stupněm retardace závislejícím na jejich hydrodynamickém poloměru [7].

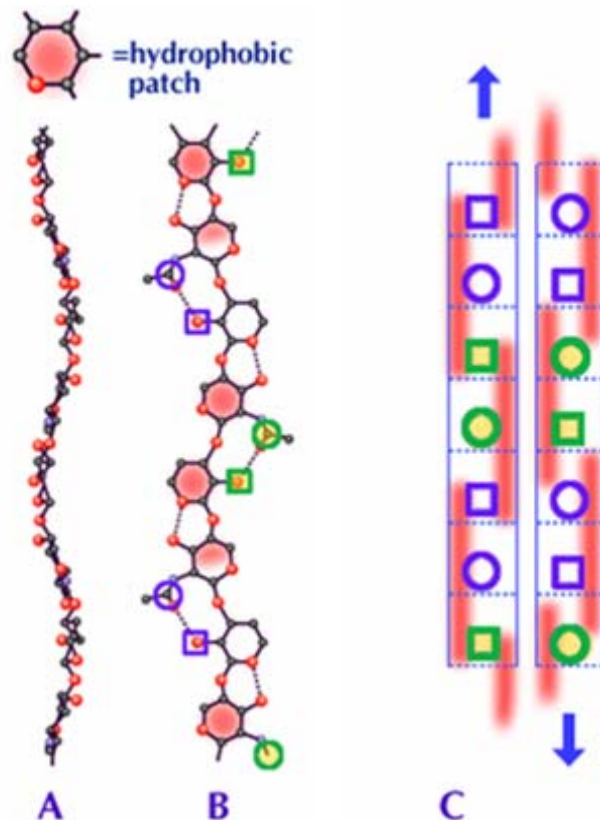


Obr. 2: Tetrasacharid obsažený v řetězci hyaluronanu skládající se ze dvou opakujících se disacharidových jednotek vykazujících v roztoku preferovanou konfiguraci. G = zbytek kyseliny glukuronové, N = N-acetylglukosamin. Tečkovaná čára znázorňuje vodíkové vazby, které jsou potencionálně přítomné v každém tetrasacharidu hyaluronanu. V nevodném rozpouštědle (dimethyl sulfoxid), vodný můstek mezi acetamidem (N₂) a karboxylem (G₁) je nahrazen přímou vodíkovou vazbou.

2.1.2 Síťování hyaluronanu

Řetězce hyaluronanu často agregují navzájem, částečně tomu napomáhá interakce mezi hydrofobními oblastmi. Plochá sekundární struktura podobná stuze má fascinující vlastnosti, obě strany jsou identické, ale jedna strana stuhy běží v opačném směru k druhé, jsou antiparalelní. To v principu znamená, že co je možné na jedné straně pásky, je možné také na druhé. Agregáty mohou „růst“ z obou stran. Elektrostatická repulze mezi zápornými náboji, která by podporovala disociaci agregátů, je překonána nejen hydrofobními interakcemi, ale také vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karbonylovou skupinou. Avšak interakce, které drží síť pohromadě jsou poměrně slabé, takže agregáty se tvoří a disociují v závislosti na fyzikálně-chemických podmínkách a teplotě.

Elektronová mikroskopie ukázala že byly formovány sítě s šestihrannou strukturou už při velmi nízké koncentraci hyaluronanu (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Síť tvořené vysokomolekulárním hyaluronanem jsou v podstatě nekonečné. Každá molekula hyaluronanu je v nich spojena se všemi ostatními. Přestože nízkomolekulární hyaluronan také tvoří síť při nízkých koncentracích, tyto jsou ostrůvkovité, separované jedna od druhé [4].



Obr. 3: Zobrazení interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu.

Obr. 3 znázorňuje interakci mezi dvěma řetězci hyaluronanu. A a B jsou zobrazení molekuly hyaluronanu, červené oblasti značí hydrofobní místa na střídajících se stranách polymerního řetězce, kruhy reprezentují acetamidovou skupinu a čtverce karboxylovou skupinu. C znázorňuje schéma možného duplexu mezi dvěma molekulami hyaluronanu v bočním náhledu. Stejně struktury jsou možné pro chondroitin, keratan a dermatan, nebo pro směs dvou z nich včetně hyaluronanu. Dvě participující molekuly jsou navzájem antiparalelní. Tečkované čáry ohraničují každou cukernou jednotku. Červené pásy značí hydrofobní místa. Zakřivení v každé molekule viditelné na A a B přesně kopíruje zakřivení druhé molekuly v antiparalelním uspořádání, takže dvě molekuly zapadnou přesně do sebe. Hydrofobní místa potom přiléhají těsně k sobě a acetamidové a karboxylové skupiny jsou ve vzdálenostech vodíkových můstků.”

2.2 Biosyntéza hyaluronanu

Za syntézu hyaluronanu jsou odpovědné specifické transmembránové enzymy s názvem hyaluronansyntázy. Jsou to jediné enzymy s více funkcemi. Syntéza průměrného řetězce hyaluronanu, který obsahuje deset tisíc disacharidových jednotek, představuje pro buňku značný výdej energie. Proto není překvapující, že syntéza hyaluronanu je ve většině buněk pevně regulována.

2.2.1 Bakteriální syntéza

Přestože se to může zdát zvláštní, některé bakterie jsou schopny produkovat hyaluronan stejně jako savci. Tyto mikroorganismy vytvořili jasnou a jednoduchou strategii jak napadat hostitelský organismus. Bakterie jako jsou *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Pasteurella multocida*, což jsou lidské i zvířecí patogeny, jsou schopny skrýt se před imunitním systémem jejich hostitelů, tak že se obklopí tenkou vrstvou hyaluronanu. Tato výhodná dovednost jim umožňuje snadněji napadat hostitelské savčí organismy, protože jimi syntetizovaný hyaluronan, tvořící na jejich povrchu ochrannou bariéru, má stejnou strukturu jako hyaluronan v savčích tkáních. Bakterie proto nejsou snadno rozpoznatelné imunitním systémem a hostitelský organismus se tedy není schopen účinně bránit [8].

2.2.2 Syntéza hyaluronanu v lidských buňkách

Většina glykosaminoglykanů, mezi které hyaluronan patří, je v živém organismu syntetizována v Golgiho aparátu uvnitř buňky a poté jsou připojeny k jaderným proteinům. Na rozdíl od nich, hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně a není spojen s žádným jaderným proteinem. Za jeho syntézu v lidském organismu je odpovědná trojice hyaluronan syntáz, které jsou označovány jako HAS1, HAS2 a HAS3. Samotná syntéza biopolymeru probíhá na vnitřní straně buněčné membrány, kde příslušná hyaluronan syntáza střídavě váže na řetězec monosacharidové jednotky a narůstající polymer je tak vytlačován skrz membránu ven z buňky. Mimo ni je hyaluronan schopen tvořit komplexy s proteiny schopnými tento polysacharid vázat a stává se tak součástí pericelulárního obalu. Společně s ostatními glykosamininy se také podílí na vzniku nadmolekulárních struktur zvaných proteoglykany a stává se tak organizátorem extracelulární matrix.

2.2.3 Metabolismus hyaluronanu

U většiny druhů včetně člověka je systémová kinetika hyaluronanu velmi dobře ustanovena. Jeho metabolismus je velmi dynamický. Některé buňky jako jsou chondrocyty v chrupavkách aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan během celé doby života tkáně. Koncentrace hyaluronanu se v jednotlivých tkáních široce liší [9]. Syntéza je obvykle vyvažována katabolismem, aby byla udržena konstantní koncentrace v tkáni. Metabolické studie ukázaly, že doba života molekuly hyaluronanu v chrupavce je normálně dva až tři týdny. Dalším příkladem buněk aktivně syntetizujících a katabolizujících hyaluronan jsou keratinocyty v epidermis. V tomto případě je doba života molekuly hyaluronanu překvapivě krátká, méně než jeden den. Odbourávání hyaluronanu je velmi účinné. Doba života v krevním oběhu se pohybuje v rozmezí 2-6 min a celkový úbytek u dospělého člověka činí 10-100 mg za den. Nejvíce hyaluronanu je odbouráváno v endoteliálních buňkách jater pomocí endocytózy.

2.3 Vlastnosti vody jako hlavního biologického prostředí

Jak víme, život se vyvinul ve vodě a je na ní stále absolutně závislý. Vlastnosti vody mají proto zásadní důležitost pro vše živé a z toho důvodu o nich bude krátce pojednáno v následujících kapitolách

Specifické vlastnosti vody se stávají zřejmými v případě, kdy jsou srovnány s jinou jí podobnou molekulou např.: metan. Obě molekuly mají podobnou molekulovou váhu i velikost. Přesto je bod varu vody o více než 250 °C vyšší než u metanu. Při teplotách které

panují na povrchu země je voda kapalná, zatímco metan je plyný. Vysoký bod varu vody je výsledkem její vysoké entalpie vypařování, která je důsledkem nerovnoměrné distribuce elektronů uvnitř molekuly. Dva vrcholy tetraedricky tvarované molekuly vody jsou zaplněny nesdílenými elektrony, ostatní dva pak vodíkovými atomy. Výsledkem je, že vazba H–O–H má lomený tvar. Navíc vazby O–H jsou díky vysoké elektronegativitě kyslíku polarizovány. Jedna strana molekuly tedy nese parciální záporný náboj, zatímco druhá je kladně nabitá. Prostorová separace kladného a záporného náboje dává molekule vlastnosti elektrického dipólu. Molekuly vody jsou proto přitahovány jedna ke druhé podobně jako malé magnety a jsou také spojeny vodíkovými vazbami. Při vypařování vody je k přerušení těchto interakcí potřeba dodat velké množství energie. V kontrastu s tím molekula metanu není dipolární, a proto interaguje navzájem pouze slabě. Toto je důvod proč se metan vypařuje při velmi nízké teplotě.

Dipolární povaha molekul vody upřednostňuje formaci vodíkových můstků. Každá molekula se může chovat buď jako donor nebo jako akceptor vodíkové vazby a mnoho molekul v tekuté vodě je proto spojeno vodíkovými můstky. Často vzniká tetraedrání síť molekul známá jako vodní klastry. Jak klesá teplota, proporce klastrů vody rostou, dokud voda nezačne krystalizovat.

2.3.1 Hydratace

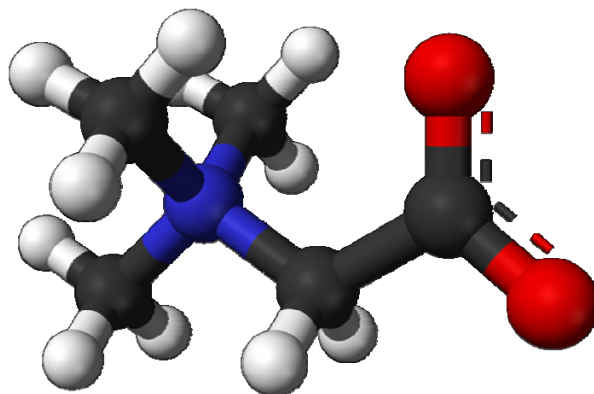
Na rozdíl od většiny ostatních kapalin je voda excelentní rozpouštědlo pro ionty. Podle náboje iontu se dipolární molekuly vody uspořádávají kolem něj v pravidelném tvaru. Tvoří tak hydratační slupku a zaštiťují centrální iont před opačně nabitými ionty. Kovové ionty se proto často vyskytují ve formě hexahdrátů. Elektricky nabitě skupiny v organických molekulách (např. karboxyláty, fosfáty a amoniové skupiny) jsou také velmi dobře hydratované a přispívají k rozpustnosti celé sloučeniny ve vodě. Neutrální molekuly s několika OH skupinami, jako je glycerol nebo cukry, jsou také snadno rozpustné, protože mohou tvořit vodíkové můstky s molekulami vody. Čím větší jsou rozměry polárních funkčních skupin v molekule, tím více jsou sloučeniny rozpustné ve vodě (hydrofilní). V kontrastu s tím, molekuly které se skládají výhradně nebo z velké většiny z uhlíků jsou ve vodě rozpustné špatně nebo vůbec. Tyto sloučeniny jsou nazývány hydrofobními.

2.3.2 Uspořádání amfifilních látek ve vodě

Látky tvořící asociativní koloidy mají tzv. amfifilní strukturu. Obecně to znamená, že molekula obsahuje skupiny, které svou afinitou k rozpouštědлу zaručují značnou rozpustnost a současně jiná část molekuly je sama o sobě v daném rozpouštědle nerozpustná.

Látky s výše popsanou strukturou jsou díky schopnosti snižovat povrchové napětí kapaliny označovány jako povrchově aktivní látky (PAL) nebo také tenzidy. Podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku se tyto látky dělí na ionogenní (anionaktivní, kationaktivní amfoterní) a neionogenní. Neionogenní tenzidy nedisociují, nemají výrazně lokalizovaný náboj, hydrofilní skupiny a polární část je zde tvořena například větším počtem kyslíkových atomů v molekule. Ionogenní tenzidy ve vodě disociují, tím vzniká povrchově aktivní iont. U amfoterních PAL závisí náboj aktivního iontu na pH roztoku. U kationaktivních tenzidů vzniká disociací povrchově aktivní kation. Anionaktivní tenzidy disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Patří sem hlavně alkalické soli vyšších mastných kyselin.

Zvláštním typem povrchově aktivních molekul mohou být také derivatizované betainy, které v sobě spojují strukturu amfifilní látky a aminokyseliny. Betain obecně je chemická sloučenina obsahující kladně nabitou funkční skupinu jako je amonium nebo fosfonium a zároveň obsahuje negativně nabitou funkční skupinu jako je například karboxylový zbytek, který nemůže přiléhat ke kladně nabitě skupině v molekule. V biologických systémech slouží mnoho betainů jako osmolyty, látky zabraňující osmotickému stresu. Nejznámějším zástupcem patřícím svojí strukturou mezi betainy i aminokyseliny je trimethylglycin často nazývaný také glycin betain. Jeho alkylované deriváty jsou používány jako kvarterní amoniové amfoterní tenzidy.



Obr. 4: Struktura trimethylglycinu

2.3.3 Micely

V roztocích tenzidů vznikají samovolně agregáty koloidní velikosti zvané micely, jejichž tvorbu ovlivňuje celá řada faktorů. Bezpochyby nejvýznamnějším z nich je struktura amfifilní látky, zanedbatelný však není ani vliv teploty a složení systému. Díky přechodu tenzidu do agregovaného stavu dochází ke vzrůstu entropie, přičemž hnací silou agregace jsou hydrofobní interakce.

Se začátkem agregace je také spojen pojem **kritická micelární koncentrace (CMC)**, což je jeden z nejdůležitějších hodnotících parametrů pro roztoky PAL. Je to koncentrace při jejímž překročení dochází ke vzniku micel. Hodnota CMC je ovlivňována zejména strukturou tenzidu, vlastnostmi rozpouštědla a také teplotou. U neionogenních tenzidů je zpravidla menší než v případě ionogenních tenzidů. Fakt, že v roztoku došlo k významným změnám, potvrzuje i skutečnost, že při CMC dochází ke značnému zlomu na křivkách koncentračních závislosti některých fyzikálně-chemických vlastností. Například povrchové napětí do CMC strmě klesá a při jejím překročení se již téměř nemění. Molární vodivost nejprve mírně klesá a po dosažení CMC nastává prudký pokles. Také koncentrační závislosti hustoty a viskozity vykazují zlomy, i když u těchto vlastností už nejsou tak výrazné.

2.3.4 Vznik micel

Při postupném rozpouštění tenzidu se hydrofobní části amfifilních molekul snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím, proto se nejdříve samovolně hromadí na povrchu kapaliny a tím snižují její povrchové napětí. Orientace molekul na povrchu kapaliny je hydrofobními částmi z roztoku a hydrofilními do roztoku. Když je celá plocha povrchu nasycena takto uspořádanými molekulami, nemohou už se další molekuly v povrchové vrstvě

hromadit. V tomto okamžiku bylo dosaženo CMC. Při jejím překročení dochází ke vzniku agregátů již zmíněných micel. Nepochární části amfifilních molekul nacházející se uvnitř objemu roztoku, se stále snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím, a proto se orientují navzájem k sobě. Na povrchu takto vzniklých micel se potom nachází hydrofilní části molekul. V úvahu musíme brát i fakt, že tento typ micel vzniká běžně z ionogenních tenzidů, proto je povrch micely ještě obklopen protionty, které tvoří vnější difúzní dvojvrstvu.

S tvorbou micel souvisí i pojem **agregační číslo**, což je počet molekul tenzidu tvořících jednu micelu. Agregační číslo roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Ta závisí nejen na velikosti polární skupiny, ale také na odpudivých silách, kterými na sebe sousední povrchové skupiny působí.

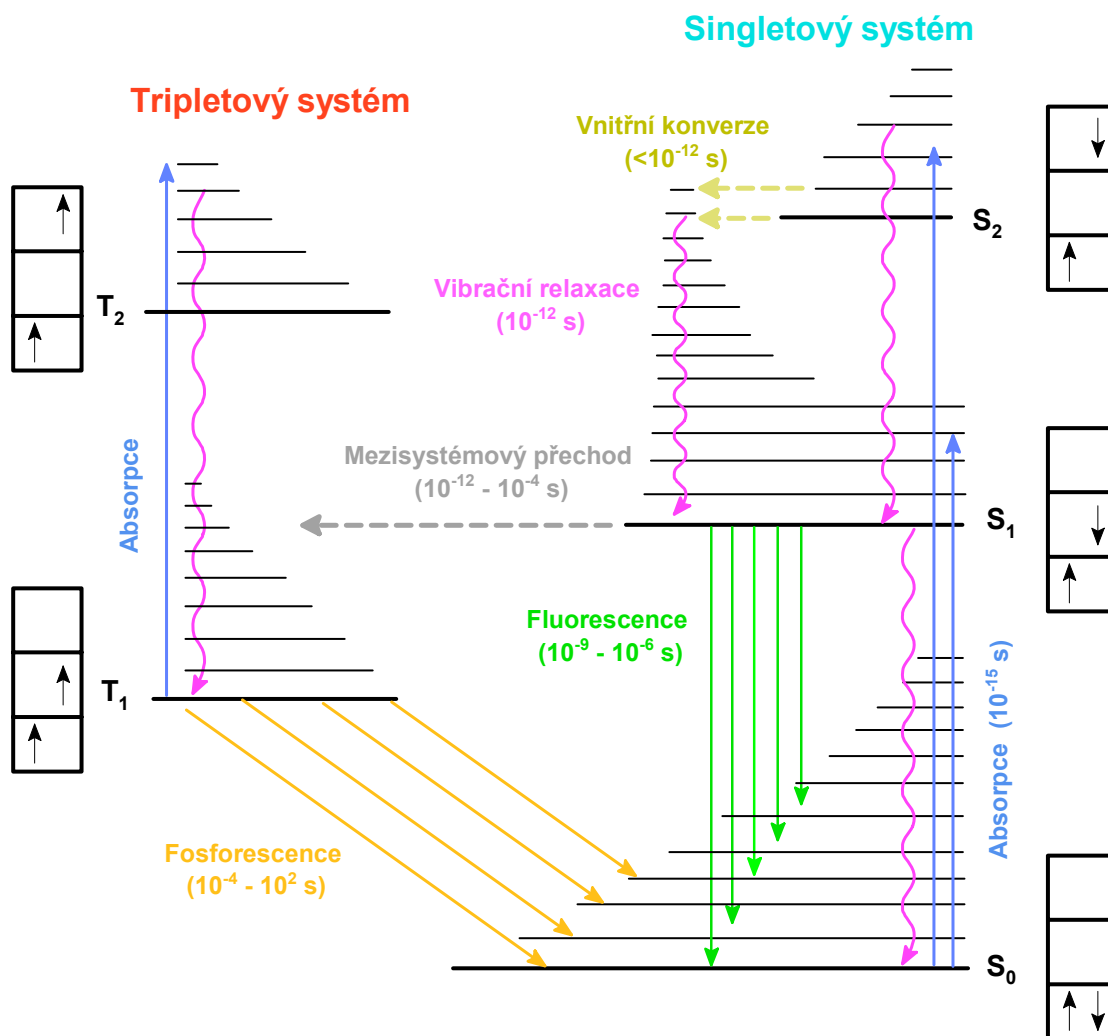
2.3.5 Solubilizace

Významnou vlastností micelárních roztoků, která souvisí se strukturou micel, je solubilizace, což je schopnost rozpouštět i látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Mechanismus solubilizace může být různý. Amfifilní organické látky (alkoholy, aminy) se rozmísťují v micelách analogicky k molekulám tvořícím samotnou micelu a to tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micely nebo v její těsné blízkosti. Nejčastějším mechanismem solubilizace je ale rozpouštění nepolárních látek v jádru micely. Přitom roste velikost micel a to hlavně proto, že solubilizací se zvětší objem hydrofobního jádra.

Solubilizace má velký praktický význam, protože na tomto principu fungují prací a jiné čisticí prostředky. Pokud se však zaměříme na význam pro výzkum PAL a tudíž i hyaluronanu, pak díky solubilizaci máme možnost do jádra micely inkorporovat různé hydrofobní látky a to včetně fluorescenčních sond. Tímto způsobem získáme systém, který můžeme zkoumat metodami fluorescenční spektroskopie.

2.4 Fluorescence

Absorpce světla organickou molekulou v základním stavu (S_0) způsobí excitaci elektronu, který přejde z původně nízko ležícího orbitalu do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Takto může dojít k vytvoření jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů. První je tzv. singletový stav (S_1), kde jsou spiny obou elektronů antiparalelní. Vytvoření tohoto excitovaného stavu je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější. Druhou možností je tripletový stav (T_1), v němž jsou spiny elektronů paralelní. Fotofyzikální chování organických molekul je nejčastěji ilustrováno pomocí Jablonského diagramu, který zobrazuje relativní energie molekuly v základním stavu a stavech excitovaných. Nezářivé procesy jsou v diagramu označeny nejčastěji vlnovkami a uskutečňují se mezi vibračně-rotacími hladinami různých elektronových stavů. Jelikož se při nich nemění celková energie systému, nedochází k emisi záření. Zářivé procesy jsou charakterizovány vyzářením světelného kvanta (fotonu) a jsou označeny jako přímé šipky (Obr. 5).



Obr. 5: Jablonskiho diagram

Excitovaná molekula se může zbavit přebytečné energie různými deaktivacími procesy. Jsou to buď fotochemické reakce, nebo nezářivé procesy, při kterých se zvýší tepelná energie systému. Pro spektroskopii jsou nejdůležitějšími procesy zářivé, které se vyznačují emisí světla, tj. vyzářením světelného kvanta. Obecně se tyto děje nazývají luminiscence a patří mezi ně fluorescence a fosforescence. Jsou to primární fotochemické procesy, které jsou za běžných podmínek spontánními ději. Fosforescence je emise světla z tripletových excitovaných stavů, ve kterých má elektron v excitovaném orbitalu stejně orientovaný spin jako elektron v orbitalu základního stavu. Přechod do základního stavu je spinově zakázán a emise světla je pomalá. Doba života fosforescence se pohybuje v řádu milisekund až sekund. Fluorescence je následkem spinově dovoleného přechodu obvykle z rovnovážné hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . V excitovaném singletovém stavu je elektron v excitovaném orbitalu spárován opačným spinem k druhému elektronu v orbitalu základního stavu, proto je návrat do základního stavu spinově dovolený a probíhá rychle emisí fotonu. Doba života fluorescence je přibližně 10 ns [10].

Fluorescence se řídí několika hlavními pravidly. Prvním z nich je Stokesův zákon, který říká, že vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). Prakticky to znamená, že světlo, které excituje elektrony, ztratí část své energie, což se projeví na prodloužení vlnové délky emitovaného světla. Dalším

je tzv. Kashovo pravidlo, podle kterého dochází před emisí fluorescenčního kvanta k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, což má za následek, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . Je to z toho důvodu, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem S_1 je velmi malý a nezářivá přeměna z těchto stavů do základního stavu je velmi rychlá. Existují ale výjimky proti tomuto pravidlu v případě, že energetický rozdíl mezi S_2 a S_1 je srovnatelný s energií deaktivace do základního stavu. Třetím principem je Vavilovovo pravidlo, které tvrdí, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. To znamená, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace. Při hlubším zkoumání je však Vavilovovo pravidlo pouze důsledkem Kashova pravidla.

Každá fluoreskující molekula má dvě charakteristická spektra. Excitační spektrum vystihuje relativní účinnost různých vlnových délek excitujícího záření při vyvolání fluorescence. Je to tedy závislost intenzity fluorescence měřené při konstantní vlnové délce na měnící se vlnové délce excitujícího záření. Excitační spektrum by mělo být shodné s absorpčním spektrem, ale ve skutečnosti se liší, obsahuje totiž jen ty pásy absorpčního spektra, kde dochází k zářivé deexcitaci, tj. vzniku fluorescence.

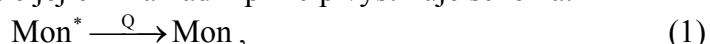
Emisní spektrum ukazuje závislost intenzity fluorescence na její vlnové délce při konstantní vlnové délce excitace. Emisní spektrum bývá zrcadlovým obrazem spektra absorpčního, což je způsobeno tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.

2.4.1 Fluorescenční sondy

Díky tomu, že okolní prostředí (polarita, pH, iontová síla, viskozita, tlak, teplota nebo přítomnost zhášeců) má silný vliv na fluorescenci, jsou fluoreskující molekuly běžně používány jako sondy pro zkoumání fyzikálně-chemických i biochemických a biologických systémů. Fluorescenční sondy mohou nabídnout bohatství informací a jsou použitelné v široké škále odvětví. Obecně se tyto molekuly dělí na tři skupiny. První skupinou jsou vnitřní sondy, jsou však vhodné pouze pro úzký okruh zkoumání. Dále jsou to vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Poslední dvě zmíněné skupiny jsou hojně využívané, ale vzhledem k obtížnosti syntézy některých kovalentně vázaných sond, je většina výzkumů prováděna s nekovalentně asociujícími sondami.

2.4.2 Zhášení

Kromě unimolekulárních zhášecích procesů (emise, nezářivá deaktivace) existují také bimolekulární zhášecí procesy, které zahrnují přenos energie z jedné molekuly na druhou. Tento jev se obecně nazývá zhášením. Je to však široký termín, který zahrnuje procesy odehrávající se různými mechanismy, ale jejichž základní princip vystihuje schéma:



kde Mon^* vyjadřuje excitovaný stav molekuly, Mon základní stav molekuly a Q je zhášec [11]. Hlavními fotofyzikálními procesy zodpovědnými za zhášení fluorescence jsou kolize s atomem těžkého kovu, přenos elektronu, protonu nebo energie a také tvorba excimeru nebo exciplexu.

2.4.3 Excimer jako forma zhášení

V mnoha případech se stává, že zvýšením koncentrace látky se snižuje fluorescence. Je to způsobeno tím, že se tvoří stechiometrický komplex molekul, z nichž jedna je v základním a druhá v excitovaném stavu MonMon*. Tento komplex je nazýván excitovaný dimer zkráceně excimer. V takovémto případě funkci zhášeče Q přebírá samotná molekula fluoreskující látky Mon, a proto se jedná o samozhášení. Excimer je však v emisním spektru charakterizován vlastním emisním pásem, který se objevuje při vyšších vlnových délkách než pás monomeru a nevykazuje vibronovou strukturu. I tak se však jedná o bimolekulární zhášecí proces, protože k nárůstu fluorescence excimeru dochází na úkor fluorescence monomeru.

2.4.4 Stanovení agregačního čísla pomocí zhášení

Jedním z nejzákladnějších a nejdůležitějších parametrů micelárních agregátů je agregační číslo, neboli průměrný počet molekul tenzidu v jedné micelle viz. kapitola 2.3.4. Způsob měření agregačního čísla pomocí spektrofluorimetrie je založen na zhášení fluorescenční sondy pomocí hydrofobního zhášeče. Předpokládejme roztok obsahující koncentraci micel [C] a makroskopickou koncentraci zhášeče [Q]. Pokud Q je voleno tak, že je obsaženo v micelární fázi, potom molekuly zhášeče budou distribuovány mezi přístupné micely. Pokud fluoreskující molekula D, která je také kompletně asociovaná v micelle, je nyní přidána do systému, D se rozdělí mezi micely obsahující zhášeč a mezi prázdné micely. Podle Poissonova statistického rozdělení pak platí:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\frac{[Q]}{[C]}}, \quad (2)$$

kde I_0 a I je intenzita fluorescence příslušející vzorku bez obsahu zhášeče a s obsahem zhášeče. [C] je spojeno s makroskopickou koncentrací tenzidu [S] a hledaným agregačním číslem N_{agg} podle vztahu:

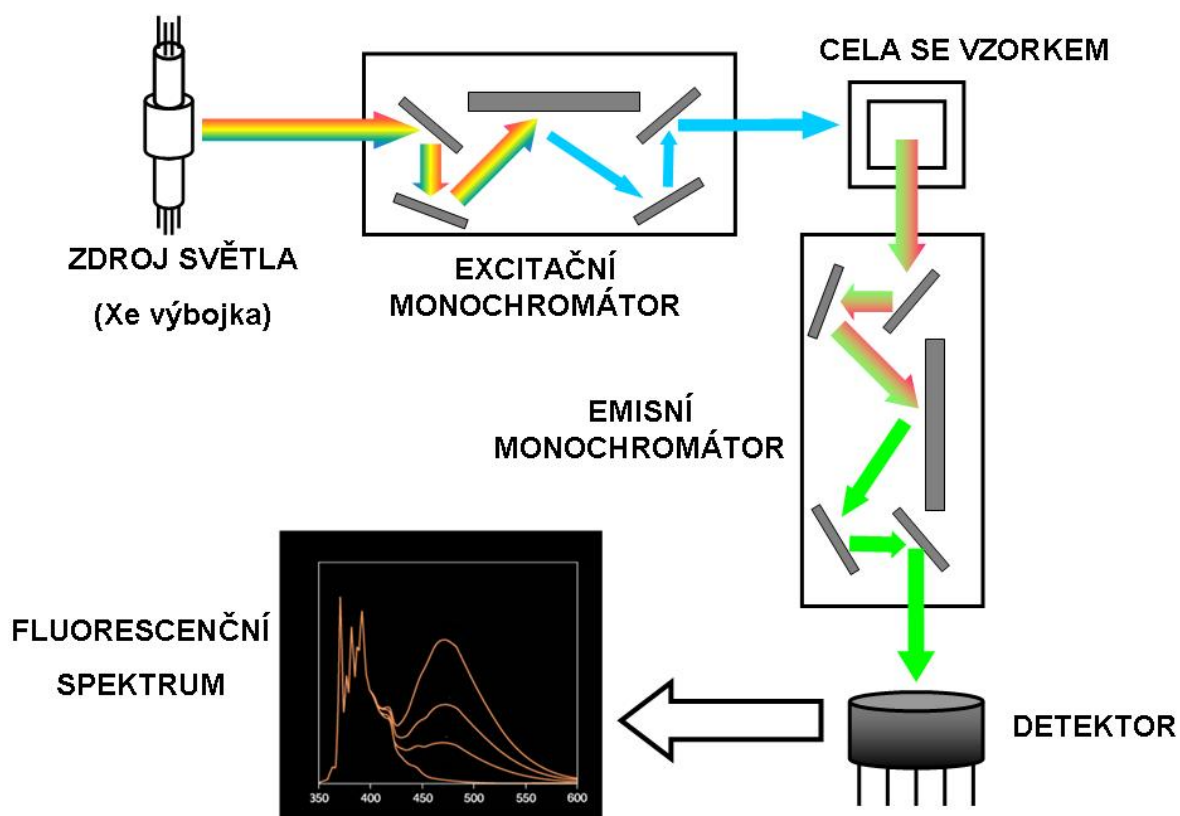
$$[C] = \frac{[S] - [\text{volný monomer}]}{N_{agg}}, \quad (3)$$

kde se koncentrace volného monomeru v rovnováze s micelárními agregáty rovná kritické micelární koncentraci. Kombinací obou vztahů dostaneme výraz:

$$\ln \frac{I}{I_0} = \frac{[Q] \cdot N_{agg}}{[S] - [CMC]} \quad (4)$$

2.4.5 Instrumentace

Obr. 6 znázorňuje schéma hlavních komponent spektrofluorometru. Každé zařízení tohoto typu má několik hlavních součástí. Prvním z nich je zdroj světla, jako který většinou slouží xenonová výbojka. Tyto lampy jsou široce využitelné, protože mají vysokou intenzitu při všech vlnových délkách a rozsah jejich vlnových délek začíná u 250 nm. Světlo vycházející z výbojky pak prochází další součástí přístroje, excitačním monochromátorem, který vymezuje konkrétní vlnovou délku excitačního záření, která poté dopadá na vzorek. Ten bývá obvykle umístěn v držáku kyvety, jež se v přístroji nachází na rohu pravého úhlu, který svírají oba monochromátory. Světlo emitované vzorkem dopadá na emisní monochromátor, který vymezuje vlnovou délku záření, které následně dopadne na detektor. Výstupem měření je pak fluorescenční spektrum a to buď emisní nebo excitační, podle toho, který z obou monochromátorů se účastní analýzy.



Obr. 6: Schéma spektrofluorimetru

V ideálním případě by komponenty spektrofluorimetru měly mít následující charakteristiky: zdroj světla by měl poskytovat konstantní počet fotonů při všech vlnových délkách, fotony by měly procházet monochromátory při všech vlnových délkách se stejnou účinností, účinnost monochromátorů by měla být nezávislá na polarizaci a detektor by měl detekovat fotony všech vlnových délek se stejnou účinností.

2.4.6 Nelinearita a vnitřní filtrační efekt

Důležitým předpokladem pro přesnost měření je fakt, že intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu. Toto však platí pouze v omezeném rozsahu optických hustot. Při vyšších koncentracích fluoroforu se objevuje odchylka od linearity, která je nazývána jako vnitřní filtrační efekt a je jedním z faktorů, které jsou schopny zkreslit přesnost měřených fluorescenčních spekter co se intenzitou fluorescence týče. Tyto efekty mohou snížit intenzitu excitačního záření nebo naměřené fluorescence, protože dochází k reabsorpci již emitovaného fluorescenčního záření. Relativní důležitost každého procesu závisí na optické hustotě vzorku, excitační a emisní vlnové délce.

2.5 Současný stav řešené problematiky

Nosiče léčiv jsou zkoumány a vyvíjeny už desítky let [12], zvláštní důraz je pak v poslední době kladen na cílené nosiče léčiv a na vymezení jejich nejdůležitějších vlastností [13], jako jsou například biokompatibilita, biodegradabilita, schopnost interagovat přímo se specifickým místem účinku, vázat léčivo dostatečně pevně, aby bylo doručeno na toto místo a přitom dostatečně slabě, aby bylo schopno uvolnit se a přejít na aktivní formu. Důležitou vlastností je také, aby rozkladem nosičového systému nevznikaly látky toxické pro organismus, nebo aby nedocházelo k nežádoucímu ukládání škodlivých zbytků v těle. Takové množství požadavků na jediný systém činí vývoj cílených nosičových systémů nelehkým.

Hyaluronan je díky své biokompatibilitě, unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem a schopnosti interagovat s receptory na povrchu buněk považován za molekulu vhodnou pro použití v cílené distribuci léčiv [14]. Klíčovým problémem chemoterapeutických léčiv je totiž nespecifická distribuce, která vede k systémové toxicitě. Mnoho buněk tumorů však vykazuje neregulovanou expresi receptorů pro hyaluronan, což způsobuje, že tato molekula má vysokou afinitu k nádorovým buňkám. Tento fakt vedl k předklinickému vývoji biokonjugátů HyA-cytotoxin, které využívají hyaluronan jako jednotku rozpoznávající tumor [15]. **Cai S. a spol.** [16] zkoumali konjugáty hyaluronan-cisplatina jako intralymfatická chemoterapeutika a zjistili, že tyto konjugáty mají vyšší účinnost než volné léčivo a jsou také organismem lépe snášeny. **Kafedžiiski K a spol.** [17] syntetizovali a charakterizovali konjugát hyaluronanu a ethylesteru cysteinu (HyA-Cys) a vytvořili tak základ pro nové nosičové systémy s lepšími mukoadhezivními vlastnostmi a nižší rychlostí biodegradace. Poněkud komplexněji se problémem zabývali **Esposito S. a spol.** [18]. Popisují produkci biodegradabilních mikročastic s použitím různých typů hyaluronanu jako jsou nativní hyaluronan, esterifikovaný derivát hyaluronanu Hyaff 11p50 (50% karboxylových skupin na řetězci hyaluronanu je esterifikováno benzylalkoholem) a vnitřně zesíťovaný derivát hyaluronanu. Byl hodnocen vliv polymeru a procesu výroby na charakteristiky vznikajících mikročastic (morfologie, solubilizační kapacita) a na profil uvolňování léčiva.

Jedním z uvažovaných způsobů jak připravit cílené nosiče léčiv je využití interakcí tenzidu a polyelektrolytu. Tyto systémy spojují výhody obou látek, díky hydrofobní doméně tvořené tenzidem je agregát schopen solubilizovat léčivo a hyaluronan slouží jako jakási adresa, zabezpečující cílení na buňky tumoru. Tento model je však značně zjednodušený a při jeho bližším zkoumání přistupuje mnoho nových problémů. Jedním z nich je například stabilita hyaluronanu v krevním řečišti, kterým by měl být konjugát s léčivem distribuován [19]. Základní nutností však zůstává charakterizovat interakce v těchto systémech a vznikající agregáty polyelektrolyt-tenzid, v tomto konkrétním případě pak hyaluronan-tenzid. Tímto problémem se pro systémy obsahující kationaktivní tenzid a hyaluronan velmi obsáhle zabývali **Thalberg, K. a spol.** [20]. Byly zkoumány interakce mezi sodnou solí hyaluronanu a alkyltrimethylamonium bromidy s různými délkami řetězce (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků) a to pomocí metod fázové separace, vodivosti, NMR a solubilizace barviv. Získané výsledky demonstrují, že s hyaluronanem interagují tenzidy, které mají v alkylovém řetězci více než deset uhlíků a že k jejich navázání stačí jen velmi malá koncentrace tenzidu. Pro tenzidy s kratším řetězcem je tvorba volných micel energeticky preferována před navázáním na hyaluronan. Bylo zjištěno, že v případě hyaluronanu se tenzid váže slaběji než v případě jiných polyelektrolytů (alginát, pektát) a to pravděpodobně díky nízké hustotě náboje na řetězci hyaluronanu. Shrnutí výsledků vede k domněnce, že interakce hyaluronanu a

kationaktivních tenzidů tohoto typu vede ke tvorbě agregátů podobných micelám, které jsou navázány na řetězci polyelektrolytu, avšak jsou menší než odpovídající volné micely. Tento model je označován jako struktura perlového náhrdelníku „pearl necklace“ [26]. V jistém stupni navázání tenzidu na hyaluronan však komplexy nejsou dále rozpustné a dochází k fázové separaci a vzniku precipitátů, které mohou být znovu rozpuštěny buď po přidání velkého nadbytku tenzidu, nebo nízkomolekulárního elektrolytu, jejichž efekt je v podstatě analogický. Z výsledků vodivostních měření je dále patrné, že kromě kationtů tenzidu je na kostře hyaluronanu vázána také část bromidových protiontů, což je jeden z důvodů proč se mluví o agregátech podobným micelám s protionty dvojího druhu, to jest bromidovým a karboxylátovým náležícím polymeru. Disociované karboxylové skupiny mohou totiž snižovat elektrostatickou repulzi mezi kladnými náboji tenzidu, což může vést k tomu, že micela vázaná na hyaluronanu je stabilnější, než příslušná volná micela. Solubilizační experimenty potvrzují tuto domněnku, protože komplexy tenzidu s hyaluronanem jsou schopny rozpustit hydrofobní barvivo a to i přesto, že přidavek barviva do systému, může znamenat částečné rušení interakcí. Předpokládá se, že se vzrůstající koncentrací polyelektrolytu budou agregáty více stabilní. Pokud ale vzrůstá koncentrace polyelektrolytu, stabilita volných micel vzroste a jejich tvorba bude upřednostněna před tvorbou vázaných micel. Při dostatečně vysoké koncentraci elektrolytu tedy vázání tenzidu na polyelektrolyt klesá.

Dále se tento autor zabýval fázovým chováním systému TTAB-HyA-voda. Výsledkem bylo vytvoření fázového diagramu pro tento systém, jehož hlavním znakem je dvoufázový region ve tvaru kapky začínající v rohu diagramu příslušejícímu vodě a který je zcela uzavřen jednofázovou oblastí. Navíc jeho tvar vykazuje značnou nesymetrii, takže roztok koncentrovaného polyelektrolytu může rozpustit značně velké množství tenzidu, zatímco koncentrovaný roztok tenzidu se po přidání elektrolytu téměř ihned fázově separuje. Fázově separované komplexy HyA-tenzid transformují na průhledný isotropický gel s relativně vysokým obsahem vody. Přítomnost této gelové fáze obsahující okolo 70 % vody reflektuje vysokou hydrofilitu výsledného komplexu.

Zkoumán byl také efekt jednoduché soli (NaBr) na fázovou separaci systému CTAB-HyA. Přidání nízkých koncentrací polyelektrolytu vede ke zmenšení dvoufázového regionu ve fázovém diagramu systému a při dosažení jisté hranice koncentrace soli (250 mM) už fázová separace neprobíhá. Po dalším přidavku soli (500 mM) se fázová separace může znovu objevit, ale její charakter je zcela odlišný, zahrnuje separaci na roztok bohatý na tenzid a na roztok bohatý na polymer. Z výsledků plyne, že přidaná sůl redukuje interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, což by znamenalo, že velká část interakce je elektrostatické povahy.

Dále byl zkoumán vliv délky řetězce tenzidu a molekulové váhy polyelektrolytu na fázové chování tenzidu (alkyltrimethylammonium bromid) a polyelektrolytu (hyaluronan). Delší uhlíkový řetězec tenzidu má za následek větší dvoufázový region ve fázovém diagramu, zatímco snižování molekulové váhy polyaniontu vede pouze k nepatrným změnám v jeho poloze. Celkově vzato má změna molekulové váhy polymeru na fázový diagram jen malý vliv.

Stejný tým využil k výzkumu interakcí hyaluronanu a alkyltrimethylammonium bromidů také fluorescenční spektroskopii. Fluorescenční spektra pro pyren v roztoku tenzidu s i bez obsahu hyaluronanu se ukázala být téměř identická, což indikuje podobnou strukturu micel v přítomnosti hyaluronanu. Agregáčnící čísla nejsou přítomností hyaluronanu příliš ovlivněny.

Fluorescenční spektroskopie se ukázala být obecně vhodnou metodou ke zkoumání interakcí tenzidů s jinými molekulami [27]. Pro detekci hydrofobních domén a stanovení CMC systémů polyanion-tenzid a polyanion-aminokyselina byly vybrány jako nejvhodnější sondy pyren [30] a nilská červeň [37].

Yin D. a spol. [41] zkoumali pomocí fluorescenční spektroskopie interakce mezi sodnou solí hyaluronanu a různými tenzidy-anionaktivní (SDS) a neionogrní (Tween 80, Cremophor EL) s použitím pyrenu jako sondy. Z výsledků vyvodili, že s Tween 80 a hyaluronan interagují vzájemně jen velmi slabě a Cremophor EL neinteraguje s hyaluronanem vůbec. Dále pak zjistili, že sodná sůl hyaluronanu ovlivňuje agregaci SDS stejně jako přidavek elektrolytu, CMC se snižuje. Dále byl zkoumán vliv přídavku sacharidu na agregaci v systému. **Nizri G. a spol.** [42] zkoumali pomocí fluorescenční spektroskopie interakce mezi SDS a polyelektrolytem poly(diallyldimethylamonium chloride), která vede k formaci nanočástic dispergovaných ve vodě. Morfologie výsledných nanočástic a jejich schopnost solubilizovat hydrofobní molekuly byla hodnocena. Solubilizace byla testována pyrenem a nilská červeň byla použita jako solvatochromní sonda.

Pomocí fluorescenční spektroskopie je však možno stanovit i jiné charakteristiky micelárního systému [43] jako je například agregační číslo. **Turro N. J. a spol.** [44] využili zhášení fluorescence ke stanovení agregačního čísla dodecylsiranu sodného, přičemž používali jako fluorescentní donor $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, jako zhášec 9-methylantracen.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Materiály

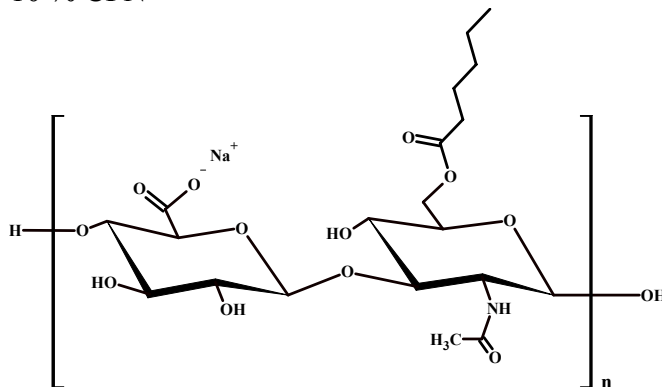
Hyaluronan

HyA $M_w = 90,53$ kDa, nativní, CPN, šarže 050607

HyA $M_w = 1,434$ MDa, nativní, CPN, šarže 210306-D2

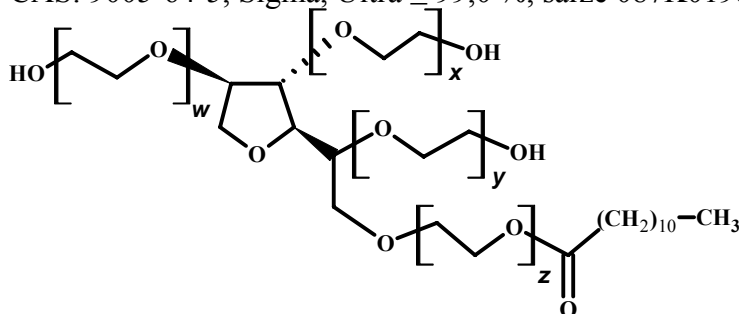
Deriváty

AcylHex1 (AcH1), $M_w = 50$ kDa, hydrofobizovaný, stupeň substituce 10 % CPN

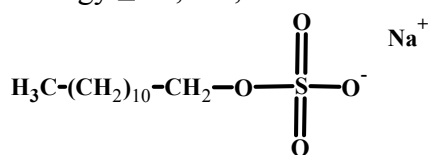


Tenzidy

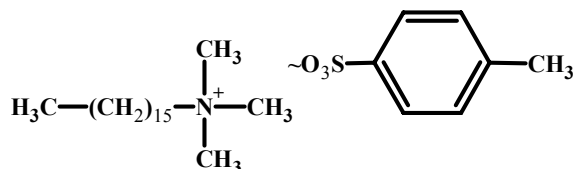
TWEEN[®] 20, Polyethylene glycol sorbitan monolaurate,
CAS: 9005-64-5, Sigma, Ultra $\geq 99,0$ %, šarže 087K01981



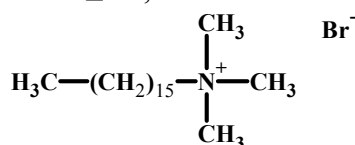
SDS, dodecylsulfát sodný, CAS: 151-21-3; Sigma, Ultra for molecular biology $\geq 99,0$ %, šarže 1256726



CTAT, cetyltrimethylammonium tosylát, CAS: 138-32-9; Sigma,
šarže SL07421

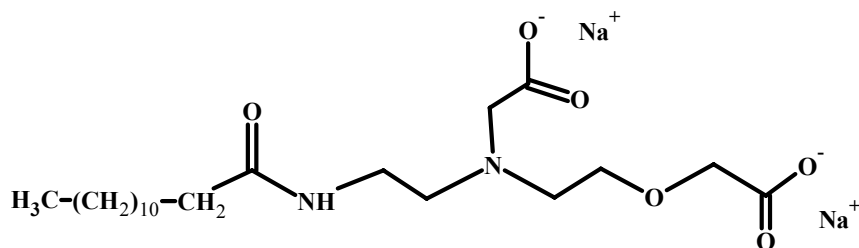


CTAB, cetyltrimethylammonium bromide, CAS: 57-09-0, Sigma,
Ultra $\geq 99,0$ % šarže 117K0732



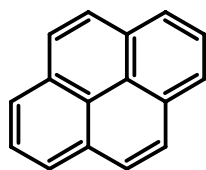
AMK

BETADET[®] THC-2, Disodium cocoamphoacetate, CAS: 19744-29-3
šarže PGR0091127

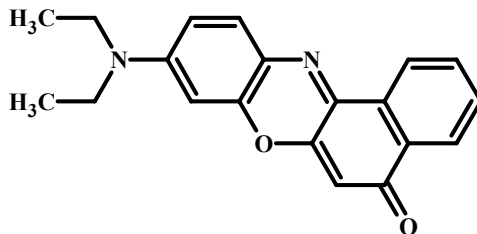


Fluorescenční sondy

pyren, CAS: 129-00-0, Fluka, puriss p.a. for fluorescence,
šarže 430166/1

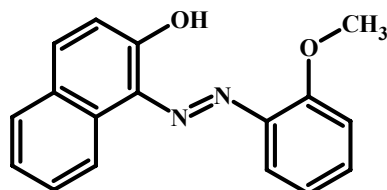


nilská červeň, CAS: 7385-67-3, BioChemika, for fluorescence
≥ 98,0 %, šarže 1381468



Hydrofobní barvivo

SR, súdánová červeň G, CAS: 1229-55-6, Fluka, ≥ 96,0 %,
šarže 401930/1



Rozpouštědla

Mili-Q voda (Milipore Academic)
aceton, LachNer s.r.o., p.a.

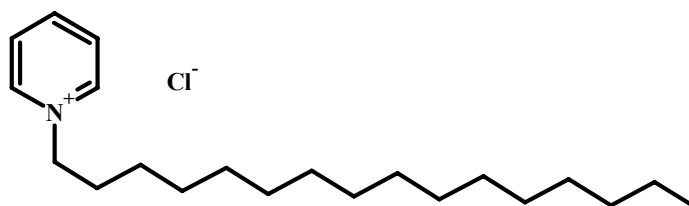
Ostatní

NaN₃, azid sodný, CAS: 26628-22-8, LachNer s.r.o., p.a.,
šarže 311860902

NaCl, chlorid sodný, CAS: 7647-14-5, LachNer s.r.o., p.a.,
šarže 304530306

NaBr, bromid sodný, CAS: 7647-15-6, Fluka, purum p.a.,
šarže 363547/1

CPC, Cetylpyridinium chlorid, CAS: 6004-24-6, Sigma, ≥ 99,0 %,
šarže 115K0073



3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků

Byly připraveny zásobní roztoky fluorescenčních sond v těkavém rozpouštědle (aceton) a dále pak zásobní roztoky používaných tenzidů a hyaluronanu v 0,15 M roztoku NaCl, jako nejjednodušším modelu fyziologického roztoku. Zásobní roztoky hyaluronanu byly stabilizovány azidem sodným, tak aby konečná koncentrace azidu sodného v roztoku činila 0,05 %. Tyto roztoky stejně jako zásobní roztoky fluorescenčních sond byly skladovány v lednici při teplotě 4° C. Zásobní roztoky tenzidů byly skladovány při laboratorní teplotě.

Při přípravě vzorků byly použity tmavé skleněné vialky o objemu 10 mL, do kterých bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku fluorescenční sondy (10^{-4} M) v těkavém rozpouštědle (aceton), aby po odpaření rozpouštědla a doplnění vzorku na celkový objem, byla konečná koncentrace sondy v roztoku řádově 10^{-6} M. Do takto připravených vialek byl pipetován roztok vzorku, který již obsahoval všechny složky, tj. tenzid ve fyziologickém roztoku, popř. hyaluronan, tenzid a to vše ve fyziologickém roztoku. Postup míchání jednotlivých složek byl následující. Nejdříve byl pipetován příslušný objem zásobního roztoku hyaluronanu, tak aby jeho koncentrace ve vzorcích byla konstantní (0,1 % hm.) a do něj byl poté přidáván zásobní roztok tenzidu v různém množství, tak aby se dosáhlo proměnné koncentrace tenzidu ve vzorcích. Nakonec byl vzorek doplněn na celkový objem 0,15 M roztokem NaCl a byl ponechán minimálně 12 hod na míchačce při laboratorní teplotě.

Příslušné koncentrační řady jednotlivých tenzidů byly navrhovány podle tabelovaných hodnot kritické micelární koncentrace viz. (Tab 1) a to tak, aby nejvyšší koncentrace tenzidu dostatečně převyšovala tabelovanou hodnotu CMC a přitom nedošlo k vysrážení vzorku. V případech, kdy nebyla tabelovaná hodnota CMC nalezena (BETADET THC 2, CTAT), byla nejdříve proměřena široká koncentrační řada tenzidu v příslušném prostředí. Na základě této zjištěné hodnoty byla připravena koncentrační řada tak, aby bylo dosaženo předpokládané hodnoty agregační (micelární) koncentrace mezi čtvrtým a pátým nejkonzentrovanejším vzorkem navrhované řady.

Tab 1: Tabulka tabelovaných hodnot CMC pro vybrané tenzidy

tenzid	tabelovaná hodnota CMC
Tween 20	0,06 mM; (25°C) ^a ; voda
SDS	1,62 mM; $N_{agg} = 112$; 25°C; 0,1 M NaCl [45]
CTAB	1 mM; (25°C) ^a , voda/ 0,1 M KCl, 0,06 mM, 22°C [46]

a...hodnota udaná na stránkách výrobce

Dále byly připraveny vzorky pro sledování agregačního chování a schopnosti solubilizovat pro systémy s konstantní koncentrací hyaluronanu a s proměnnou koncentrací tenzidu CTAB. Do skleněných vialek byl pipetován zásobní roztok hydrofobního barviva súdánové červeně v těkavém rozpouštědle a aceton byl ponechán odpařit. Poté bylo do vzorků pipetováno různé množství tenzidu, tak aby se v koncentrační řadě nacházely vzorky jak pod tak nad hranicí CMC tenzidu ve fyziologickém roztoku. Dále bylo do vzorků pipetováno příslušné množství zásobního roztoku hyaluronanu, tak aby jeho konečná koncentrace byla 0,1 % hm. Byly připraveny koncentrační řady s obsahem HyA 90,5 kDa, HyA 1,4 MDa a hydrofobizovaného derivátu Ach1. Pro srovnání byla připravena také řada bez obsahu hyaluronanu pouze s tenzidem CTAB.

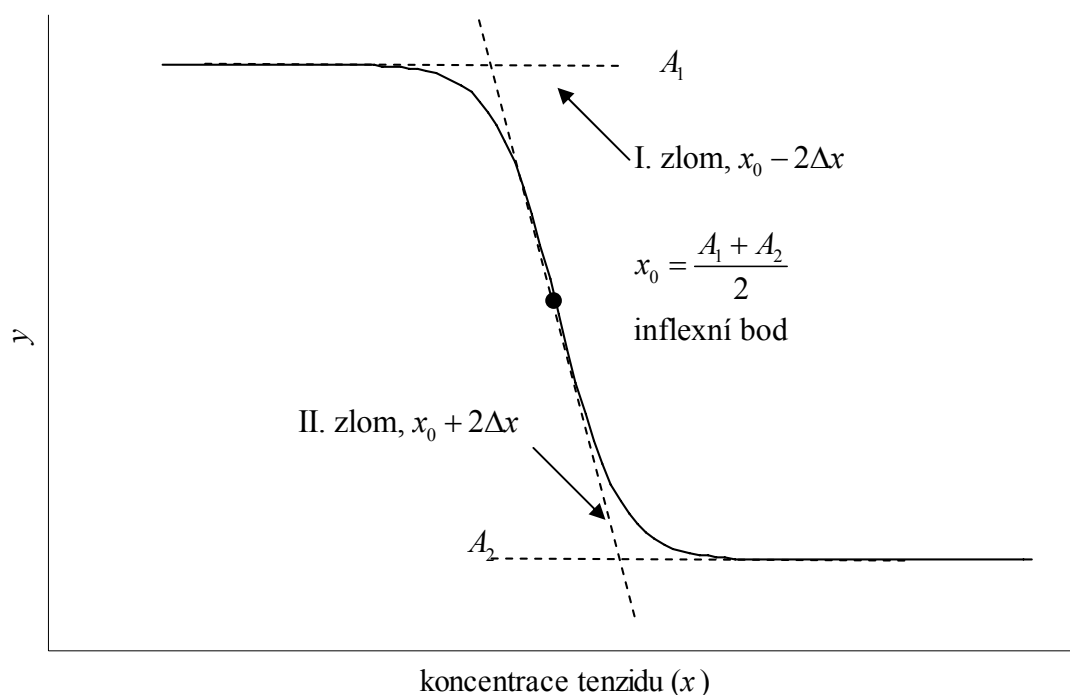
Na základě výsledků zkoumání solubilizačního a agregačního chování se súdánovou červení byla zvolena koncentrace tenzidu (0,5 mM), při které bylo měřeno agregační číslo. Pro přípravu vzorků na měření agregačního čísla byl nejdříve připraven zásobní roztok tenzidu, do kterého byla den předem rozpuštěna fluorescenční sonda pyren. Zásobní roztok byl minimálně 12 h ponechán na míchačce. Potřebné množství tohoto zásobního roztoku bylo pipetováno do vialek, tak aby konečná koncentrace tenzidu ve všech vzorcích byla stejná (0,5 mM). Poté bylo do vzorku pipetováno potřebné množství 0,15 M roztoku NaCl pro doplnění vzorku na celkový objem 5 ml. Jako třetí komponenta byl do vzorků pipetován zásobní roztok CPC, tak aby první vzorek v řadě zhášec neobsahoval a poté, aby koncentrace zhášec ve vzorcích postupně stoupala. Jako poslední byl do vzorku pipetován zásobní roztok příslušného hyaluronanu.

3.2.2 Měření a vyhodnocení dat

3.2.2.1 Pyren

Fluorescenční emisní spektra byla měřena na fluorimetru AMINCO Bowman Series 2. Při měření vzorků obsahujících pyren byl monochromátor excitace nastaven na 336 nm a monochromátor emise na 392 nm. Měřeny byly emisní skeny v rozsahu od 360 nm do 540 nm, při rychlosti skenu 5 nm s^{-1} . Sledovány byly intenzity prvního (I_1 , 373 nm) a třetího (I_3 , 384 nm) maxima v emisním spektru pyrenu a z poměru těchto hodnot I_1/I_3 (polaritní index) byla stanovena CMC [47].

Standardní vyhodnocení takto získaných dat bylo prováděno pomocí proložení získaných závislostí Boltzmannovou křivkou. Obr. 7 znázorňuje tuto křivku a její charakteristické parametry.



Obr. 7: Boltzmannova závislost a její charakteristické parametry

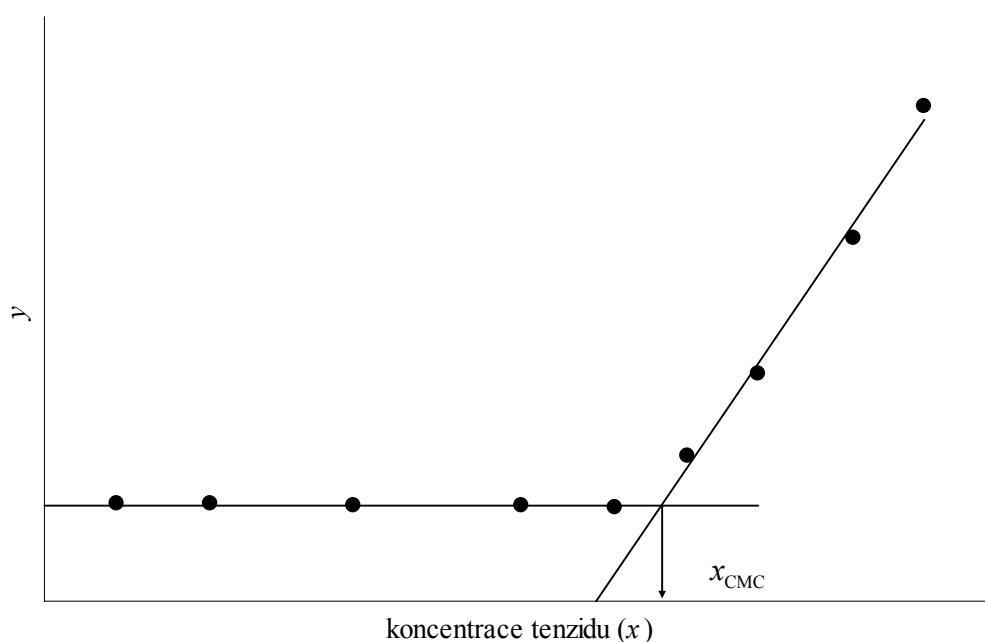
Rovnice sigmoidní křivky je dána jako:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (5)$$

kde proměnná y odpovídá poměru hodnot I_1/I_3 emisních maxim pyrenu, nezávislá proměnná x označuje celkovou koncentraci tenzidu, A_1 a A_2 je horní a spodní limita sigmoidní křivky. x_0 je inflexní bod a Δx je přímo spojeno s rozsahem nezávislé proměnné, ve kterém probíhá náhlá změna závislé proměnné [53].

3.2.2.2 Nilská červeň

Pro nilskou červeň byl excitační monochromátor nastaven na 550 nm a emisní monochromátor na 638 nm. Sledována byla intenzita a poloha maxima emisního píku a dále byl pro vyhodnocení použit také totální integrál emisního spektra v rozmezí od 610 nm do 700 nm. Takto naměřená data mají charakteristický průběh, intenzita fluorescence a totální integrál emisního spektra jsou v oblasti před CMC konstantní a po dosažení CMC následuje nárůst. Vyhodnocení probíhá metodou průsečíku dvou přímek. Stoupající část závislosti je proložena lineární regresí do jejíž rovnice je dosazena průměrná hodnota intenzity nebo totálního integrálu z konstantní části křivky a takto je vypočtena CMC viz. (Obr. 8) [54].



Obr. 8: Standardní vyhodnocení dat získaných nilskou červeň pomocí metody průsečíku dvou křivek

Naměřená data posunu emisního maxima nilské červně mají charakteristický sigmoidní tvar a proto je k jejich vyhodnocení použita výše zmíněná Boltzmannova závislost. Jako CMC je brána koncentrace tenzidu odpovídající inflexnímu bodu. Stejná závislost je použita také k vyhodnocení dat intenzity fluorescence a totálního integrálu emisního spektra nilské červně, ale to jen v případě, že dojde k saturaci signálu. Potom je jako hodnota CMC brána koncentrace při které na křivce nastává první zlom, což je adekvátní k vyhodnocení pomocí průsečíku dvou přímek.

3.2.2.3 Agregáčn číslo

Při měření agregáčnho čísla byl jako donor použit pyren a jako zhášeč kosurfaktant CPC. Charakteristická namřen data mají tvar lineárn závislosti s počátkem v bodě „0“. Tyto závislosti byly proloženy pomocí lineárn regrese a směrnice k získané přímky slouží k výpočtu agregáčnho čísla dle následujícího vztahu:

$$N_{agg} = ([S] - [CMC]) \cdot k, \quad (6)$$

kde $[S]$ značí koncentraci tenzidu.

3.3 Korekce

Jedním z faktorů, které jsou schopny zkreslit přesnost měření fluorescence je vnitřní filtrační efekt viz. kapitola 2.4.6. Proto byla fluorescenční spektra korigována podle vztahu:

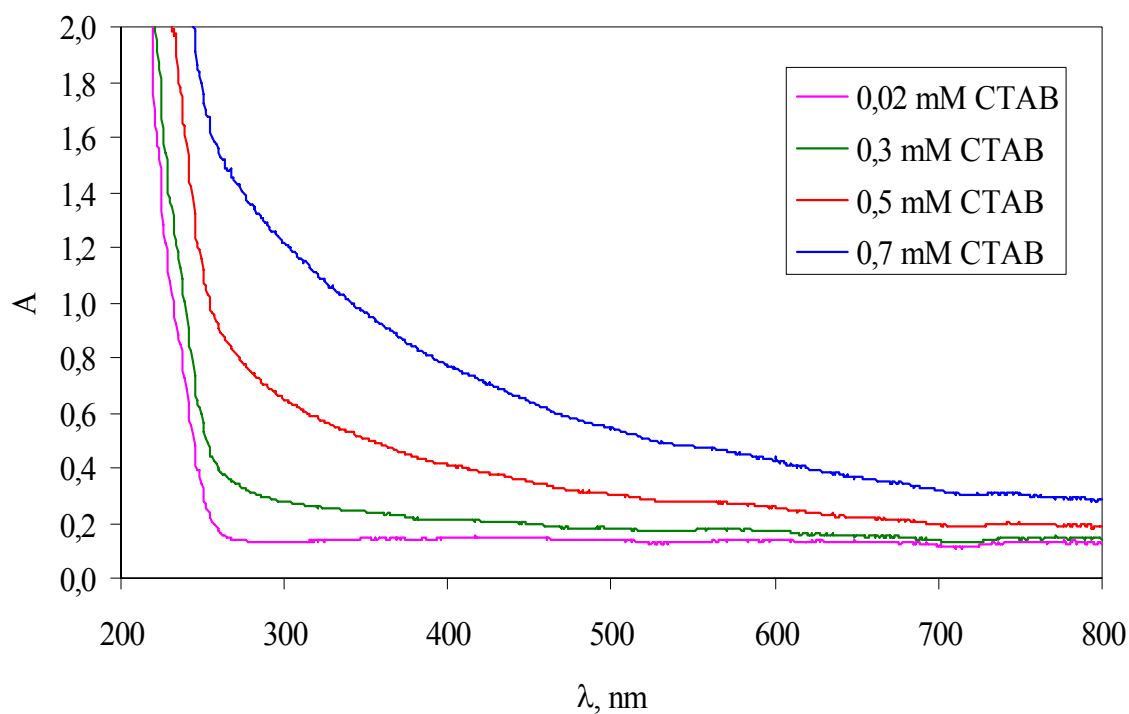
$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (OD_{ex} + OD_{em})}, \quad (7)$$

kde F_{obs} je experimentáln získaná fluorescence, OD_{ex} je optická hustota při excitační vlnové délce a OD_{em} je optická hustota při emisní vlnové délce. Tento vztah dobře koriguje vnitřní filtrační efekt i zákal samotného vzorku [56].

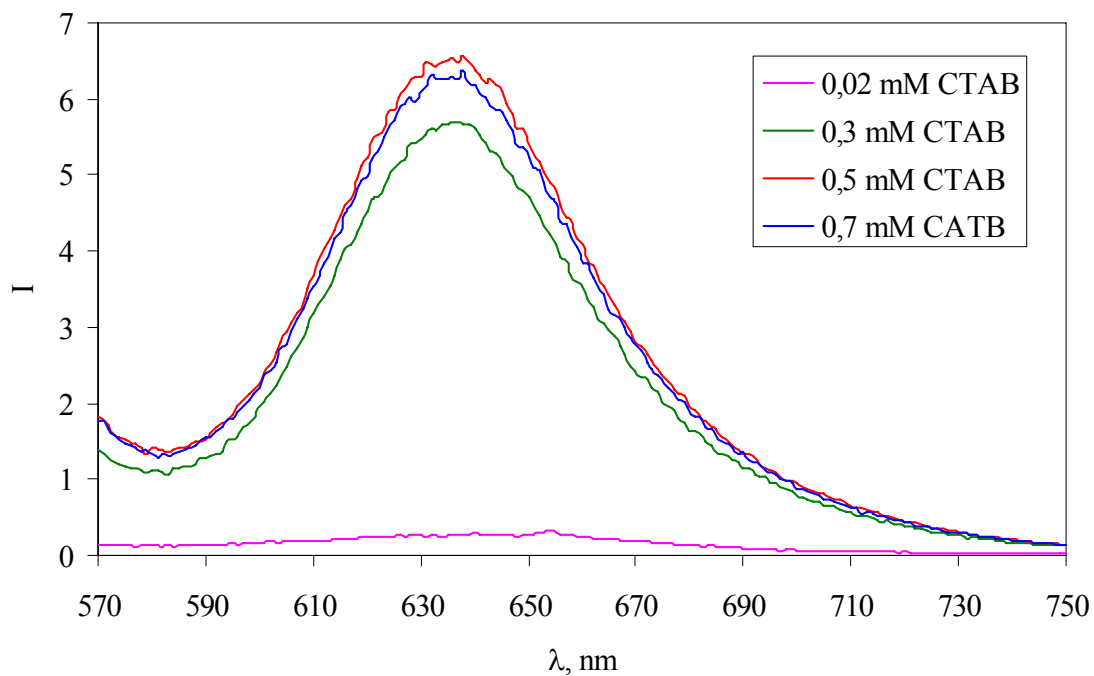
Korekce byly provedeny tak, že pro vzorky byly namřeny absorpční spektra v rozsahu od 200 nm do 800 nm s pomocí absorpčního spektrometru Varian Cary Probe 50 s použitím kyvety o optické dráze 1 cm. V tomto případě se optická hustota vzorku odpovídá jeho absorbanci. Vztah výše po dosazení vypadá:

$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{ex} + A_{em})}, \quad (8)$$

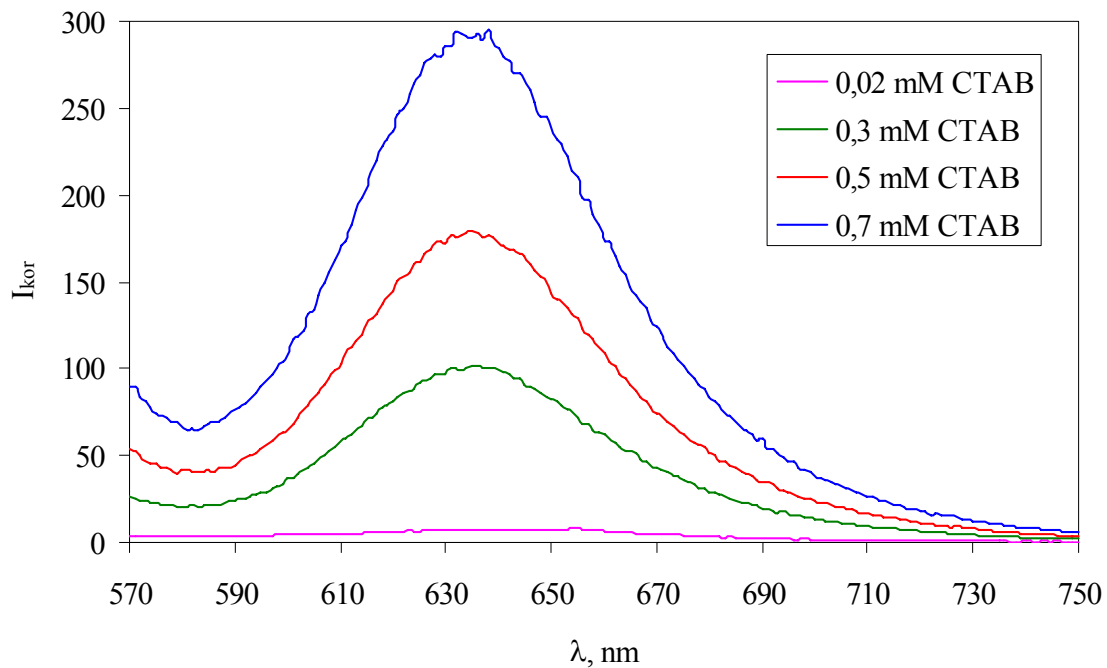
kde A_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce a A_{em} je absorbance při emisní vlnové délce. Obr. 9 zobrazuje namřen absorpční spektra pro vybran vzorky, které byly použity pro korekci. V tomto případě byly vzorky zakaleny a jak je vidět na obrázku zákal rostl s rostoucí koncentrací CTAB. Obr. 10 a Obr. 11 znzornují nekorigovaná a korigovaná fluorescenční spektra příslušných vzorků. Rozdíl mezi nimi je patný a tím také smysl korekcí. Korigované spektrum totiž přesně odpovídá známému chování nilské červen kdy s rostoucí koncentrací CTAB roste počet micel, to znamená že se solubilizuje stále více sondy a intenzita fluorescence se zvyšuje.



Obr. 9: Naměřená absorpční spektra pro vzorky obsahující konstantní koncentraci AcH1 0,1 % hm. a proměnnou koncentraci CTAB



Obr. 10: Naměřená fluorescenční nekorigovaná spektra pro vzorky obsahující konstantní koncentraci AcH1 0,1 % hm. a proměnnou koncentraci CTAB



Obr. 11: Korigovaná fluorescenční spektra pro vzorky obsahující konstantní koncentraci AcH1 0,1 % hm. a proměnnou koncentraci CTAB

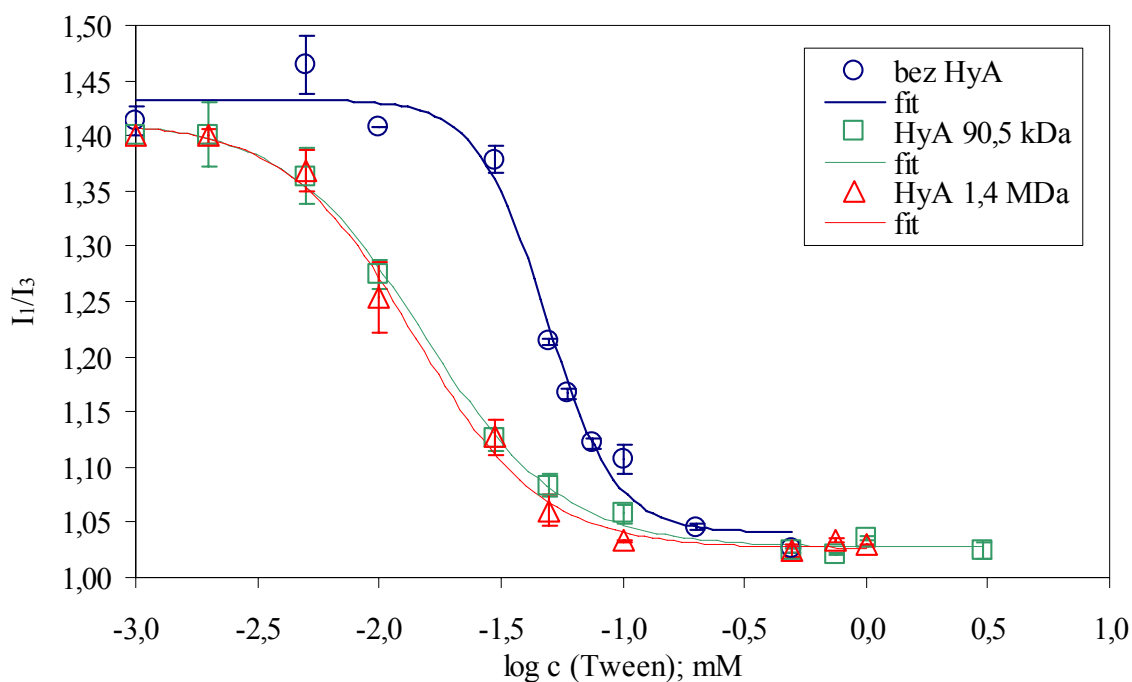
3.4 Statistika

Všechna měření byla prováděna minimálně třikrát. Presentované závislosti z absorpčních a emisních měření jsou průměrem ze všech měření, provedených na daných vzorcích. K jednotlivým bodům závislosti byla stanovena směrodatná odchylka, pomocí programu MS EXCEL. Směrodatné odchylky jednotlivých bodů jsou v grafech znázorněny jako chybové úsečky. U některých měření velikost chybové úsečky nepřesahuje velikost bodu.

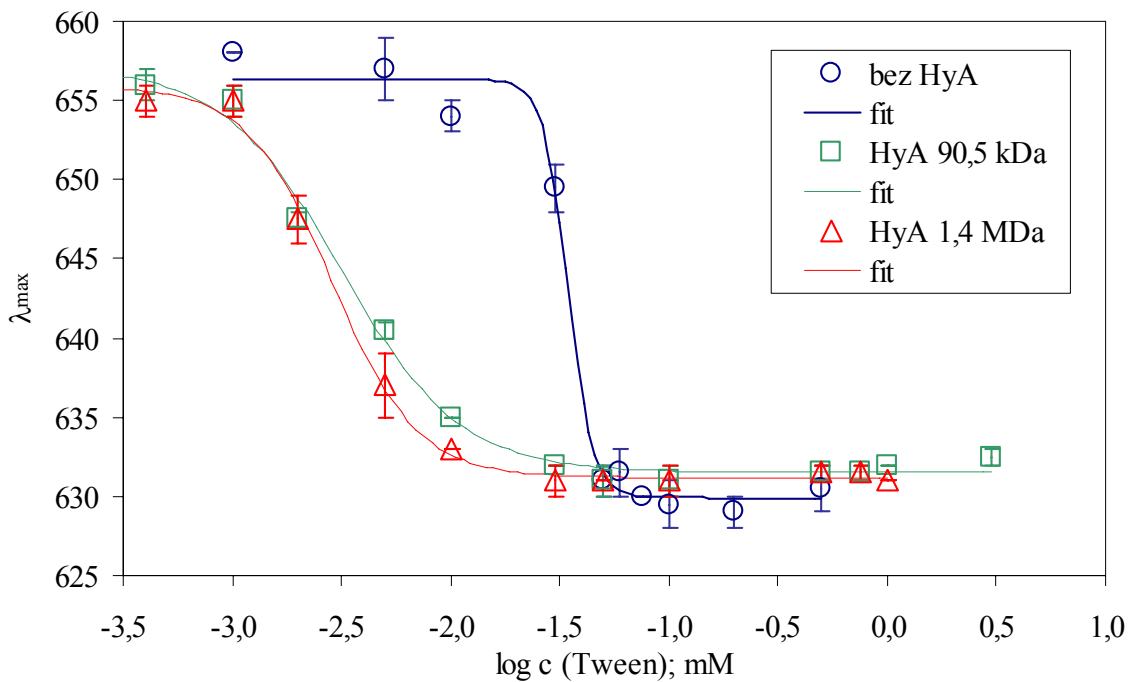
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část diplomové práce si klade za cíl blíže prozkoumat agregaci v systémech obecného složení polyanion-tenzid-fyziologický roztok a polyanion-aminokyseliny-fyziologický roztok. Jako polyanion byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové s různými molárními hmotnostmi, dále byly vybrány tenzidy Tween 20 (neionogenní), SDS (anionaktivní), CTAT, CTAB (kationaktivní) a BETADET THC 2 (amfoterní) jako zástupce ze skupiny alkylovaných betainů, spojujících strukturu tenzidu a aminokyseliny v jedné molekule. Jako jednoduchý model fyziologického roztoku zde sloužil 0,15 M roztok NaCl. Výsledky získané následujícími měřeními by měly přispět k celkovému přehledu o interakcích mezi hyaluronanem a tenzidy nebo hyaluronanem a amfifilními aminokyselinami a to s cílem charakterizovat tyto systémy s ohledem na budoucí použití v oblasti cílených nosičů léčiv.

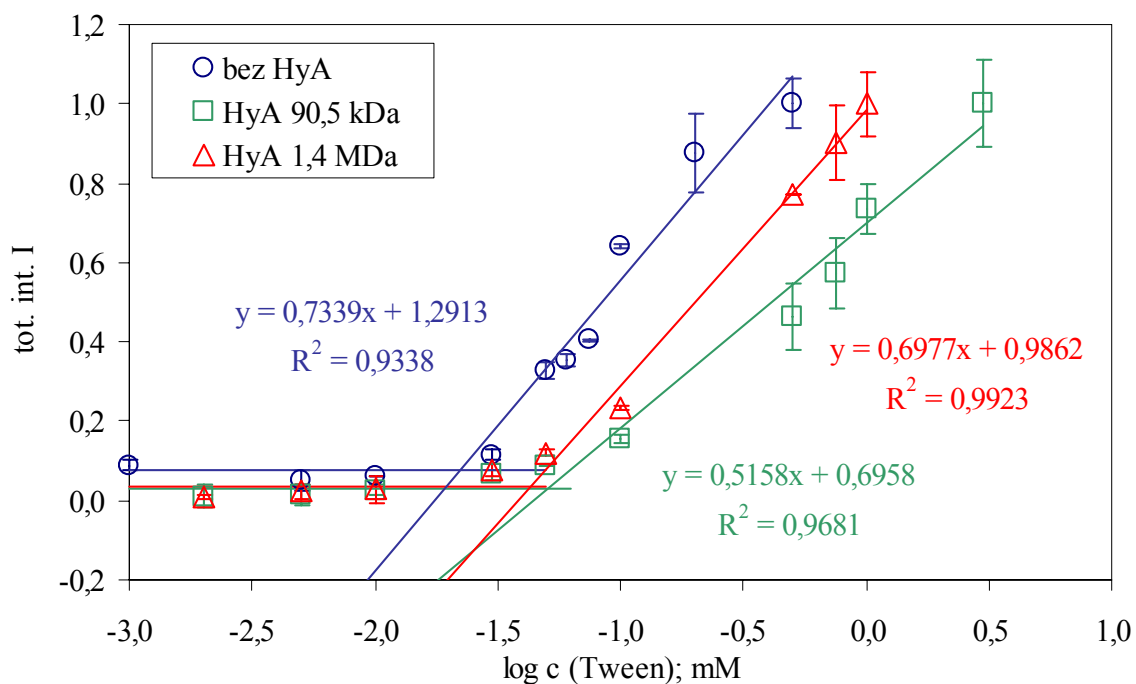
4.1 Tween 20



Obr. 12: Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu Tween 20



Obr. 13: Posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu Tween 20.



Obr. 14: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu Tween 20.

Obr. 12 zobrazuje závislosti poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu a to pro tenzid ve fyziologickém roztoku a dále pro tento systém s přidavkem nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu. Jak je patrné z uvedených závislostí, přítomnost hyaluronanu zvyšuje agregační koncentraci Tweenu 20 a to bez ohledu na molekulovou hmotnost použitého hyaluronanu. Jak ukazují stanovené parametry Δx z proložení křivek (viz. Tab 4 v příloze 1), je pokles křivek pro vzorky s hyaluronanem pozvolnější, což znamená, že přidavek tenzidu nemění polaritní index tak rychle, jako v případě vzorku bez obsahu hyaluronanu. To naznačuje, že jen poměrná část molekul tenzidu se účastní formování domény, která je schopna solubilizovat fluoreskující látky. Zbylá frakce tenzidu může interagovat s hyaluronanem za vzniku indukovaných asociátů s velmi vysokou polaritou domény.

Tyto výsledky v každém případě naznačují interakci mezi oběma komponentami, což je zajímavé s ohledem na to, že Tween 20 patří mezi neionogenní tenzidy. Ve své struktuře však obsahuje několik OH skupin, které mohou tvořit vodíkové můstky s molekulami vody, díky tomu je tenzid rozpustný ve vodě a tyto OH skupiny mohou pravděpodobně tvořit vodíkové můstky i s molekulou hyaluronanu v oblasti karboxylové skupiny, nebo může být molekula Tweenu ke kostře molekuly hyaluronanu slabě vázána přes vodné můstky mezi karboxylovou skupinou polymeru a OH skupinou tenzidu. Pozvolnější pokles polaritního indexu by mohl ukazovat na četnou tvorbu asociátů HA-tenzid, které nejsou kompaktní a obsahují velké množství vody, která polaritu formované domény zvyšuje. Je pravděpodobné, že ve vyšších koncentracích (nad 0.1 mM) je signál z těchto asociátů "překryt" signálem z hyaluronanem neovlivněných micel Tweenu 20. Toto tvrzení by mohlo být podpořeno faktem, že konečná hodnota polaritního indexu v roztoku s hyaluronanem, odpovídá hodnotě, kde je v daném prostředí přítomen pouze Tween.

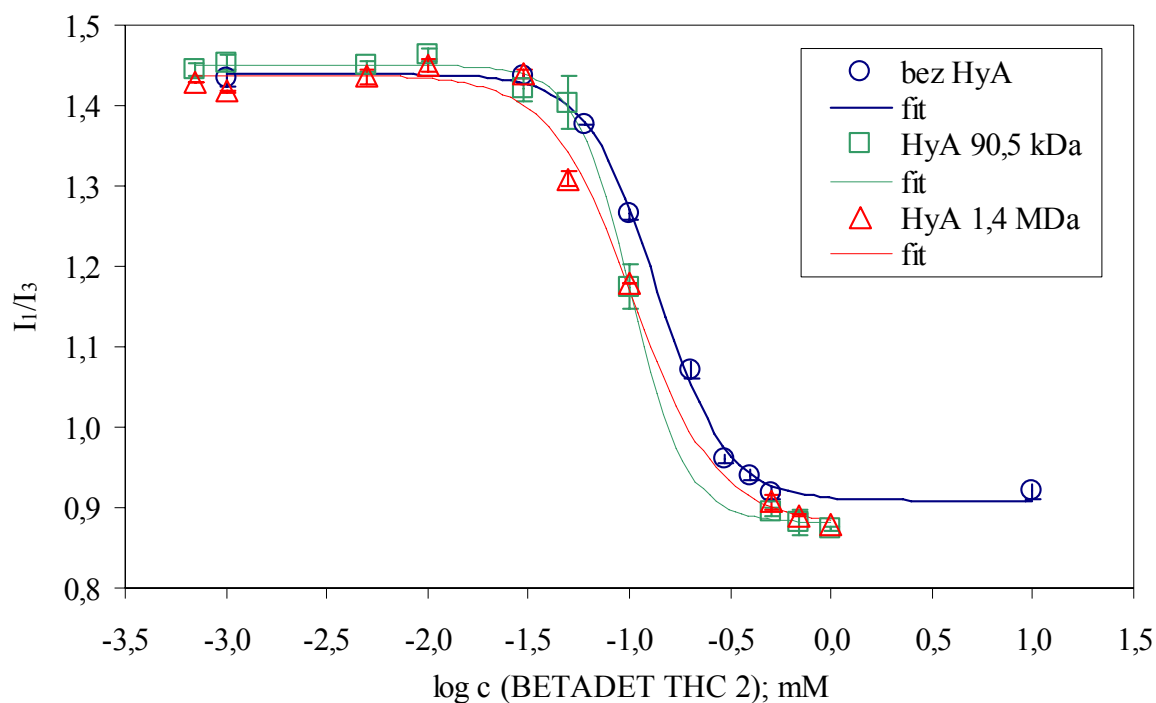
Na zřetel by také mělo být bráno, že Tween 20 je poměrně objemná molekula a pokud vezmeme v úvahu strukturu řetězců hyaluronanu ve vodě, jednou z možností, jak by bylo možné vysvětlit pokles CMC jsou sterické důvody. Důležitým faktem však zůstává, že kvalita agregátů, co se týče polaritní v mikrokóli fluorescenční sondy zůstává u všech vzorků stejná, protože poměr I_1/I_3 charakterizující polaritu, klesá stále ke stejným hodnotám.

Obr. 13 znázorňuje závislosti posunu emisního maxima nilské červeně na logaritmu koncentrace tenzidu. Výsledky víceméně korespondují s předcházejícím grafem. Ve vzorcích obsahujících hyaluronan dochází k posunu maxima dříve, což indikuje nižší CMC a maximum se také posouvá pomaleji, což odpovídá pozvolnějšímu poklesu závislosti polaritního indexu u vzorků s hyaluronanem.

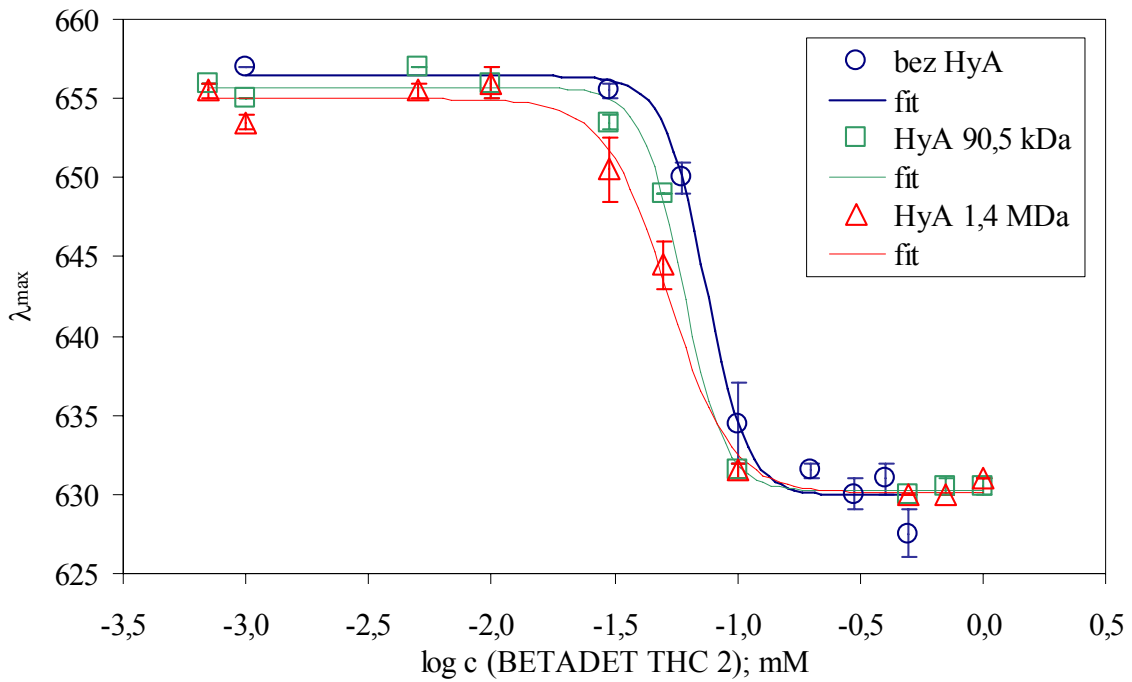
Na Obr. 14 můžeme vidět závislosti totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu. Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozími grafy a to z toho důvodu, že pro vzorky s hyaluronanem ukazují nárůst CMC. Možným důvodem mohou být fotofyzikální vlastnosti samotné fluorescenční sondy, která na rozdíl od pyrenu ve vodě nefluoreskuje. Posun maxima nilské červeně je jev čistě závislý na polaritě prostředí, její maximum se i v oblasti, kde je intenzita fluorescence velmi nízká, posouvá k nižším vlnovým délkám, jak polarita mikrokóli sondy klesá a ta se dostává do hydrofobnějšího prostředí. Vyhodnocení na základě intenzity fluorescence, realizované jako závislost totálního integrálu emisního spektra, je ve své podstatě založeno na rostoucím počtu solubilizovaných molekul sondy. V případě nilské červeně hraje roli fakt, že fluorescence je zhasena ve vodném prostředí a fluorescenční signál tedy přichází z kompaktních domén s velmi nízkým obsahem vody. Tento jev může nastat o poznání později

než když je hydrofobicita jádra agregátu detekována posunem maxima. To je také jeden z hlavních důvodů, proč jsou hodnoty CMC stanovené pomocí intenzity fluorescence většinou vyšší než hodnoty stanovené posunem maxima. K nárůstu fluorescence dochází ve chvíli, kdy se již polaritní indexy, založené na měření pyrenu i nilské červeně výrazně nemění a kvalita domény je z hlediska použitých fluorescenčních sond konečná. To může vést k potvrzení domněnky, že domény formované před tímto nárůstem jsou silně ovlivněny interakcí s hyaluronanem. Zde je ale také jasně vidět, jak rozdílná fotofyzikální podstata měření, byť s jednou stejnou molekulou fluorescenční sondy, ovlivňuje výsledná data a je nutno si tento fakt uvědomit při zpětné interpretaci výsledků. To je také jedním z hlavních důvodů proč jsou při závěrečném shrnutí hodnot CMC uvedeny pro nilskou červeně zvlášť hodnoty získané na obou rozdílných principech.

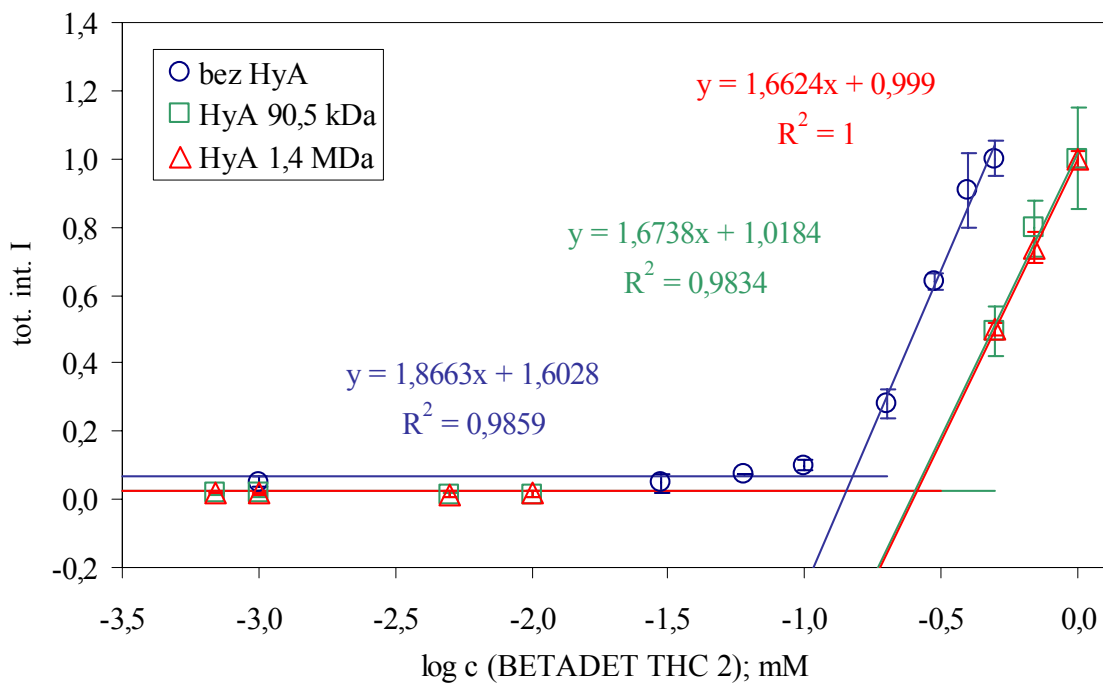
4.2 BETADET THC 2



Obr. 15: Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu BETADET THC 2



Obr. 16: Posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu BETADET THC 2



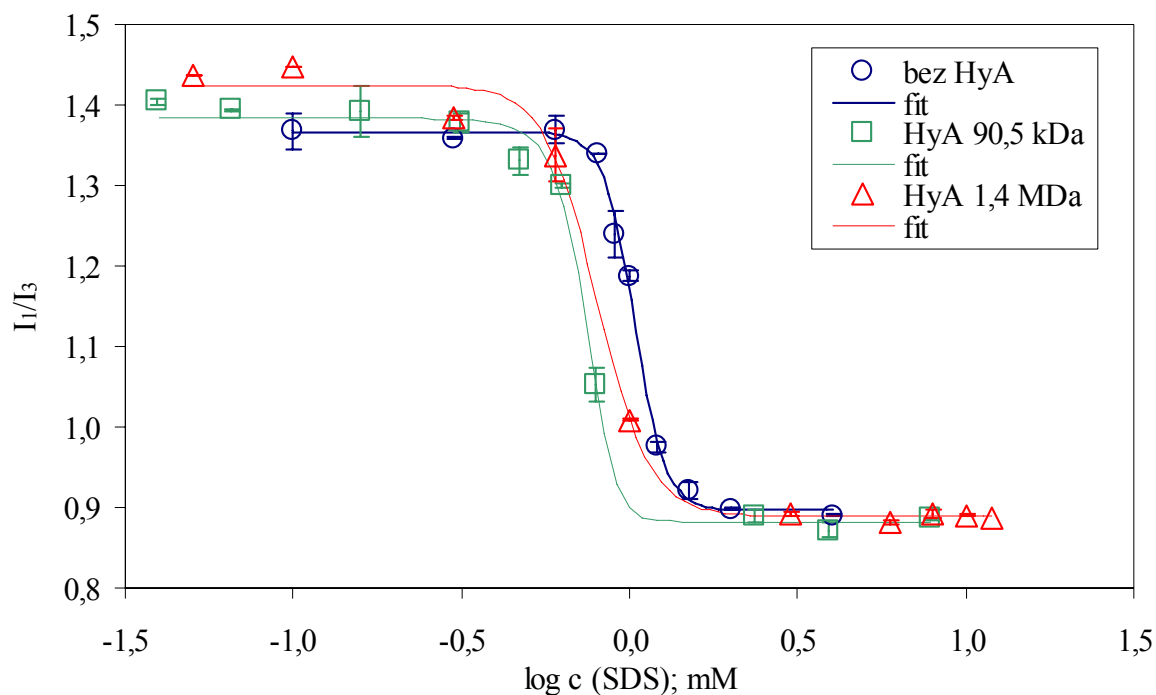
Obr. 17: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu BETADET THC 2

Obr. 15 znázorňuje závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace pro systémy obsahující BETADET THC 2 používaný většinou do kosmetických prostředků. Svou strukturou se však prakticky řadí mezi aminokyseliny. Na grafu je jasně patrné, že v přítomnosti hyaluronanu se nemění ani CMC ani kvalita formovaných agregátů. Křivky mají stále stejný průběh i tvar.

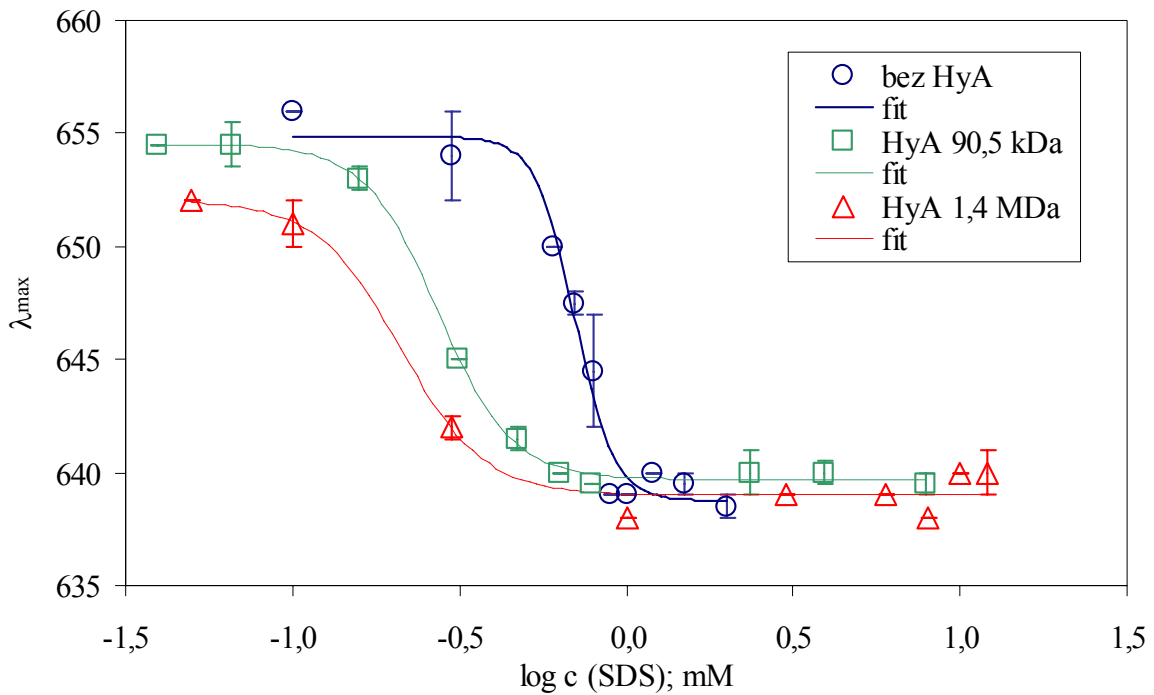
Obr. 16 znázorňuje posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu. Zde je opět vidět, že CMC se téměř nemění. Pouze se zvyšující molekulovou hmotností hyaluronanu mírně mění sklon poklesu křivek, což je pravděpodobně zapříčiněno pouze sterickými důvody.

Obr. 17 znázorňuje závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně logaritmu koncentrace tenzidu. Přestože je na grafu vidět mírný posun CMC k vyšším hodnotám za přítomnosti hyaluronanu, tato změna je pouze minimální a proto s ohledem na předchozí grafy je možno konstatovat, že ve vzorcích nedochází k žádné výraznější interakci mezi hyaluronanem a tenzidem.

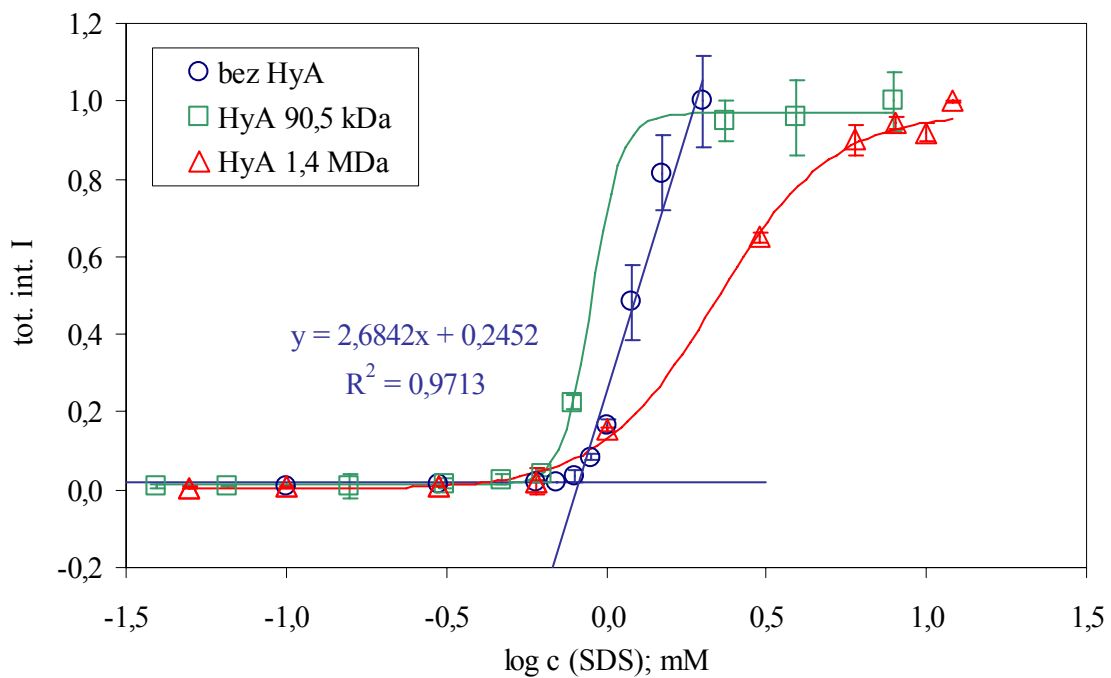
4.3 SDS



Obr. 18: Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu SDS



Obr. 19: Posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu SDS



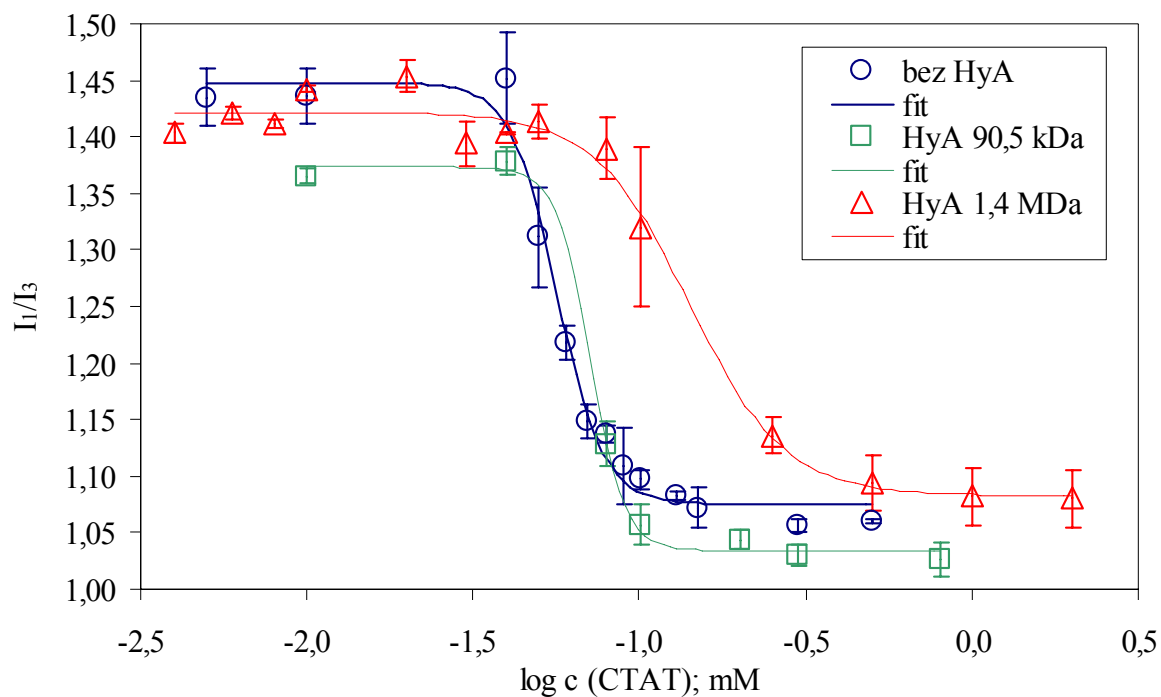
Obr. 20: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu SDS

Obr. 18 znázorňuje závislost polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu. Jak je vidět z grafu hodnoty CMC se jen velmi málo mění, je zde viditelný malý pokles CMC pro vzorky s obsahem hyaluronanu, pro oba tyto vzorky vychází prakticky stejná CMC. Jejich křivky se liší pouze svým sklonem, kdy parametr Δx roste s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. Tento nárůst, je však minimální (viz. Tab 4 v příloze 1). Křivka pro vzorek bez obsahu hyaluronanu má pak shodný sklon jako křivka pro vzorek HyA 90,5 kDa. Celkově se všechny křivky pohybují ve stejném rozmezí polaritního indexu, což indikuje stejnou kvalitu vznikajících agregátů.

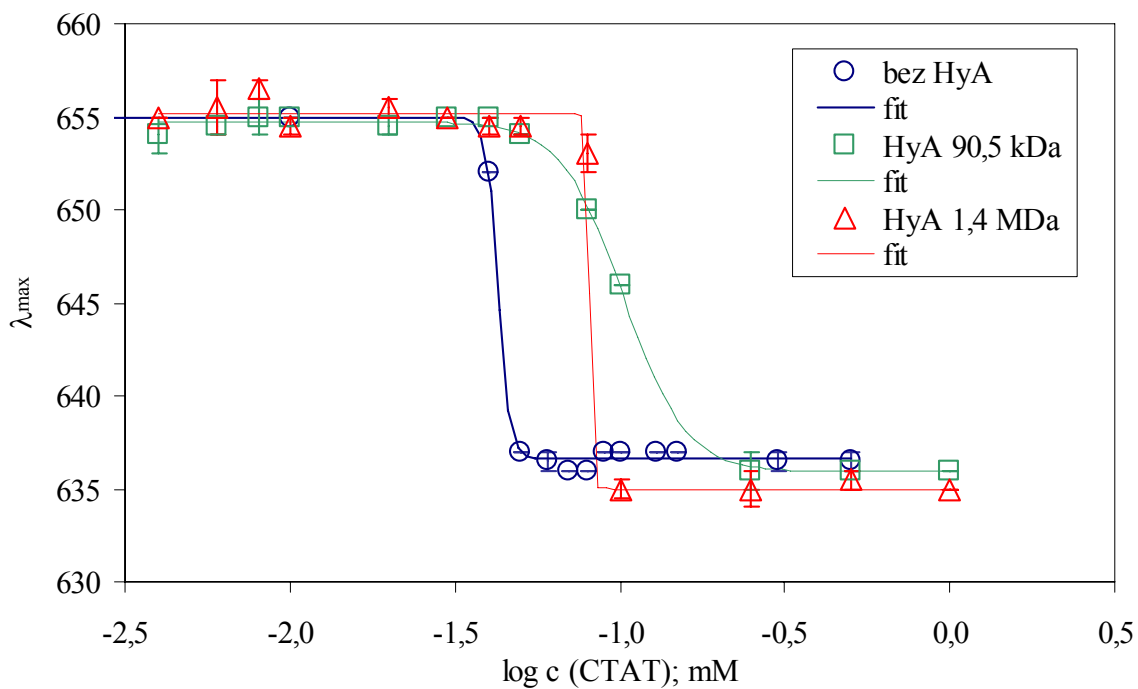
Obr. 19 zobrazuje posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu. Vývoj polarity určený pomocí posunu maxima této sondy je odlišný od chování, které indikoval pyren. Jak je vidět z grafu rozdíl mezi křivkami je jasně patrný. Nejvyšší CMC má tenzid pouze ve fyziologickém roztoku a přidavek hyaluronanu CMC opět snižuje, ale daleko znatelněji a navíc CMC klesá s rostoucí molekulovou hmotností. Liší se také sklon křivek, kdy parametr Δx (viz. Tab 4 v příloze 1) roste s rostoucí velikostí molekuly hyaluronanu.

Obr. 20 zobrazuje závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace. Jak je patrné z grafu v tomto případě musely být pro získání hodnot CMC využity dva způsoby vyhodnocení protože u vzorků obsahujících hyaluronan došlo k saturaci signálu nilské červeně. V těchto případech, byla jako hodnota CMC brána koncentrace při které nastává na křivce první zlom. U vzorku bez hyaluronanu nebyla saturace signálu pozorována, a to ze dvou možných důvodů. Buď saturace nenastává a nebo nastává až při vyšších koncentracích, které nebyly v rámci měřené koncentrační řady postihnuty. Širší koncentrační řada SDS nebyla připravena díky v literatuře dobře popsanému chování SDS ve fyziologickém roztoku a díky tomu, že ke stanovení CMC byla stávající koncentrační řada dostačující. Jak je na grafu vidět přidavek hyaluronanu ve shodě s ostatními měřeními snižuje CMC tenzidu, která klesá s rostoucí molekulovou hmotností, stejně jako v případě výsledků získaných pomocí posunu maxima nilské červeně. Výsledky naměřené pro dodecyl sulfát sodný korespondují s výsledky publikovanými v podobné studii pomocí fluorescenční spektroskopie [41].

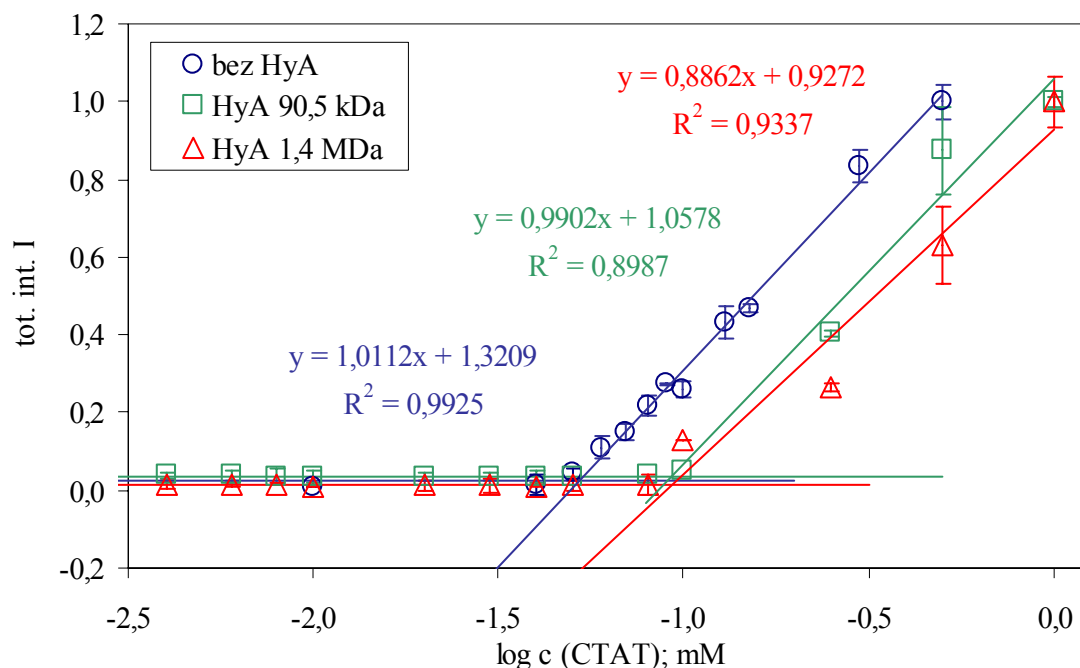
4.4 CTAT



Obr. 21: Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu CTAT



Obr. 22: Posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu CTAT



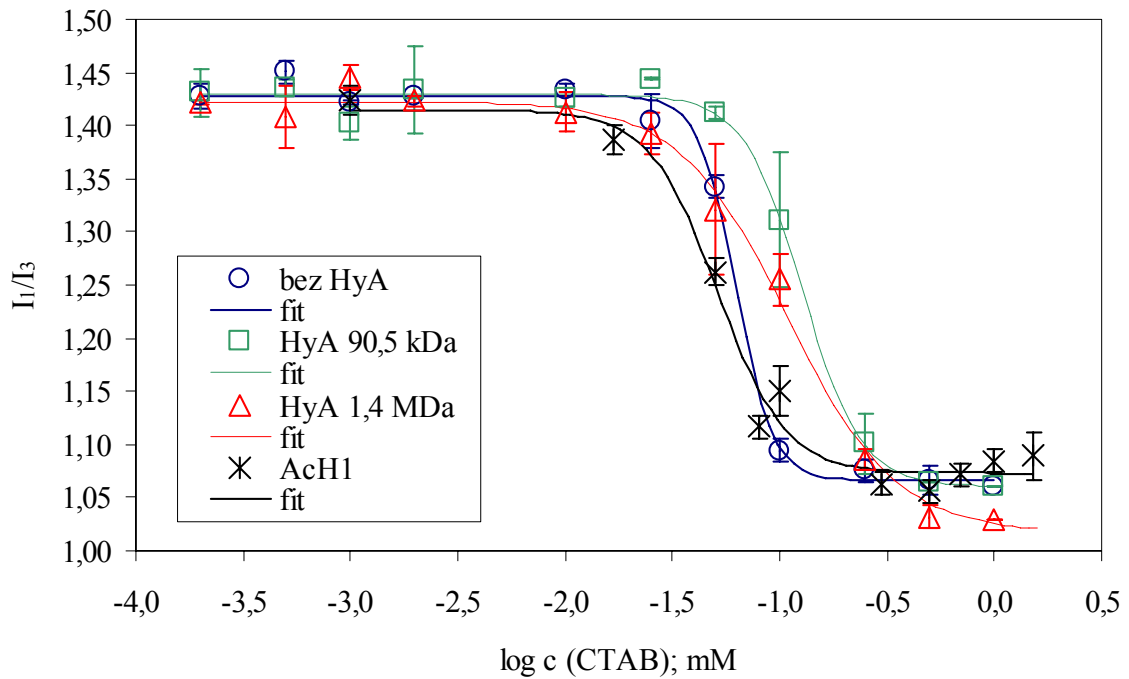
Obr. 23: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu CTAT

Obr. 21 znázorňuje závislost polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu CTAT. Jak je patrné z grafu a z hodnot Δx (viz. Tab 4 v příloze 1) křivky pro vzorek bez obsahu hyaluronanu a s HyA 90,5 kDa mají velmi podobný sklon. Křivky jsou pouze vůči sobě posunuty v ose polaritního indexu. Rozdíl mezi maximálními hodnotami polaritního indexu činí 0,08, a rozdíl mezi minimálními hodnotami polaritního indexu činí 0,05 (viz. Tab 4 v příloze 1). Hodnota CMC se v přítomnosti HyA 90,5 kDa mírně zvyšuje. Křivka příslušející vzorku s obsahem HyA 1,4 MDa je narozdíl od toho výrazně posunuta k vyšší hodnotě CMC a od zbývajících křivek se liší také sklonem, který je pozvolnější. Hodnoty jejího maximálního a minimálního polaritního indexu se pohybují ve stejném rozmezí jako pro samotný tenzid ve fyziologickém roztoku.

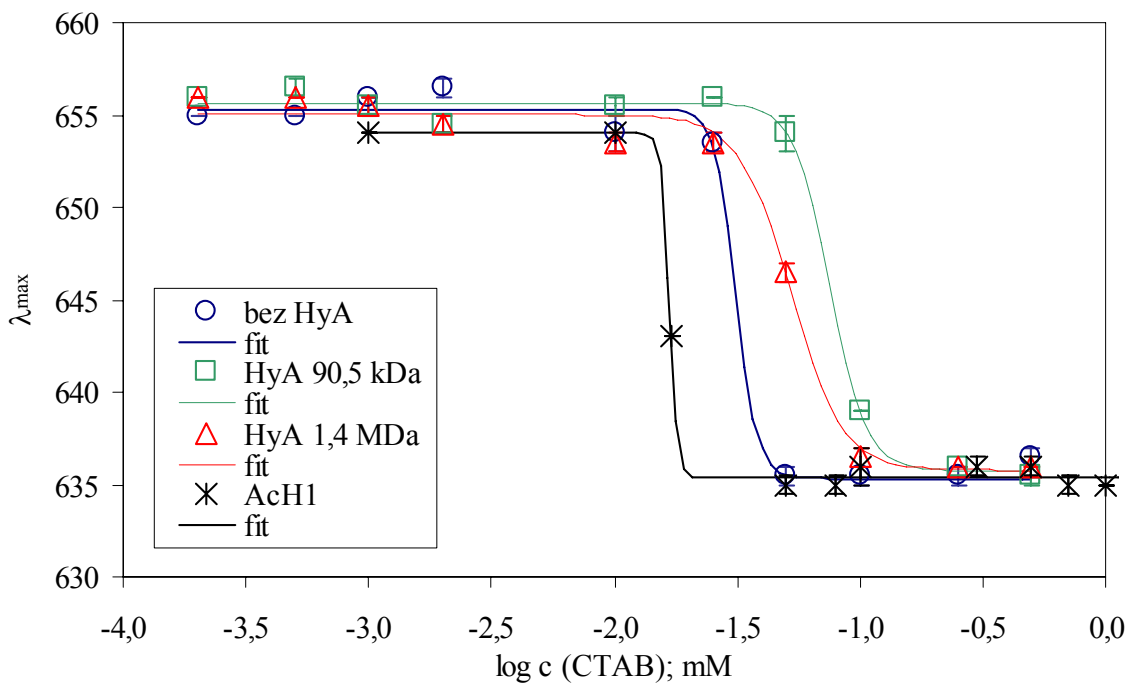
Obr. 22 zobrazuje závislosti posunu emisního maxima nilské červeně na koncentraci tenzidu. Jak je vidět na grafu oba vzorky s obsahem hyaluronanu vykazují vyšší CMC, což je pravděpodobně zapříčiněno interakcí hyaluronanu a tenzidu. Vývoj polarity se však poněkud liší od chování stanoveného pyrenem. Zde totiž naopak vykazuje pozvolnější pokles vzorek s obsahem HyA 90,5 kDa a vzorek s HyA 1,4 MDa klesá nejostřeji, což potvrzují hodnoty parametru Δx (viz. Tab 5 v příloze 2). To může způsobovat poněkud „exotický“ protiont u tohoto tenzidu, který je také jedním z důvodů, proč byl pro podrobnější měření vybrán totožný tenzid ale s bromidovým protiontem.

Obr. 23 znázorňuje závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace tenzidu. Zde jsou výsledky dosažené pomocí vyhodnocení na základě posunu maxima a intenzity fluorescence nilské červeně totožné. Přídavek hyaluronanu vede ke zvýšení CMC.

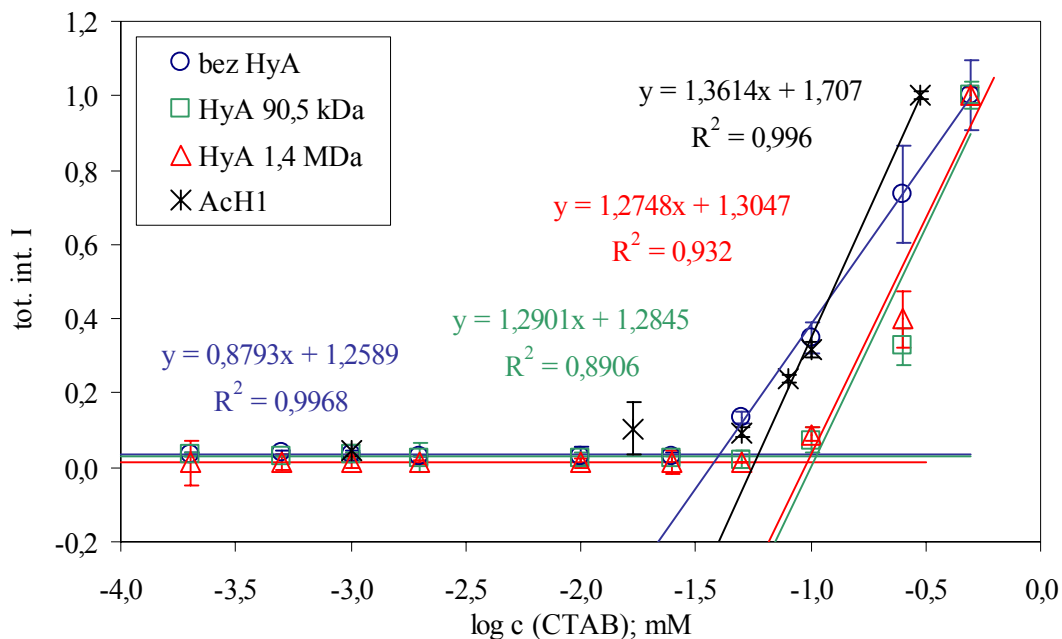
4.5 CTAB



Obr. 24: Závislost poměru I_1/I_3 emisních maxim pyrenu na logaritmu koncentrace tenzidu CTAB



Obr. 25: Posun emisního maxima nilské červeně v závislosti na koncentraci tenzidu CTAB



Obr. 26: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozmezí od 610 nm do 700 nm na logaritmu koncentrace tenzidu CTAB

Obr. 24 zobrazuje závislost polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu. Z grafu je patrné, že hodnoty polaritního indexu u všech vzorků se pohybují ve stejném rozmezí až na vzorek s HyA 1,4 MDa, jehož minimální hodnota polaritního indexu se liší od ostatních křivek cca o 0,1 bodu, tato křivka má také největší sklon. Nejostřejší sklon má v tomto případě závislost příslušející vzorku bez obsahu hyaluronanu a dále pak sklon křivek roste s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. Oba vzorky obsahující nativní hyaluronan pak dosahují v rámci chyby stejné hodnoty CMC, tato je vyšší než pro vzorek bez hyaluronanu. Závislost naměřená pro hydrofobizovaný derivát hyaluronanu AcH1 není na grafu zobrazena celá, protože za účelem stanovení CMC byla použita pouze část křivky zobrazující první zlom, celá závislost bude diskutována v následujících kapitolách. Hodnota CMC pro tento vzorek se jen mírně liší od hodnoty pro vzorek bez obsahu hyaluronanu.

Obr. 25 zobrazuje závislosti posunu emisního maxima nilské červeně na koncentraci tenzidu. Z grafu je patrné, že hodnota CMC je v případě vzorků s obsahem nativního hyaluronanu vyšší než pro samotný tenzid, zatímco v případě hydrofobizovaného derivátu je tomu naopak. CMC je nižší než u vzorku bez hyaluronanu. Z parametrů proložení dat Δx (viz. Tab 5 v příloze 2) je dále vidět, že nejstrmější pokles vykazuje křivka pro vzorek tenzidu ve fyziologickém roztoku, velmi podobným sklon má také křivka pro AcH1 a dále pak sklon křivky roste s rostoucí molekulovou hmotností nativního hyaluronanu.

Obr. 26 zobrazuje závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace. Z grafu je patrné, že vzorek bez obsahu hyaluronanu má nejnižší CMC. Pro oba vzorky výsledky opět ukazují velmi podobnou hodnotu CMC, která je vyšší než pro vzorek bez obsahu hyaluronanu, což koresponduje s výsledky získanými pomocí pyrenu. Hydrofobizovaný derivát se v tomto případě svou CMC řadí mezi vzorek bez hyaluronanu a vzorky hyaluronan obsahující. Zde však na rozdíl od pyrenových dat dochází k posunu jeho CMC k vyšším hodnotám ve srovnání se samotným tenzidem ve fyziologickém roztoku.

Tab 2: Shrnutí naměřených CMC

tenzid	metoda	bez HyA	HyA 90,5 kDa	HyA 1,4 MDa	AcH1
Tween 20	pyren	0,048 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,002	
	NR max	0,035 ± 0,002	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,000	
	NR intenzita	0,027 ± 0,008	0,051 ± 0,002	0,044 ± 0,001	
SDS	pyren	1,040 ± 0,010	0,740 ± 0,000	0,800 ± 0,030	
	NR max	0,700 ± 0,010	0,290 ± 0,020	0,250 ± 0,040	
	NR intenzita	0,840 ± 0,020	0,700 ± 0,040	0,950 ± 0,020	
BETADET	pyren	0,140 ± 0,010	0,100 ± 0,010	0,100 ± 0,000	
	NR max	0,080 ± 0,010	0,060 ± 0,000	0,050 ± 0,010	
	NR intenzita	0,140 ± 0,010	0,240 ± 0,040	0,260 ± 0,020	
CTAT	pyren	0,056 ± 0,001	0,072 ± 0,000	0,150 ± 0,050	
	NR max	0,043 ± 0,000	0,140 ± 0,010	0,080 ± 0,000	
	NR intenzita	0,059 ± 0,001	0,120 ± 0,010	0,090 ± 0,010	
CTAB	pyren	0,062 ± 0,002	0,120 ± 0,020	0,110 ± 0,020	0,050 ± 0,010
	NR max	0,030 ± 0,003	0,076 ± 0,003	0,058 ± 0,002	0,020 ± 0,010
	NR intenzita	0,040 ± 0,000	0,107 ± 0,001	0,085 ± 0,020	0,060 ± 0,010

Tab 2. shrnuje naměřené hodnoty CMC pro jednotlivé systémy. V případě neionogenního tenzidu Tween 20 se kritická micelární koncentrace stanovená pomocí pyrenu a pomocí posunu maxima nilské červeně snižuje a pro oba použité druhy hyaluronanu má stejnou hodnotu. Zajímavé je, že hodnoty stanovené pomocí posunu maxima jsou řádově nižší než hodnoty získané z pyrenových dat. Samostatným důvodem k zamyšlení je dále fakt, že hodnoty CMC stanovené na základě vzrůstu intenzity fluorescence mají naprosto opačný trend. CMC s přidavkem hyaluronanu roste. Tento rozpor je z hlediska rozdílů ve fotofyzice jednotlivých sond diskutován v kapitole 4.1. Společnou vlastností zůstává jediné fakt, že CMC vzorků obsahujících hyaluronan je pro obě molekulové hmotnosti podobná, což by znamenalo, že molární hmotnost molekuly hyaluronanu nemá na interakci vliv.

Jako zástupce anionaktivních tenzidů byl zvolen dodecylsírán sodný. U toho typu tenzidu byla předpokládána žádná nebo pouze minimální interakce. Jak je vidět z hodnot CMC přidavek hyaluronanu snižuje CMC, jedinou výjimkou je stanovení pomocí intenzity fluorescence nilské červeně, kde vyšla u vzorku obsahujícího 1,4 MDa vyšší CMC než pro vzorek bez hyaluronanu. Pokud se jedná o hodnoty získané pomocí měření s pyrenem a pomocí posunu maxima nilské červeně, CMC vzorků s oběma typy hyaluronanu je srovnatelná, opět se tedy naskytá domněnka, že molekulová hmotnost polyaniontu nemá vliv.

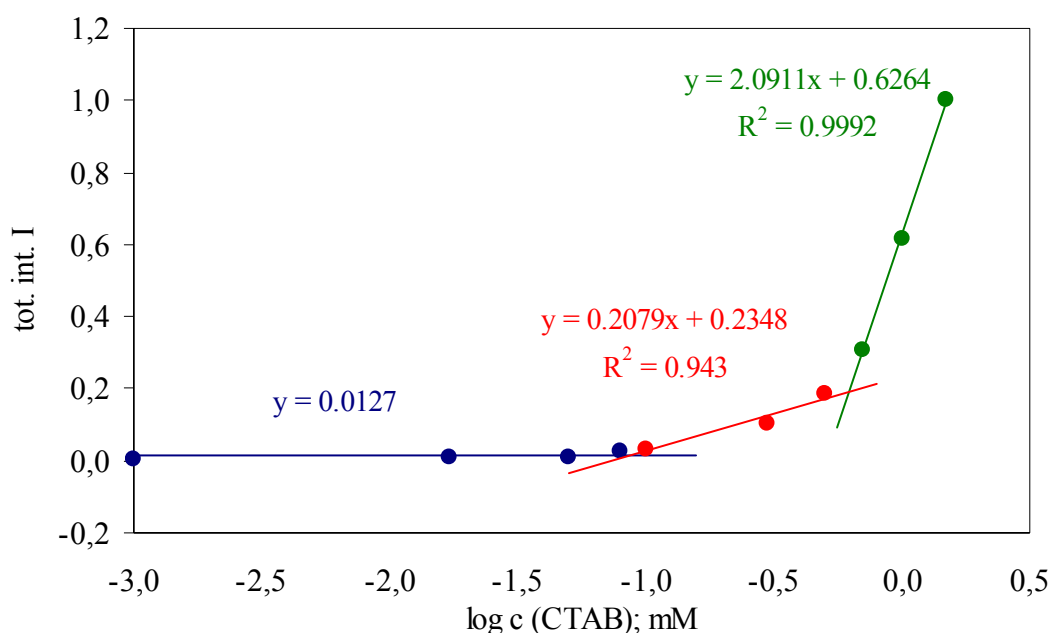
Dále je zde zajímavý tenzid, který se svou strukturou řadí mezi aminokyseliny, jeho interakce s hyaluronanem, je ale jak je vidět z hodnot CMC, minimální. Naměřené hodnoty jsou totiž velmi podobné a u některých vzorků se v rámci chyby kryjí. CMC se tedy s přidavkem hyaluronanu nemění.

Nejsilnější interakce byly předpokládány u kationaktivních tenzidů. Jako první zástupce byl vybrán cetyltrimethylammonium tosylát. Naměřené hodnoty CMC ukazují na nárůst CMC s přidavkem hyaluronanu, což by indikovalo interakci, která je v tomto případě logická a předpokládaná. Avšak tento tenzid má poněkud nezvyklý protiiont a proto byl pro ověření a bližší prozkoumání zvolen odpovídající tenzid s bromidovým protiiontem (CTAB). Jedním z

hlavních důvodů pro volbu CTAB je také fakt, že je jako jeden z mála doporučován pro aplikace spojené s cílenými nosiči léčiva. U tohoto tenzidu byl také proveden doplňující experiment s hydrofobně modifikovaným hyaluronanem. Jak je vidět z výsledků uvedených v tabulce v případě přidavku nativního hyaluronanu dochází opět ke zvýšení CMC, což koresponduje s výsledky získanými pro CTAT. Dále by se také dalo opět konstatovat, že molekulová hmotnost hyaluronanu má pouze minimální vliv na posun CMC, protože hodnoty u obou použitých typů hyaluronanu o různých velikostech molekuly se liší jen velmi málo. Zajímavé výsledky však přinesl hydrofobně modifikovaný hyaluronan u kterého byl díky navázaným alkylovým řetězcům předpoklad silnější interakce s tenzidem, protože by se mohl chovat částečně jako kosurfaktant, což by zároveň s elektrostatickou silou podpořilo interakci. Hodnoty CMC pro tento typ derivátu se však nijak zvlášť neliší od hodnot naměřených pro samotný tenzid ve fyziologickém roztoku.

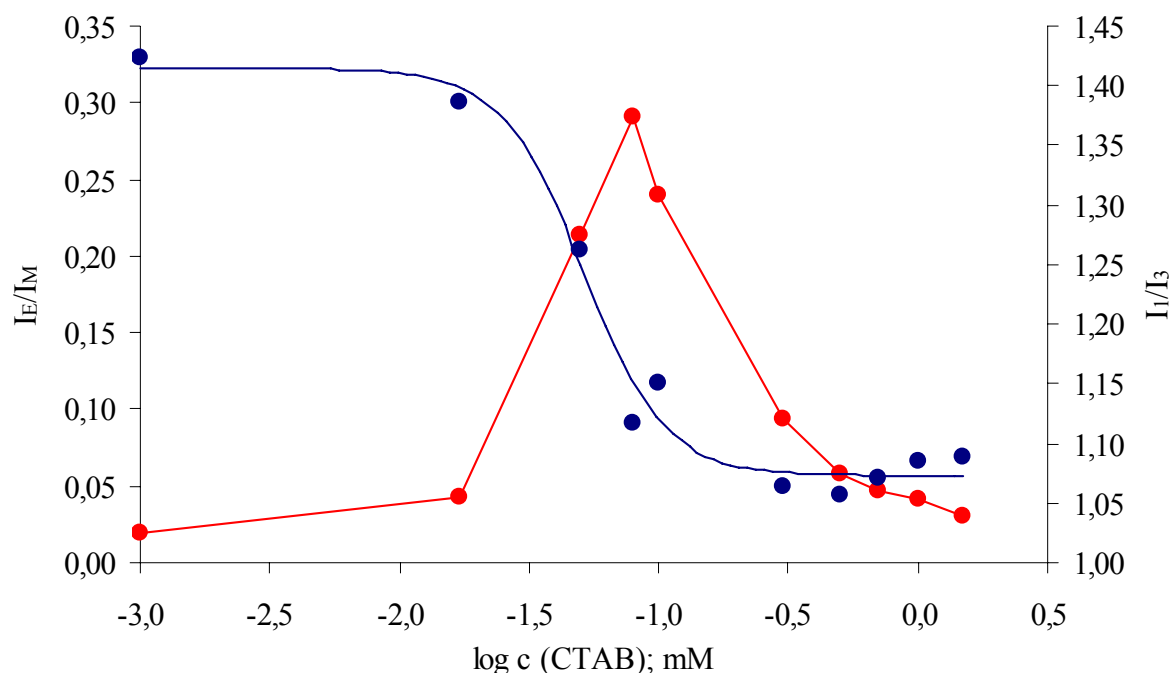
4.5.1 CTAB s přidavkem hydrofobně modifikovaného derivátu

Velmi zajímavá je závislost velikosti totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace naměřená pro tenzid CTAB s přidavkem 0,1 % hm. hydrofobně modifikovaného derivátu hyaluronanu AcH1 (Obr. 27). Tato závislost totiž vykazuje dva zlomy, čímž se liší od křivek naměřených pro vzorky s obsahem nativního hyaluronanu, na kterých se objevoval pouze jeden zlom. Toto indikuje jiný typ interakce, což je pro hydrofobizovaný derivát pochopitelné. Za účelem určení CMC pro porovnání s ostatními vzorky byl použit první zlom na křivce, který indikuje vznik prvních agregátů. Tyto jsou s největší pravděpodobností tvořeny interagujícími molekulami hyaluronanu a tenzidu. Druhý zlom na křivce může znamenat vytvoření zcela odlišného typu agregátů, a je pravděpodobné, že za touto koncentrací je v roztoku dostatek molekul tenzidu, aby byly schopny tvořit volné micely a signál z těchto volných micel pak překryje signál sondy z agregátů CTAB-AcH1.



Obr. 27: Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace CTAB pro vzorek s obsahem hydrofobně modifikovaného derivátu hyaluronanu AcH1

4.5.2 Excimer v systémech CTAB-HyA

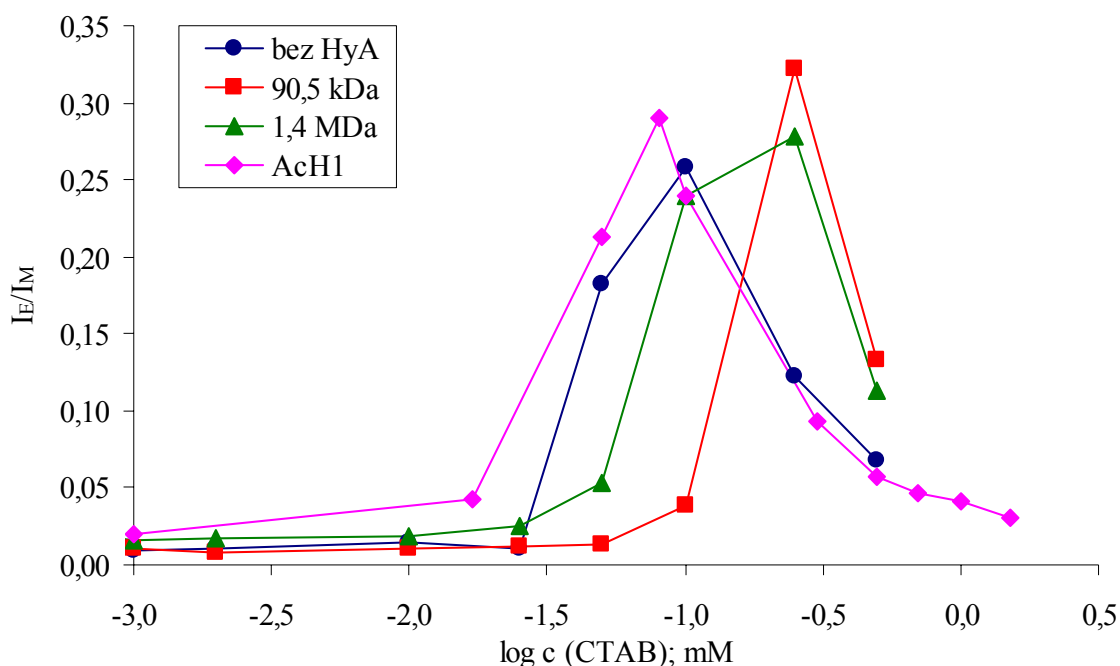


Obr. 28: Srovnání koncentračních závislostí I_E/I_M a polaritního indexu systému CTAB/ACh1/fyziologický roztok.

Dalším sledovaným parametrem při měření koncentračních řad CTAB s pyrenem je poměr emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru. Excimer je excitovaný dimer, tvořený dvěma molekulami pyrenu, z nichž jedna je v excitovaném a druhá v základním stavu. Obecně vzniká při vysokých koncentracích sondy v daném prostředí. Přítomnost excimeru se ve fluorescenčním spektru projevuje poklesem intenzity fluorescence monomerního pyrenu a zároveň vznikem vibračně nerozlišeného emisního pásu při vyšších vlnových délkách, který je obvykle lokalizovaný ~470 nm. Bathochromní posun je způsoben poklesem energie v důsledku interakce excitované molekuly pyrenu s neexcitovaným pyrenem. Intenzita tohoto emisního pásu je přímo úměrná difúznímu koeficientu a tedy nepřímo úměrná mikroviskozitě v okolí fluorescenční sondy. Běžně se intenzita fluorescence excimeru I_E vyjadřuje jako poměr této intenzity ku intenzitě emisního pásu monomeru I_M (373 nm).

V případě stanovení agregačního chování tenzidu pomocí pyrenu se používá velmi malé množství sondy (řádově 10^{-6} M), které není dostatečné pro tvorbu excimeru v čistých rozpouštědlech. V naměřených fluorescenčních spektrech pro koncentrační řady tenzidů je však pás excimeru přítomen a ze závislosti polaritního indexu vyplývá, že dosahuje maximální intenzity v okolí CMC (viz. Obr. 28). To může být způsobeno lokálním zakoncentrováním pyrenu v hydrofobních doménách při nízké koncentraci micel, nebo ve vznikajících pre-micelárních agregátech. Po dosažení CMC a vzrůstu koncentrace micel excimer opět vymizí, což znamená rovnoměrnější distribuci sondy v systému.

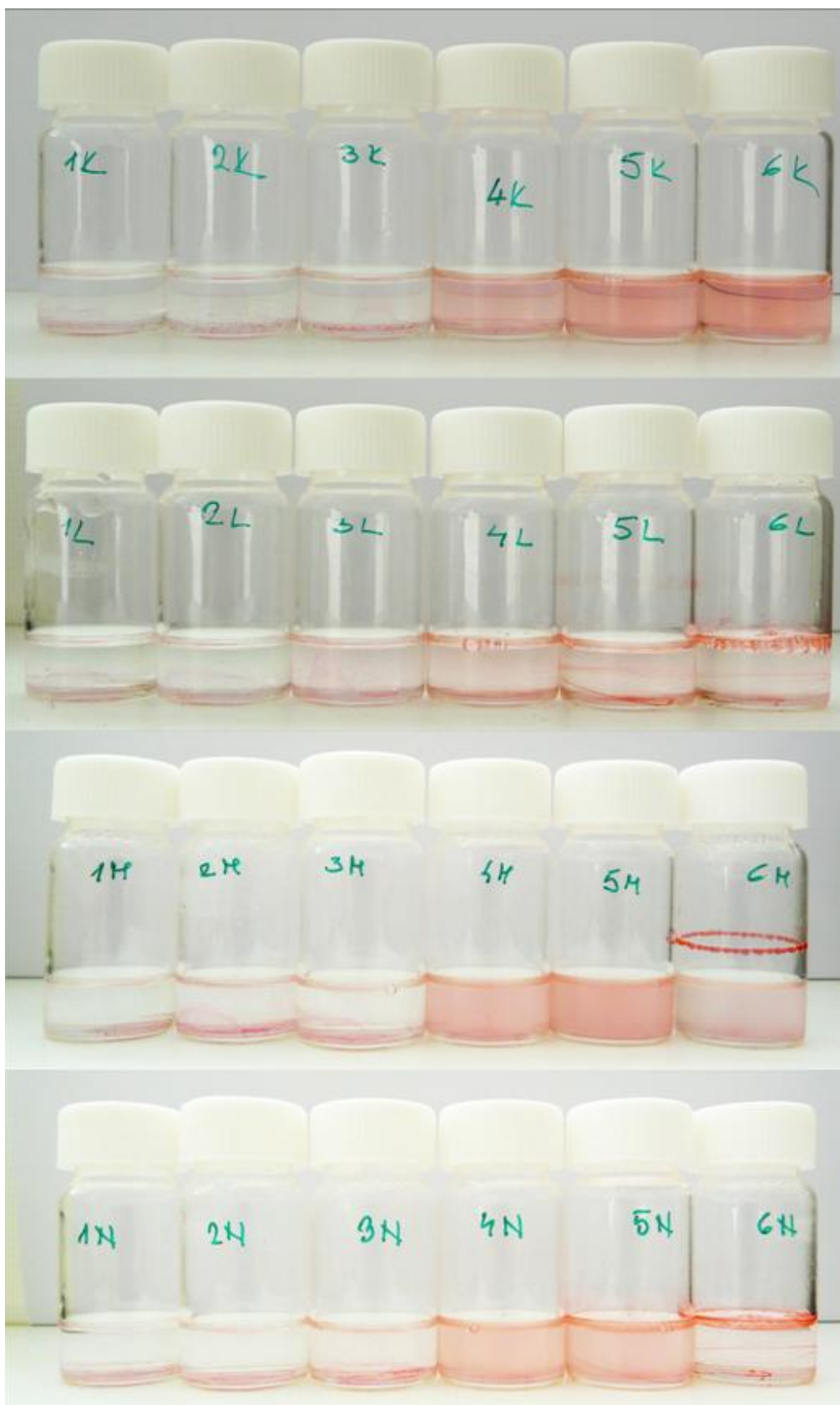
Obr. 29 zobrazuje vliv přítomnosti hyaluronanu na koncentrační závislost I_E/I_M pro tenzid CTAB. Lokalizace maxima závislosti excimeru odpovídá CMC, čímž potvrzuje výsledky získané pomocí ostatních měření.



Obr. 29: Závislosti I_E/I_M na logaritmu koncentrace CTAB ve fyziologickém roztoku a za přítomnosti nativního a modifikovaného hyaluroanu.

4.5.3 Solubilizační experimenty se súdánovou červení

Pro zjištění agregačního chování a schopnosti systémů solubilizovat byly připraveny vzorky s různou koncentrací tenzidů a zároveň s konstantní koncentrací příslušného hyaluronanu. Tyto vzorky byly přidány k hydrofobnímu barvivo (súdánová červeně) a bylo sledováno, jak jsou vzorky schopny barvivo rozpustit. Pro tyto vzorky byly připraveny také blanky s úmyslem změřit a porovnat absorbanci ve vzorku obsahujících pouze tenzid a příslušném vzorku s obsahem hyaluronanu se stejnou koncentrací tenzidu. Zjištění absorbance však nebylo možné, protože při vyšších koncentracích tenzidu se vyskytuje zákal, který však není stejný ve vzorku a v blanku. Zjištění absorbance tedy nebylo možné. Faktem však zůstává, že pokud nebyl zákal ve vzorku a blanku stejný, potom přidání hydrofobního barviva a potažmo také jakékoli jiné hydrofobní látky systém ovlivňuje. S největší pravděpodobností je hydrofobní molekula schopna indukovat tvorbu agregátů při nižší koncentraci tenzidu. Tento fakt, je důležité mít na paměti pokud se do vzorku přidává jakákoli hydrofobní látka, tedy samozřejmě i hydrofobní fluorescenční sonda. To potažmo znamená, že pomocí fluorescenční spektroskopie charakterizujeme systém se solubilizovanou hydrofobní látkou a tudíž se nedá předpokládat, že tento systém by měl bez rozpuštěné hydrofobní látky stejné vlastnosti. Avšak s ohledem na účel zkoumání těchto systémů jako nosičů hydrofobního léčiva jsou informace o „prázdném“ systému nepotřebné a naopak agregáty se solubilizovanou sondou jsou přesnějším modelem.



Obr. 30: Fotografie solubilizačních experimentů. Řada K obsahuje pouze tenzid CTAB ve fyziologickém roztoku, řada L obsahuje HyA 90,5 kDa, řada M obsahuje HyA 1,4 MDa a řada N obsahuje hydrofobizovaný derivát Ach1.

Výsledky které jsou zobrazeny na Obr. 30 však stále vypovídají o schopnosti systému solubilizovat hydrofobní barvivo. První tři vzorky v řadě barvivo nerozpouštějí, koncentrace tenzidu v těchto vzorcích je pod CMC. Změna nastává u vzorku 4, kde je již súdánová červeň rozpuštěna, stejně jako ve vzorku 5. Koncentrace tenzidu v těchto vzorcích již přesáhla CMC. Při nejvyšší koncentraci tenzidu (vzorek č.6) 2 mM CTAB, což odpovídá čtyřicetinásobku CMC tenzidu ve fyziologickém roztoku, dochází ke vzniku sraženiny, ve které je zadržena většina rozpuštěného barviva. Pomocí těchto vzorků byla zvolena koncentrace tenzidu, při které bylo měřeno agregační číslo. Jako nejvhodnější byla zvolena koncentrace 0,5 mM (vzorek 4), protože při této koncentraci je systém již schopen solubilizovat hydrofobní látku, ale koncentrace není dost vysoká, aby se agregáty tenzidu s polyelektrolytem vysrážely. Tato koncentrace zhruba odpovídá desetinásobku CMC tenzidu ve fyziologickém roztoku.

4.5.4 Agregační číslo

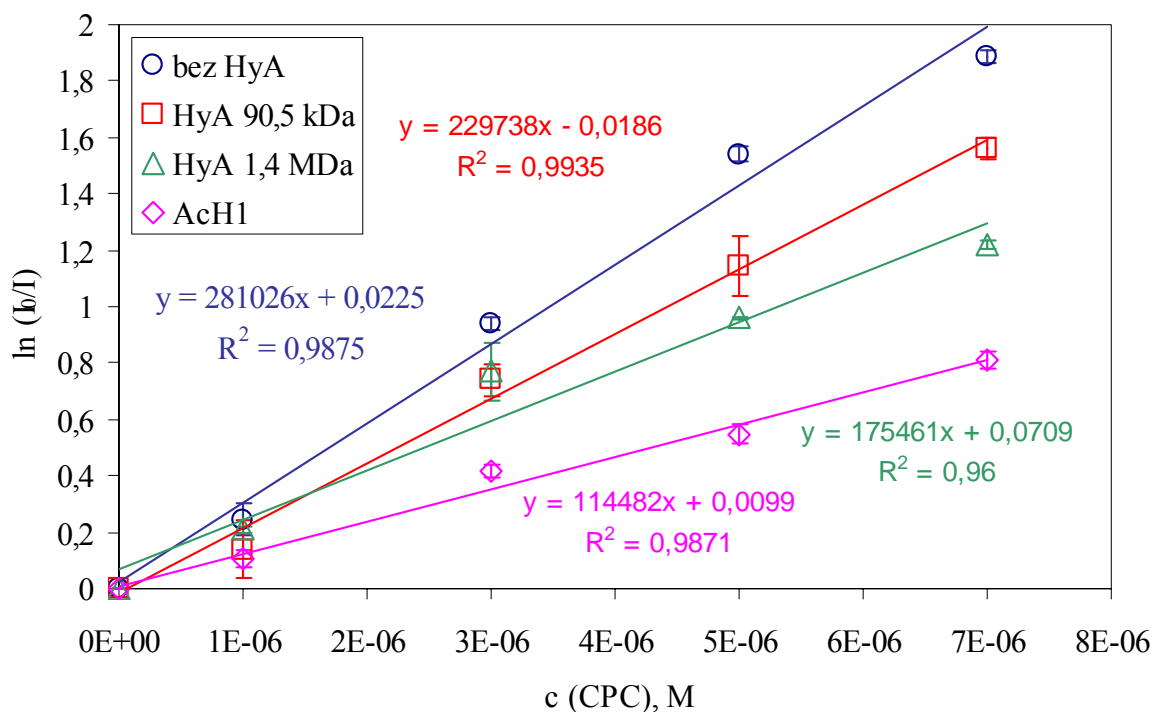
Za pomoci zhášení bylo měřeno agregační číslo u vybraných systémů obsahujících 0,5 mM CTAB a 0,1 % hm. hyaluronanu. Použity byly oba typy nativního hyaluronanu a také hydrofobizovaný derivát. Agregační číslo bylo také stanoveno pro samotný tenzid ve fyziologickém roztoku. Jako zhášec zde byl použit kosurfaktant CPC a jako zhášená molekula fluorescenční sonda pyren, solubilizovaná uvnitř agregátů. Hodnoty naměřených agregačních čísel jsou uvedeny v Tab 3. K výpočtu agregačního čísla je nutná hodnota CMC (viz. kapitola 2.4.4), která se však může lišit a to nejen pokud je stanovena různými metodami (fluorescence, povrchové napětí), ale i v rámci jedné metody (použití různých fluorescenčních sond – pyren, nilská červeň) a dokonce také při použití jediného systému (stanovení na základě intenzity fluorescence nebo posunu maxima nilské červeně). Důležité tedy je uvědomit si, jaké informace může zvolená sonda o systému přinést. Pro výpočet hodnot v Tab 3 byly použity CMC systémů stanovené pomocí intenzity fluorescence nilské červeně a to s ohledem na fotofyzikální vlastnosti této sondy. Intenzita fluorescence nilské červeně totiž vzroste pouze v případě pokud se sonda vyskytuje v hydrofobním prostředí, což znamená, že v systému jsou při dané koncentraci přítomny agregáty, jejichž kvalita se za touto hranicí nemění. V úvahu musí být brán také fakt, že s ohledem na stabilitu systému, byla vybrána poměrně nízká koncentrace tenzidu, aby se zamezilo fázové separaci. Z toho plyne, že rozdíl koncentrace tenzidu a CMC, který je k výpočtu potřeba, je nízký, což může být zdrojem komplikací a nepřesností, zvláště proto, že nepatrná změna v CMC použité pro výpočet se znatelně projeví na hodnotě agregačního čísla.

Jak je vidět z výsledných hodnot (Tab 3) nejvyšší agregační číslo má tenzid ve fyziologickém roztoku. Přídavek nativního hyaluronanu agregační číslo snižuje, přičemž pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu, jsou hodnoty velmi podobné. Samotná molekulová hmotnost použitého hyaluronanu má tedy na změnu agregačního čísla jen minimální vliv. K dalšímu snížení agregačního čísla pak dochází přidáním hydrofobně modifikovaného derivátu hyaluronanu. Otázkou však zůstává, zda má tato změna agregačního čísla vliv na velikost micel a pokud ano, tak jaký. V každém případě však hodnoty polaritního indexu naměřené s pyrenem prokazují, že hydrofobicita jádra výsledných agregátů, je přibližně stejná, což by indikovalo vznik zhruba stejně kompaktních agregátů.

Tab 3: Naměřená agregační čísla pro systémy obsahující 0,5 mM CTAB a 0,1 % hm. hyaluronanu

	N_{agg}
bez HyA	129 ± 16
HyA 90,5 kDa	90 ± 6
Hya 1,4 MDa	73 ± 6
AcH1	50 ± 4

Obr. 31 znázorňuje závislost přirozeného logaritmu I_0/I na koncentraci zhášeče. Zároveň jsou na grafu zobrazeny lineární přímky, kterými jsou data proložena a k nim příslušející rovnice a hodnoty spolehlivosti. Na první pohled se však ze sklonu přímek nedá usuzovat o agregačním čísle, protože pro jeho výpočet se používá hodnota CMC, která se pro jednotlivé systémy může lišit.



Obr. 31: Závislost přirozeného logaritmu I_0/I na koncentraci zhášeče.

5 ZÁVĚR

Byla provedena rešerše na téma využití fluorescenční spektroskopie ve výzkumu systémů polyanion–tenzid–fyziologický roztok a polyanion–aminokyselina–fyziologický roztok. Fluorescenční spektroskopie se ukázala být vhodnou metodou pro charakterizaci interakcí a agregačního chování těchto systémů. Pro stanovení kritické micelární koncentrace systémů byly jako nejvhodnější fluorescenční sondy zvoleny pyren a nilská červeň. Dále byl pro bližší zkoumání vybrán systém kationaktivní tenzid CTAB–hyaluronan. Pro tento systém byly provedeny doplňující pokusy v podobě solubilizačních experimentů s hydrofobním barvivem súdánovou červí a měření agregačního čísla pomocí zhášení fluorescence.

Jako polyanion byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové s různými molárními hmotnostmi, dále byly vybrány tenzidy Tween 20 (neionogenní), SDS (anionaktivní), CTAT, CTAB (kationaktivní) a BETADET THC 2 (amfoterní) jako zástupce ze skupiny alkylovaných betainů, spojujících strukturu tenzidu a aminokyseliny v jedné molekule. Jako jednoduchý model fyziologického roztoku zde sloužil 0,15 M roztok NaCl. Výsledky naměřené s pyrenem pro systém Tween 20–hyaluronan ukazují, že přidavek hyaluronanu do systému snižuje CMC, což potvrzují i výsledky získané vyhodnocením posunu maxima nilské červeně. V rozporu s tímto zjištěním jsou výsledky vyhodnocené z nárůstu intenzity fluorescence nilské červeně, realizované jako integrál emisního spektra. Tyto totiž indikují posun CMC naopak k vyšším hodnotám. Tento rozpor může být způsoben samotnou podstatou měření s nilskou červí a je diskutován v příslušné kapitole. V každém případě však získané výsledky naznačují, že v systému dochází k interakci, která však zřejmě není elektrostatické povahy, protože Tween 20 se řadí do skupiny neionogenních tenzidů. Tween 20 však ve své struktuře obsahuje několik OH skupin, které jsou schopny tvořit vodíkové můstky s vodou a proto je pravděpodobné, že jsou schopné přes vodíkové popřípadě vodné můstky interagovat s hyaluronanem.

Dalším z použitých tenzidů byl alkylderivát trimethylglycinu spojující ve své molekule strukturu tenzidu a aminokyseliny BETADET THC 2. Přídavek hyaluronanu do systému obsahujícího tenzid však za daného pH nijak výrazně neovlivnil jeho CMC a dá se předpokládat, že nedochází k žádné výrazné interakci mezi oběma komponentami.

Jako zástupce anioaktivních tenzidů byl zvolen dodecyl sulfát sodný. Přídavek hyaluronanu do systému obsahující tento tenzid způsobuje mírné snížení CMC a tedy hyaluronan zde má stejný efekt jako přídavek nízkomolekulárního elektrolytu. Tyto výsledky korespondují s výsledky analogického měření v literatuře [41].

Největší důraz byl kladen na interakce hyaluronanu a kationaktivních tenzidů, což je logické s ohledem na to, že díky opačným nábojům obou molekul se předpokládá nejsilnější interakce. Z této skupiny byly vybrány dva zástupci lišící se pouze protiontem (CTAT, CTAB). Pro oba tyto tenzidy byl zjištěn nárůst CMC s přidavkem hyaluronanu, což potvrzuje interakci s největší pravděpodobností elektrostatické povahy. Navíc z výsledků je patrné, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá na posun CMC velký vliv, protože hodnoty naměřené pro oba typy hyaluronanu jsou velmi podobné. Pro bližší zkoumání byl pak vybrán tenzid CTAB. Jedním z důvodů pro volbu tohoto tenzidu byl také fakt, že je oficiálně doporučován pro využití v systémech zaměřených na cílené nosiče léčiva. S CTAB byla provedeny doplňující pokusy v podobě solubilizačních experimentů a měření agregačního čísla. Účelem solubilizačních experimentů bylo zjistit schopnost systémů s měnící se koncentrací tenzidu rozpouštět hydrofobní látku (súdánová červeň). Pomocí těchto

experimentů byla zjištěna koncentrace tenzidu (0,5 mM), při které je roztok schopen solubilizovat hydrofobní látku, ale přitom koncentrace tenzidu není dost vysoká na to, aby systém zkolaboval a agregáty se vysrážely, což nastává až cca při čtyřicetinásobku CMC tenzidu. Protože vzorky byly ponechány přes noc na míchačce, sraženina byla usazena na skle nad hladinou roztoku. Pro zajímavost byl proto proveden pokus o vizualizaci sraženiny také se súdánovou červení (viz Obr. 32 a Obr. 33 v příloze 3 a 4). Bylo zjištěno, že se sraženina transformuje na gel, což je v souladu s výsledky, které obdržel *Thalberg a spol.* [21]. Dalšími experimenty bylo měření agregačního čísla pomocí zhášení fluorescence. Jako zhášeč byl použit kosurfaktant CPC a jako zhášená molekula pyren solubilizovaný uvnitř agregátu. Přídavek hyaluronanu (nativního i hydrofobně modifikovaného) snižuje agregační číslo systému, přičemž hodnoty pro nízkomolekulární a vysokomolekulární nativní hyaluronan jsou velmi podobné, což indikuje, že molekulová hmotnost použitého hyaluronanu má na změnu agregačního čísla jen minimální vliv. Nejnižší agregační číslo vykazuje systém s přídavkem hydrofobně modifikovaného derivátu hyaluronanu. Zde je dobré uvědomit si, že hodnoty polaritního indexu pro tyto systémy naměřené s pyrenem prokazují, že hydrofobicita výsledných agregátů je přibližně stejná, což indikuje vznik přibližně stejně kompaktních agregátů. V každém případě výsledky ukázaly, že agregáty jsou nad kritickou agregační koncentrací schopny solubilizovat hydrofobní látku, což je jeden z neodmyslitelných požadavků na nosičové systémy.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Práce tak poskytla širší přehled o vlivu hyaluronanu na agregační chování vybraných tenzidů s ohledem na použití těchto systémů jako nosičových systémů. Zároveň upozornila také na oblasti vhodné pro další a bližší zkoumání, jako je například tvorba excimeru v systémech obsahujících polyanion a tenzid v užším koncentračním rozmezí kolem CMC tenzidu, hydrofobní vlastnosti gelů, vznikajících vysrážením systémů hyaluronan–kationaktivní tenzid, a jejich schopnost nést hydrofobní látku, nebo bližší zkoumání vlastností hydrofobních domén vznikajících agregátů, například pomocí fluorescenčních sond citlivých na mikroviskozitu.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Cowman, K. M., Matsuoka, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s. 791-809
- [2] Hascall, C. V., Laurent, C. T. Dr.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 24. 4. 2007], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [3] Jacoboni, I., Mori, G. et al.: Hyaluronic acid by Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology*, 1999, č. 126, s. 52-58
- [4] Scott, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 24.4.2007], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [5] Lee, J. Y., Spicer, P. A.: Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current opinion in structural biology*, 2000, č. 12, s. 581-586
- [6] Day, A. J., Sheenan, J. K.: Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current opinion in structural biology*, 2001, č. 11, s. 617-622
- [7] Hascall, C. V., Laurent, C. T. Dr.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 30. 4. 2009], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [8] Weigel, P. H.: Bacterial hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30. 4. 2009], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [9] Lebel, L.: Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced drug delivery reviews*, 1991, č. 7, s. 221-235
- [10] Valeur, B.: Molecular Fluorescence: Principles and Applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, 2001. ISBN 3-527-29919-X
- [11] Klán, K. P.: Organická fotochemie. 1. vyd. Brno: *Masarykova univerzita*, 2001. ISBN 80-2102526-3
- [12] Pillai, O., Dhanikula A. B., Panchagnula, R.: Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Current opinion in chemical biology*, 2001, č. 5, s. 439-446
- [13] Petrak, K.: Essential properties of drug-targeting delivery system. *Drug discovery today*, 2005, č. 10, s. 1667-1673
- [14] Prestwich, G. D.: Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2001, [cit. 30. 4. 2009], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [15] Brown, T.: The development of hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, č. 9, s. 253-260
- [16] Cai, S., Xie, Y., Bagby, T., Cohen, M., Forrest, M.: Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan-cisplatin conjugate. *Journal of surgical research*, 2008, č. 147, s. 247-252
- [17] Kafedjiiski, K., Jetli, R., Föger, F., Hoyer, H., Werle, M., Hoffer, M., Schnürch, A.: Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. *International journal of pharmaceuticals*, 2007, č. 343, s. 48-58
- [18] Esposito, E., Menegatti, E., Cortesi, R.: Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *International journal of pharmaceuticals*, 2005, č. 288, s. 35-49
- [19] Lebel, L.: Clearance of hyaluronan from circulation. *Advanced drug delivery reviews*, 1991, č. 7, s. 221-235

- [20] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478-1483
- [21] Thalberg, K., Lindman, B.: Gel formation in aqueous system of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*, 1991, č. 7, s. 277-283
- [22] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 6004-6011
- [23] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *Journal of Physical Chemistry*, 1990, č. 94, s. 4289-4295
- [24] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370-3376
- [25] Thalberg, K., Stam, J. V., Lindblad, C., Almgren, M., Lindman, B.: Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 8975-8982
- [26] Degreve, L., Caliri, A.: Geometric constraints in polymer chains: analysis on the pearl-necklace model by monte carlo simulation. *Journal of molecular structure*, 1995, č. 335, s. 123-127
- [27] De, S., Girigoswami, A., Das, S.: Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 285, s. 562-573
- [28] Miguel, M., Burrows, H., Formosinho, S., Lindman, B.: Fluorescence studies of polymer-surfactant association. *Journal of molecular structure*, 2001, č. 563-564, s. 89-98
- [29] Bordbar, A., Kafrani, A.: Binding and fluorescence study on interaction of human serum albumin (HSA) with cetylpyridinium chloride (CPC). *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2007, č. 55, s. 84-89
- [30] Zhou, W., Zhu, L.: Solubilization of pyrene by anionic-nonionic mixed surfactants. *Journal of hazardous materials*, 2004, č. B109, s. 213-220
- [31] Honda, Ch., Kamizono, H., Matsumoto, K., Endo, K.: Studies on bovine serum albumin-sodium dodecyl sulphate complexes using pyrene fluorescence probe and 5-doxylstearic acid spin probe. *Journal of colloid and interface science*, 2004, č. 278, s. 310-317
- [32] Honda, Ch., Katsumata, Y., Yasutoma, R., Yamazaki, S., Ishii, S., Matsuoka, K., Endo, K.: Temperature dependence of pyrene fluorescence spectra in aqueous solutions of CnEm (C14E7, C16E7 and C16E6) nonionic surfactant micelles. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 2006, č. 182, s. 151-157
- [33] Sharma, K., Rodgers, Ch., Palepu, R., Rakshit, A. K.: Studies of mixed surfactant solutions of cationic dimeric (gemini) surfactant with nonionic surfactant C12E6 in aqueous medium. *Journal of colloid and interface science*, 2003, č. 268, s. 482-488
- [34] Miranda, J., Cacita, N., Okano, L. T.: Evaluation of amylopectin clusters and their interaction with nonionic surfactants. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2007, č. 60, s. 19-27

- [35] Yan, P., Jin, Ch., Wang, Ch., Ye, J., Xiao, J.: Effect of surfactant head group size on polyelectrolyte-surfactant interaction: steady-state and time-resolved fluorescence study. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 282, s. 188-192
- [36] Olea, A. F., Gamboa, C.: Solubilization of phenols in surfactant/ polyelectrolyte systems. *Journal of colloid and interface science*, 2003, č. 268, s. 63-67
- [37] Daban, J., Samsó, M., Bartolomé, S.: Use of Nile red as a fluorescent probe for the study of the hydrophobic properties of protein-sodium dodecyl sulphate complexes in solution. *Analytical biochemistry*, 1991, č. 199, s. 162-168
- [38] Hungerford, G., Baptista, A., Coutinho, P., Castanheira, E., Oliveira, M.: Interaction of DODAB with neutral phospholipids and cholesterol studied using fluorescence anisotropy. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 2006, č. 181, s. 99-105
- [39] Lin, C., Zhao, J., Jiang, R.: Nile red probing for the micelle-to-micelle transition of AOT in aqueous solution. *Chemical physics letters*, 2008, č. 464, s. 77-81
- [40] Stuart, M., Boekema, E.: Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent system. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, č. 1768, s. 2681-2689
- [41] Yin, D., Yang, W., Ge, Z., Yuan, Y.: A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interaction in aqueous media. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s. 1201-1206
- [42] Nizri, Q., Magdassi, S.: Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer-surfactant interactions. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 291, s. 169-174
- [43] Infelta, P.: Fluorescence quenching in micellar solutions and its application to the determination of aggregation numbers. *Chemical physics letters*, 1979, č. 61, s. 88-91
- [44] Turro, N. J., Yekta, A.: Luminiscent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregation number of micelles. *Journal of the american chemical society*, 1978, č. 100, s. 5951-5952
- [45] Rosen, J. M.: Surfactants and interfacial phenomena. 3. vyd. Hoboken, New Jersey: *John Wiley 2004 & Sons, Inc.*, 2004. ISBN 0-471-47818-0
- [46] Adamczyk, Z., Para, G., Warszyński, P.: Influence of Ionic Strength on Surface Tension of Cetyltrimethylammonium Bromide. *Langmuir*, 1999, č. 15, s. 8383-8387
- [47] Bakshi, M. S., Sharma, P., Kaur, G., Sachar, S., Banipal, T. S.: Synergistic mixing of L64 with various surfactants of identical hydrophobicity under the effect of temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochem . Eng. Aspects*, 2006, č. 278, s. 218-228
- [48] Fan, Y., Cao, M., Yuan, G., Wang, Y., Yan, H., Han, C. C.: Aggregation behavior in mixed system of double-chained anionic surfactant with single-chained nonionic surfactant in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, č. 299, s. 928-937
- [49] Xu, G., Chen, A., Yang, Y., Yuan, S., Zheng, L.: Aggregation behavior of hydrophobically modified polyacrylate in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochem . Eng. Aspects*, 2006, č. 256, s. 69-75

- [50] Schnitzler, F., Sequaris, J.: Sorption properties of hydrophobically modified poly(acrylic acid) as natural organic matter model substances to pyrene. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2005, č. 260, s. 199-128
- [51] Z44 Wolszczak, M., Miller, J.: Characterization of non-ionic surfactant aggregates by fluorimetric techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002, č. 147, s. 45-54
- [52] Pi, Y., Shang, Y., Liu, H. et al.: Salt effect on the interactions between gemini surfactant and oppositely charged polyelectrolyte in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, č. 306, s. 405-410
- [53] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Ruiz, C.C.: On the determination of the critical micelle concentration by the pyren 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, č. 258, s. 116-122
- [54] Ghoneim, N.: Photophysics of Nile red in solution. Steady state spectroscopy. *Spectrochimica Acta*, 2000, č. 56, s. 1003-1010
- [55] Dutta, A., Kamada, K., Ohta, K.: Spectroscopic studies of Nile red in organic solvents and polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1996, č. 93, s. 57-64
- [56] Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition, *Springer* 2006, ISBN 0-387-31278-1

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AcH1	hydrofobizovaný derivát hyaluronanu AcylHex1
AMK	aminokyselina
CMC	kritická micelární koncentrace
HyA	hyaluronan
PAL	povrchově aktivní látka

7.2 Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
[C]	koncentrace micel v roztoku
D	fluoreskující molekula, donor
I	intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedce
I_1	intenzita fluorescence monomeru
I_3	intenzita fluorescence třetího vibračního pásu
I_0	intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášedce
M	mol dm^{-3}
Mon	základní stav molekuly
Mon*	excitovaný stav molekuly
MonMon*	excimer
N_{agg}	agregační číslo
Q	zhášedce
[Q]	koncentrace zhášedce
[S]	koncentrace tenzidu
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
T_2	druhý excitovaný tripletový stav molekuly
λ	vlnová délka

8 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Parametry fitovacích sigmoidních křivek pro pyrenová data
- Příloha 2: Parametry fitovacích sigmoidních křivek pro posun maxima nilské červeně
- Příloha 3: Fotografie vizualizace gelu vzniklého ve vzorku s obsahem 1 mM CTAB a 0,1 % hm. AcH1 ve fyziologickém roztoku
- Příloha 4: Fotografie vizualizace gelu vzniklého ve vzorku s obsahem 25 mM CTAB/0,1 % hm. AcH1 ve fyziologickém roztoku

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1

Tab 4: Parametry fitu pro pyrenová data

tenzid	parametry fitu pro pyrenová data	bez HyA	HyA 90,5 kDa	HyA 1,4 MDa	AcH1
Tween 20	x_0	0,05	0,02	0,01	
	Δx	1,39	1,92	1,83	
	A_1	$1,43 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,01$	
	A_2	$1,04 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$	
	R^2	0,9862	0,9980	0,9957	
SDS	x_0	1,03	0,74	0,80	
	Δx	1,11	1,11	1,20	
	A_1	$1,37 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,01$	
	A_2	$0,90 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,01$	
	R^2	0,9959	0,9969	0,9964	
BETADET	x_0	0,14	0,10	0,10	
	Δx	1,49	1,38	1,62	
	A_1	$1,44 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,01$	
	A_2	$0,91 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,02$	
	R^2	0,9981	0,9988	0,9939	
CTAT	x_0	0,06	0,07	0,14	
	Δx	1,22	1,37	1,83	
	A_1	$1,45 \pm 0,01$	$1,37 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,01$	
	A_2	$1,08 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$	
	R^2	0,9855	0,9980	0,9885	
CTAB	x_0	0,06	0,13	0,11	0,05
	Δx	1,22	1,37	1,83	1,44
	A_1	$1,43 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,02$
	A_2	$1,07 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,01$
	R^2	0,9962	0,9959	0,994	0,9805

9.2 Příloha 2

Tab 5: Parametry fitu pro posun maxima nilské červeně

tenzid	parametry fitu pro posun maxima nilské červeně	bez HyA	HyA 90,5 kDa	HyA 1,4 MDa	AcH1
Tween 20	x_0	0,034	0,003	0,003	
	Δx	1,14	1,89	1,58	
	A_1	656,3	657,5	656,1	
	A_2	630	631,5	631,2	
	R^2	0,9921	0,9937	0,9968	
SDS	x_0	0,70	0,27	0,21	
	Δx	1,14	1,29	1,33	
	A_1	654,8	654,5	652,0	
	A_2	638,7	639,7	639,0	
	R^2	0,9724	0,9987	0,9827	
BETADET	x_0	0,07	0,06	0,05	
	Δx	1,21	1,21	1,34	
	A_1	656,4	655,7	655,0	
	A_2	630,0	630,2	630,0	
	R^2	0,9908	0,9963	0,9933	
CTAT	Δx	0,04	0,10	0,08	
	Δx	1,04	1,24	1,01	
	A_1	655,0	654,7	655,1	
	A_2	636,6	635,9	635,1	
	R^2	0,9980	0,9984	0,9967	
CTAB	Δx	0,06	0,13	0,11	0,05
	Δx	1,01	1,19	1,28	1,04
	A_1	655,0	655,7	655,0	654,0
	A_2	636,5	635,7	635,7	635,4
	R^2	0,9892	0,9967	0,9923	0,9967

9.3 Příloha 3



Obr. 32: Vizualizace gelu vzniklého ve vzorku s obsahem 1 mM CTAB/0,1 % hm. AcH1 ve fyziologickém roztoku

9.4 Příloha 4



Obr. 33: Vizualizace gelu vzniklého ve vzorku s obsahem 25 mM CTAB/0,1 % hm. AcH1 ve fyziologickém roztoku