



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV KONCENTRACE TENZIDOVÉ SLOŽKY A TEPLoty NA INTERAKCE HYALURONANU A KATANIONICKÝCH VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ

INFLUENCE OF CONCENTRATION OF SURFACTANT COMPONENT AND TEMPERATURE ON
INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND KATANIONIC VESICULAR SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Janáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1640/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kristýna Janáková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv koncentrace tenzidové složky a teploty na interakce hyaluronanu a katanionických vezikulárních systémů

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma interakcí hyaluronanu a katanionických vesikulárních systémů.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodné metody a experimenty pro studium těchto systémů se zaměřením na měnící se podmínky experimentů (teplota, koncentrace tenzidu).
3. Optimalizovat a realizovat experimenty.
4. Diskutovat získané výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Kristýna Janáková
student(ka)

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Pomocí izotermické titrační kalorimetrie byl studován vliv koncentrace tenzidové složky a teploty na interakce hyaluronanu a katanionických vezikulárních systémů. Měření bylo provedeno při dvou různých koncentracích tenzidové složky a třech hodnotách teploty. Důvodem studování těchto interakcí je možnost, že by tyto systémy společně s hyaluronanem mohly v budoucnosti sloužit jako nosiče léčiv. Katanionické vezikulární systémy byly připraveny z kationického tenzidu CTAB, z anionického tenzidu SDS a z kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC. Pro všechna měření byl využíván roztok záporně nabitého hyaluronanu o koncentraci 0,5 mM.

ABSTRACT

The influence of various concentrations of surfactant component and various temperatures on interactions of hyaluronan with cationic vesicular systems were examined using isothermal titration calorimetry. The measurements were performed at two different concentrations of surfactant component and three temperature values. The reason for studying the interactions was to explore the possibility of these systems serving as carriers of drugs in the future. Cationic vesicular systems consisted of a cationic surfactant CTAB, an anionic surfactant SDS and of a positively charged two-chain surfactant DODAC. The solution of negatively charged hyaluronan with concentration of 0,5 mM was used for all measurements.

KLÍČOVÁ SLOVA

tenzid, hyaluronan, katanionické vezikulární systémy, izotermická titrační kalorimetrie

KEYWORDS

surfactant, hyaluronan, cationic vesicular systems, isothermal titration calorimetry

CITACE

JANÁKOVÁ, Kristýna. *Vliv koncentrace tenzidové složky a teploty na interakce hyaluronanu a katanionických vezikulárních systémů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131218>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jitka Krouská.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Kristýna Janáková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Jitce Krouské Ph.D. za její čas, za cenné rady a za její přístup při řešení této práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Martině Havlíkové za pomoc při práci v laboratoři a za užitečné informace. Velké díky nakonec patří i mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Tenzidy	9
3.1.1	Klasifikace tenzidů	10
3.1.2	Anionické tenzidy	10
3.1.3	Kationické tenzidy.....	11
3.1.4	Amfoterní tenzidy	12
3.1.5	Neionické tenzidy.....	13
3.2	Micely	13
3.3	Vezikuly.....	14
3.3.1	Katanionické vezikulární systémy	15
3.4	Kyselina hyaluronová	17
3.4.1	Historie	17
3.4.2	Chemická struktura	17
3.4.3	Hyaluronan v lidském těle.....	18
3.5	Izotermická titrační kalorimetrie	20
3.5.1	ITC přístroj	20
3.5.2	ITC měření	21
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	23
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
5.1	Použité chemikálie.....	25
5.2	Příprava zásobních roztoků	25
5.2.1	Příprava katanionických vezikul (cIPA)	25
5.2.2	Příprava zásobního roztoku hyaluronanu	26
5.3	Kalorimetrické měření	27

6	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
6.1	Studie interakcí hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA)	28
6.2	Interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA) o poměru 9:1	30
6.3	Interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA) o poměru 7:3	30
6.4	Vliv teploty na interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA)	32
7	ZÁVĚR	34
8	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	35
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	39
9.1	Seznam zkratk.....	39
9.2	Seznam symbolů.....	40

1 ÚVOD

Vezikuly jsou systémy, které jsou tvořeny z jedné nebo více zakřivených dvouvrstvých membrán uspořádaných do tvaru obalu. Jsou využívány hlavně k transportu léčiv, jelikož jsou schopné zachytit požadované látky do jejich vnitřku, a následně tyto látky zase uvolnit do vnějšího prostředí kontrolovaným způsobem. Příkladem jsou liposomy, které umožňují transport nukleové kyseliny do buněk. Jejich nevýhodou jsou vyšší pořizovací náklady. Možnou alternativou jsou tzv. katanionické vezikulární systémy. Tyto systémy, které jsou finančně méně nákladné, se skládají ze směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek.

Kyselina hyaluronová je polysacharid, který se skládá z $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu. Samotnou kyselinu hyaluronovou nemůžeme nalézt za fyziologických podmínek v živém organismu, protože podléhá rychlé degradaci a její roztok je velmi kyselý. V přírodě, a tudíž i v lidském těle, můžeme nalézt tento polysacharid pouze ve formě soli. Hyaluronan v lidském těle udržuje elastoviskozitu kapalných pojivových tkání a jelikož je v těle schopen vázat vodu a mazat pohyblivé části těla, kontroluje hydrataci tkání a transport vody.

Hyaluronan je také atraktivní molekulou využívanou k transportu léčiv. Problémem je, že se jedná o vysoce hydrofilní biopolymer, tudíž ho nelze využít k transportu nepolárních látek. Proto je třeba využít určité látky, které jsou schopny solubilizovat tyto nepolární látky. To je možné využitím povrchově aktivních látek, které ve výsledném komplexu slouží jako solubilizační domény.

Téma bakalářské práce je součástí projektu s názvem Hyaluronan-kataniontové vezikulární komplexy, který probíhá od roku 2019 až do 2021. Náplní projektu je studium interakcí, struktury, fyzikálních vlastností a stability. Na tomto projektu se podílejí týmy z FCH VUT a také týmy z National Cheng Kung University, Taiwan.

2 CÍL PRÁCE

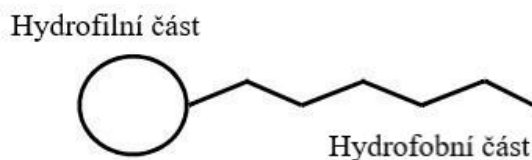
Práce je zaměřena na studium interakcí hyaluronanu a katanionických vezikulárních systémů při různých experimentálních podmínkách. Hlavním cílem této práce bylo realizovat navržené experimenty pomocí izotermické titrační kalorimetrie a na základě získaných výsledků posoudit vliv koncentrace tenzidové složky a teploty na tyto interakce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Tenzidy

Tenzid je organická látka, která je tvořena z molekul obsahující dvě části, a to část hydrofilní a hydrofobní. Takové molekuly se nazývají amfifilní. Hydrofilní část má velkou afinitu k vodě a je nejčastěji tvořena alkylem. Hydrofobní část má naopak velkou afinitu k nepolárním rozpouštědlům a může obsahovat 8 až 22 uhlíkových atomů. Fyzikálně chemické vlastnosti tenzidů jsou pak dány tímto protichůdným chováním hydrofilních a hydrofobních skupin [1].

Pokud značně převažuje hydrofobní část, pak se látka stává prakticky nerozpustnou ve vodě a bude se tak z objemu vodné fáze vysazovat. Má-li naopak převahu hydrofilní část, pak se látka velmi dobře rozpouští ve vodě a může se chovat i jako elektrolyt [2].



Obrázek 1: Molekula tenzidu [3]

Tenzidy jsou charakteristické tím, že snižují mezifázovou, resp. povrchovou energii a to tak, že se adsorbují na fázovém rozhraní již při nízké koncentraci. V soustavě kapalina-plyn se vlivem této adsorpce snižuje povrchové napětí a v soustavě kapalina-pevná látka nebo kapalina-kapalina se snižuje mezifázové napětí [4].

Při zvyšující se koncentraci dochází ke stavu, kdy je fázové rozhraní zcela zaplněno molekulami tenzidu. Důsledkem toho dochází ke spojování (agregaci) jednotlivých molekul tenzidu do agregátů zvaných micely, avšak je nutné dosáhnout určité koncentrace tenzidu, při které se začínají tvořit micely. Tato koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) a pro každý tenzid má určitou charakteristickou hodnotu [1].

Tenzidy, které se označují i jako povrchově aktivní látky (PAL), můžeme nalézt hlavně v pracích, čistících a mycích prostředcích, kde jsou součástí detergentů. Detergenty kromě tenzidů obsahují i doplňující složky, které zlepšují jejich účinek. Povrchová aktivita tenzidů se např. u praní vizuálně projevuje pěněním [4].

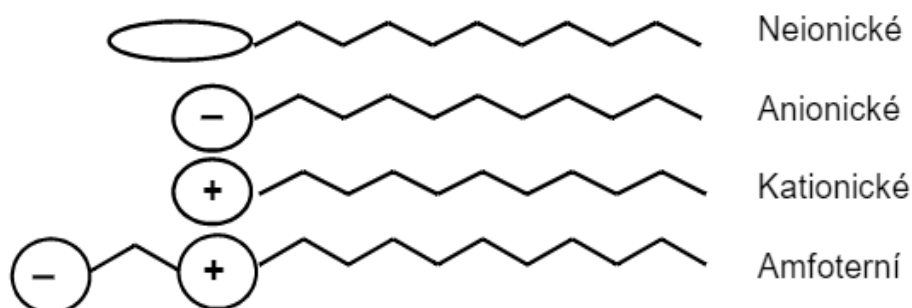
Tenzidy také stabilizují nebo v případě potřeby způsobují rozpad disperzních soustav, snižují tření, urychlují a zjednodušují původní technologické procesy. Dále ovlivňují a zlepšují fyzikálně-mechanické vlastnosti materiálů, surovin a výrobků [2].

3.1.1 Klasifikace tenzidů

Tenzidy je možné klasifikovat např. podle typu hydrofilní nebo hydrofobní části, podle aplikace nebo podle biologické rozložitelnosti. Nejčastěji se ale využívá klasifikace podle charakteru hydrofilní složky, resp. podle její schopnosti disociovat na ionty [3].

Na základě tohoto kritéria se tenzidy dělí na ionické a neionické. Ionické tenzidy se dále dělí na anionické, kationické a amfoterní [3]. Tyto termíny by se měly používat místo dříve užívaných názvů: anionaktivní, kationaktivní a neionogenní tenzid [5].

Ionické tenzidy obsahují funkční skupiny, které ve vodném roztoku disociují, přičemž vzniknou záporně nebo kladně nabití ionty. Tyto ionty jsou nositelem povrchové aktivity. Neionické tenzidy obsahují polární nedisociované skupiny, tudíž ionty netvoří [6].



Obrázek 2: Dělení tenzidů podle jejich hydrofilní části [3]

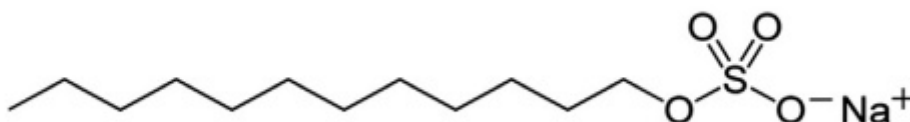
3.1.2 Anionické tenzidy

Anionické tenzidy se podle typu hydrofilní skupiny dělí na karboxyláty ($-\text{COO}^-$), sulfáty ($-\text{OSO}_3^-$), sulfonáty ($-\text{SO}_3^-$), fosfáty ($-\text{OPO}_3\text{H}^-$; $-\text{OPO}_3^{2-}$) a fosfonáty (PO_3H^- ; PO_3^{2-}). Karboxyláty jsou chemicky stabilní a použitelné při hodnotách pH 6-14. Dále chemicky stabilní v používaném rozsahu hodnot pH 0-14 jsou pouze sulfonáty a fosfonáty. Sulfáty jsou estery kyseliny sírové a fosfáty jsou estery kyseliny fosforečné, a jsou tedy hydrolyzovatelné [1].

Mezi nejznámější anionický tenzid patří mýdlo a v současnosti se ho vyrábí přibližně tolik jako všech ostatních tenzidů dohromady. Sodné i draselné mýdlo je výborným detergentem a je snadno biologicky rozložitelné [1]. Velmi často používanou povrchově aktivní látkou ze skupiny alkylsulfátů je dodecylsulfát sodný (SDS) [7].

3.1.2.1 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Dodecylsulfát sodný je organická sodná sůl, jejíž molekulová hmotnost je 288,38 g/mol. Jde o hořlavou a dráždivou látku, která se nachází ve formě bílého až krémově zbarveného prášku s charakteristickým zápachem [8]. SDS má širokou škálu aplikací, je součástí odmašťovačů motorů, čistících prostředků na podlahy a v nižších koncentracích je i součástí šamponů a zubních past. V biotechnologiích se běžně používá pro lýzu buněk během extrakce DNA nebo RNA. SDS se také využívá v PAGE-SDS technice pro denaturaci proteinů [9].



Obrázek 3: Dodecylsulfát sodný [10]

3.1.3 Kationické tenzidy

Kationické tenzidy jsou sloučeniny obsahující jednu nebo více funkčních skupin, které ve vodném roztoku disociují na povrchově aktivní kladně nabitě ionty [3]. Kationem je obvykle dusíkový atom buď ve formě soli aminu (primárního, sekundárního, terciárního), nebo častěji ve formě kvarterní amoniové soli ($-N^+(CH_3)_3Cl^-$) [1].

Nižší aminy obsahující 1 až 4 uhlíky se rozpouštějí ve vodě a volný elektronový pár dusíkového atomu tvoří vodíkové můstky s molekulami vody [1]. Vyšší aminy s řetězcem dlouhým 12 až 14 uhlíků jsou lipofilní (rozpuštěné v tucích) a ve vodě se nerozpouštějí [1, 11].

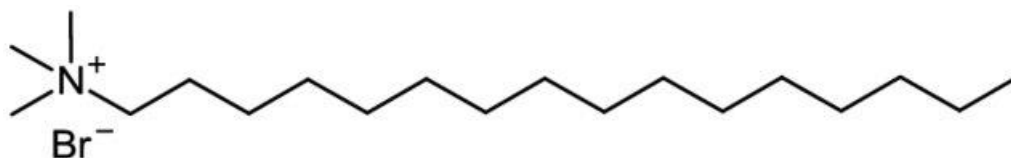
Vlastnosti aminů se mění v závislosti na hodnotě pH, kdy vyšší mastné aminy jsou při hodnotě $pH < 8$ kationické tenzidy a při hodnotě pH nad 11 neionické tenzidy. Naproti tomu kvarterní amoniové soli jsou disociovány v celém intervalu hodnot pH a jsou to tedy kationické tenzidy v celém rozsahu hodnot pH [1].

Kationické tenzidy jsou kompatibilní vzájemně mezi sebou, také jsou kompatibilní s amfoterními tenzidy (s aminokyselinami pouze při hodnotách $pH < 4$) a neionickými tenzidy [1].

Mezi kationické tenzidy patří alkylaminy, což je skupina s nízkou povrchovou aktivitou, dále soli kvarterních amoniových zásad a soli pyridiniových zásad. U solí kvarterních amoniových zásad obsahuje hlavní uhlovodíkový řetězec 12 až 18 uhlíků a zbývající tři řetězce jsou buď methylové nebo ethylové skupiny. Protiontem bývá obvykle halogenidový aniont [3]. Nejznámějším zástupcem této skupiny je cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) [7].

3.1.3.1 Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)

Cetyltrimethylammonium bromid neboli cetrimonium bromid je kvarterní amoniová sůl, která je jednou ze složek cetrimidových antiseptik [12]. CTAB se nachází ve formě bílého prášku a jeho molekulová hmotnost je 364,45 g/mol. Je také rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu [13].



Obrázek 4: *Cetyltrimethylammonium bromid* [14]

Kationické tenzidy se také vyznačují tím, že nemají detergenční vlastnosti, jelikož se sorbují kladně nabitou částí molekuly na povrchy se záporným nábojem, který získávají disociací některých svých funkčních skupin [1]. Toho se využívá u mikroorganismů, kde vytvořením adsorpční vrstvy dojde k narušení jejich metabolické funkce, což postupně vede až k jejich zániku. Význam kationických tenzidů tedy spočívá v jejich germicidních účincích, díky čemuž jsou hojně aplikovány v lékařské praxi do léčebných mastí, dezinfekčních přípravků a jako antiseptika (Ajatin, Septonex, Septosan) [3].

3.1.4 Amfoterní tenzidy

Amfoterní tenzidy mají v molekule kladně i záporně nabitou hydrofilní skupinu, tudíž je jejich molekula navenek elektroneutrální. Tenzidy lze považovat za amfoterní, pokud je jejich anionická a kationická skupina zcela disociována, tedy když tvoří vnitřní sůl (amfion) [1].

Výhodou těchto tenzidů je kombinovatelnost s ostatními typy a také dobrá snášenlivost s pokožkou a sliznicemi. Nevýhodou je pak nerozpustnost ve většině organických rozpouštědel, proto jsou amfoterní tenzidy využívány výhradně jen v kosmetice [3].

3.1.5 Neionické tenzidy

Neionické tenzidy neobsahují ve struktuře své molekuly žádný náboj. Lze je rozdělit do dvou skupin, na polyhydroxysloučeniny a na oxyethylenáty [1]. Jejich rozpustnost ve vodě je zajištěna pomocí funkčních skupin v molekule (aminoskupiny, etherické a hydroxylové skupiny) [3].

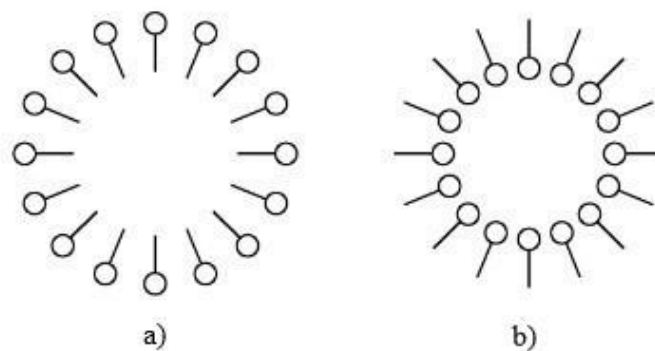
Přibližně 50 % světové produkce povrchově aktivních látek připadá na organické anionické tenzidy, dalších 40 % pak připadá na tenzidy neionické, zbylých 10 % představují tenzidy kationické a zlomek procenta amfionické tenzidy s hlavním využitím v kosmetice [7].

3.2 Micely

Jak už bylo řečeno v kapitole 3.1, micely se začínají tvořit až při dosažení kritické micelární koncentrace (CMC) tenzidů, kdy fázové rozhraní je zcela zaplněné molekulami tenzidu a důsledkem toho dochází k agregaci molekul do micel [1].

Hodnoty CMC jsou závislé na typu tenzidu, na jeho struktuře a vlastnostech hydrofobní a hydrofilní skupiny. Obecně platí, že CMC ionických tenzidů je vyšší než neionických, avšak hodnoty nejsou vysoké. CMC ionických tenzidů se nachází v řádech 10^{-2} M a CMC neionických v řádech 10^{-4} M [3]. Čím delší je uhlovodíkový řetězec a čím jsou menší odpudivé síly, kterými na sebe působí hydrofilní skupiny v povrchu, tím je nižší kritická micelární koncentrace [15]. Kromě dostatečné koncentrace je pro vznik micel z anionických a kationických tenzidů nutné, aby teplota systémů byla vyšší než tzv. Krafftova teplota. Zatímco pod touto teplotou se ionické tenzidy téměř nerozpouštějí, po dosažení Krafftovy teploty dochází díky tvorbě agregátů ke značnému zvýšení rozpustnosti. U neionických tenzidů zvýšení teploty vede ke snížení rozpustnosti a vzniku zákalu [3].

Jednotlivé molekuly jsou v micelách uspořádány tak, aby byly minimalizovány nežádoucí interakce. To znamená, že ve vodném prostředí jsou minimalizovány interakce mezi hydrofobními řetězci a vodou, což vede k takovému uspořádání, kdy hydrofilní části směřují ven a hydrofobní řetězce směřují do středu micely. Takto vzniká tzv. klasická micela. V případě přítomnosti nepolárního rozpouštědla vzniká tzv. inverzní micela, kdy hydrofilní části micely směřují do středu micely, zatímco hydrofobní části tvoří její povrch [3].

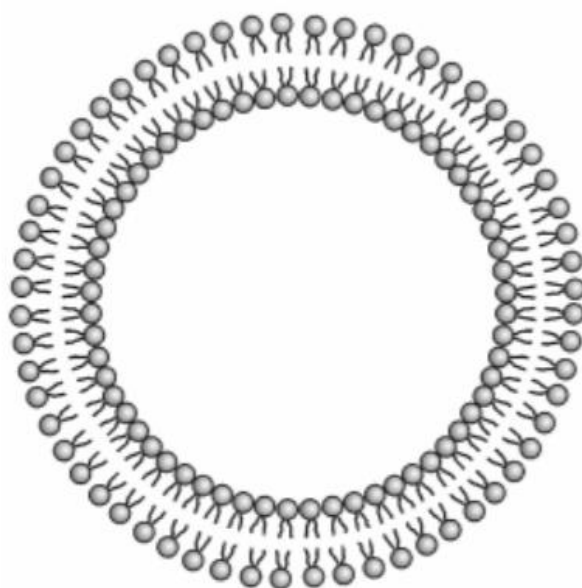


Obrázek 5: *Micela v polárním prostředí (a), micela v nepolárním prostředí (b)* [3]

Další významnou vlastností micelárních roztoků PAL je tzv. solubilizace. Solubilizace je schopnost PAL rozpouštět látky, které jsou v čistém rozpouštědle nerozpustné a na tomto principu je právě založeno čištění znečištěných povrchů (detergence). Při detergenci se nejprve molekuly PAL naadsorbují na povrch znečištěné látky a na povrch přilínajících nečistot. V důsledku toho dochází ke snížení povrchového napětí mezi roztokem a nečistotou, a tudíž i ke zvýšení smáčivosti nečistoty v rozpouštědle. Nečistoty se poté uvolňují z povrchu a uzavřené v micelle mezi molekulami PAL přechází do roztoku. Vlivem solubilizace se původně hydrofobní nečistoty mění na hydrofilní, a tím je zajištěno, že se nečistota nemůže zpět připoutat k čistému povrchu [7].

3.3 Vezikuly

Vezikuly jsou tvořeny z jedné nebo více zakřivených dvouvrstevých membrán uspořádaných do tvaru obalu, kde vnější i vnitřní povrch obalové dvojvrstvé membrány je tvořen hydrofilními skupinami, které minimalizují styk hydrofobních řetězců s vodou. Dosahují rozměrů od desítek nanometrů do desítek (výjimečně až stovek) mikrometrů. Vezikuly se dělí na unilamelární a multilamelární. Unilamelární vezikuly jsou tvořeny pouze jedinou dvojvrstvou a vezikuly multilamelární obsahují více dvojvrstev. Pokud je vezikula tvořena pouze jedinou amfifilní složkou, pak je vezikula metastabilní a má tak dlouhou, ale vždy konečnou životnost a poté přechází v lamelární dvojvrstvu. Stabilní vezikuly lze připravit vytvořením kovalentních vazeb mezi molekulami tvořící obal, což je možné např. když tyto molekuly obsahují jednu nebo více polymerovatelných skupin. Vezikuly jsou důležité v medicíně jako nástroj dávkování léčiv a také v kosmetice. Oproti micelám mají výhodu ve větší kapacitě pro enkapsulaci (ukládání do ochranného obalu) hydrofilních látek a jejich transport v organismu [15].



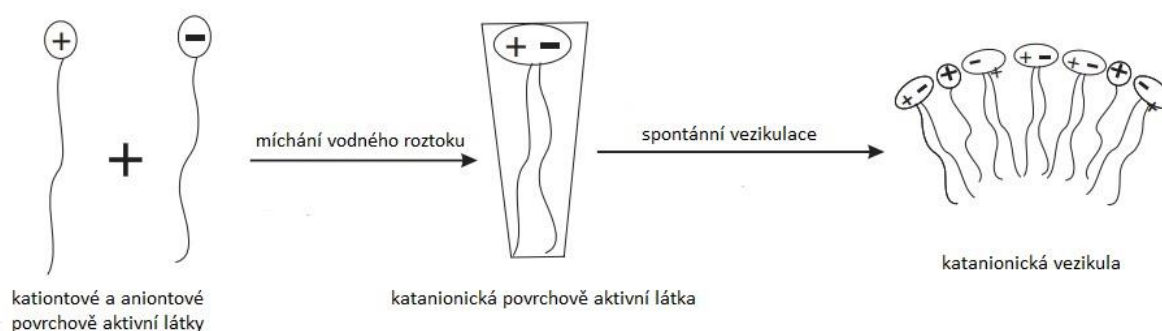
Obrázek 6: Schéma struktury unilamelární vezikuly tvořené amfifilními molekulami s jednou hydrofilní skupinou a dvěma hydrofobními řetězci [15]

3.3.1 Katanionické vezikulární systémy

Vezikuly jsou tedy využívány hlavně k transportu léčiv, řízenému uvolňování a bioseparaci. To je založeno na schopnosti vezikul zachytit požadované látky do jejich vnitřku, a poté tyto látky zase uvolnit do vnějšího prostředí kontrolovaným způsobem. Příkladem jsou liposomy, které jsou využívány pro genovou terapii a umožňují transport nukleové kyseliny do buněk. Problémem je, že je poměrně obtížné je připravit a také, že mají omezenou stabilitu a dobu použitelnosti [16]. Z hlediska vysokých nákladů je praktické využití liposomů omezené [17].

V posledních letech se rozvinula nová skupina samosestavených amfifilních agregátů a to tzv. katanionické vezikulární systémy. Tyto vezikulární systémy mají na rozdíl od liposomů velké výhody. Katanionické vezikulární systémy se tvoří spontánně a mají delší použitelnost než takové syntetické vezikuly, které jsou nestabilní, takže se z nich poté tvoří lamelové dvojvrstvy. Také mají nízkou cytotoxicitu a jsou finančně dostupnější [16]. Vezikulární systémy, které jsou tvořeny z hydrofilní a hydrofobní části, mohou enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látky [17].

Katanionické vezikuly se skládají ze směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek [18]. Mezi polárními skupinami působí elektrostatické interakce [17]. Směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek lze rozdělit do dvou typů: katanionické směsi a amfifilní iontový pár (IPA). Katanionické směsi obsahují protionty, zatímco u amfifilního iontového páru jsou protionty odstraněny. IPA oproti katanionickým směsím netvoří spontánně vezikuly, takže k vytvoření vezikul je potřeba určitá mechanická energie. Velikost, náboj a propustnost katanionických vezikul lze upravit pomocí změny teploty, koncentrace, molárního poměru a délkou řetězce kationických a anionických látek [18].



Obrázek 7: Spontánní tvorba katanionických vezikul [19]

IPA je složen ze dvou spárovaných jednořetězcových opačně nabitých aktivních látek se stejným molárním poměrem. Tvoří spíše dvojvrstvé vezikuly než micely. Katanionické vezikuly tvořené z IPA ve vodné fázi obvykle vykazují špatnou stabilitu, protože snadno agregují, a tak si dlouho neuchovávají svoji velikost. Pomocí inter-vezikulárních a intra-vezikulárních interakcí lze zlepšit stabilitu vezikul. U intra-vezikulárních interakcí je možné zvýšit stabilitu použitím IPA s více řetězci, které zlepší těsnost membrány nebo přidáním cholesterolu a mastné kyseliny, což způsobí změnu molekulárního obalu a změnu interakcí uvnitř dvojvrstev. U inter-vezikulárních interakcí lze přidávkem iontových povrchově aktivních látek zvýšit elektrostatické odpuzování mezi vezikulami [17].

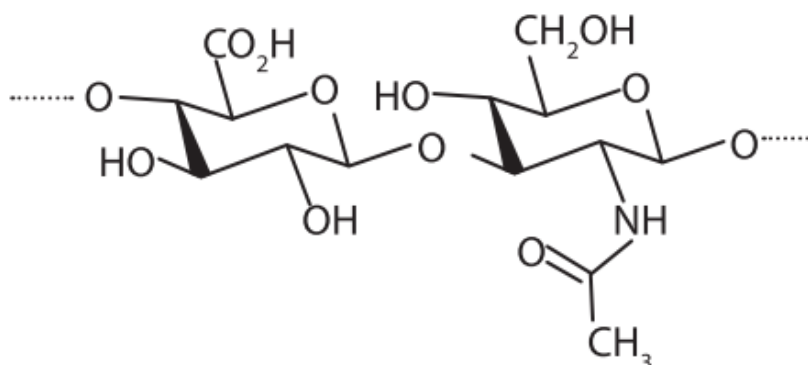
3.4 Kyselina hyaluronová

3.4.1 Historie

V roce 1934 Karl Meyer a jeho kolega John Palmer izolovali dříve neznámou chemickou látku ze sklivce skotu. Zjistili, že tato neznámá látka obsahuje dvě molekuly cukru, z nichž jednou byla kyselina uronová. Pojmenovali tak tuto neznámou látku kyselinou hyaluronovou, což je tedy složenina řeckého slova hyalos = sklo a kyseliny uronové. Poprvé však byla kyselina hyaluronová komerčně využita až v roce 1942, kdy Endre Balazs požádal o patent na její použití jako náhrady vaječného bílku v pekárenských výrobcích [20].

3.4.2 Chemická struktura

Kyselina hyaluronová je nesulfátovaný glykosaminoglykan a po chemické stránce se jedná o nevětvený mukopolysacharid, který je složen z $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu v poměru 1:1 [21].



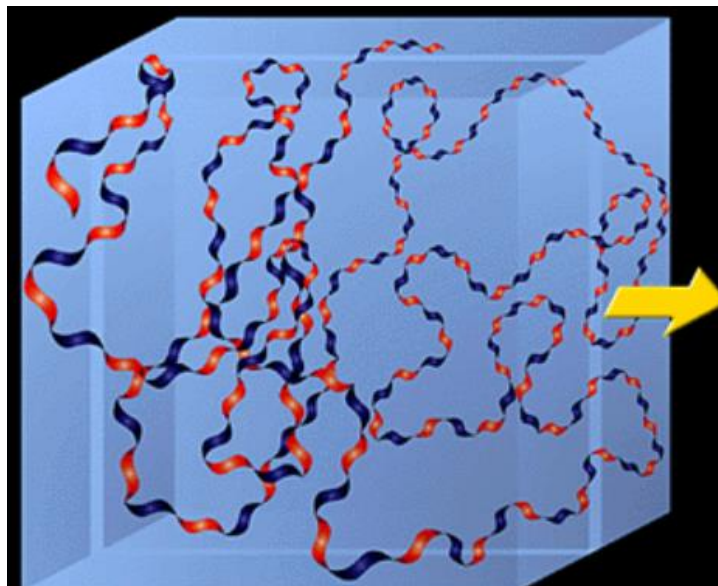
Obrázek 8: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [21]

Kromě názvu kyseliny hyaluronové se využívá i název hyaluronan, který se využívá více proto, že tento polysacharid je v přírodě přítomen ve formě soli, a ne ve formě kyseliny. Tato sůl se skládá z aniontů hyaluronanu a kationtu (sodík, draslík, vápník atd.). Protože samotná kyselina hyaluronová podléhá rychlé degradaci a její roztok je velmi kyselý, nemůžeme ji nalézt za fyziologických podmínek v živém organismu, ale pouze v chemických laboratořích. Kyselinu hyaluronovou i hyaluronát sodný lze rozpustit ve vodě, kde disociují na stejný anion. Jejich rozdílem je, že kyselina hyaluronová se vytváří z jejích solí, například pomocí iontoměničů, které vyměňují sodné kationty za vodíkové. Hyaluronát sodný je pak produkován zvířaty/mikroorganismy jako konečný požadovaný produkt [22].

Obecně kyselina hyaluronová je bílá látka, jejíž molekulová hmotnost se pohybuje mezi několika stovkami tisíc až miliony [23]. Co se týká bezpečnosti, tak kyselina hyaluronová je biokompatibilní, je tedy bezpečná pro použití a nebyla u ní nalezena žádná známka cytotoxicity [24].

Další důležitá fyzikálně-chemická vlastnost kyseliny hyaluronové spočívá v její stereochemické struktuře. Její polysacharidový řetězec vykazuje asymetrickou distribuci svých hydrofilních a hydrofobních postranních řetězců. Na jedné straně je polysacharidový řetězec hydrofobní, na druhé straně je pak hydrofilní. Tato vlastnost hraje velmi důležitou roli ve svém biologickém chování a také v lékařských aplikacích [25].

V roztoku tvoří kyselina hyaluronová páskové struktury, které se navzájem zamotávají již při velmi nízkých koncentracích, což může přispívat k neobvyklým reologickým vlastnostem [20].



Obrázek 9: *Uspořádání kyseliny hyaluronové v roztoku – pás s modrými (hydrofilními) a červenými (hydrofobními) plochami [26]*

3.4.3 Hyaluronan v lidském těle

Hyaluronan se v lidském těle nachází jako složka extracelulární matrix. Hlavní funkcí hyaluronanu v těle je udržovat elastoviskozitu kapalných pojivových tkání, jako je kloubní synoviální a oční sklovitá tekutina. Dále také kontroluje hydrataci tkání a transport vody, protože je v těle schopen vázat vodu a mazat pohyblivé části těla, jako jsou klouby a svaly. Díky své konzistenci a přívětivosti pro tkáň se využívá hojně v produktech pečujících o pleť

[20]. Pozoruhodné množství hyaluronanu je také přítomno v plicích, ledvinách, mozku a svalech, ale velmi málo v játrech. Nejnižší koncentrace hyaluronanu je v krevním séru [27]. Úloha hyaluronanu v lidském těle je silně závislá na molekulové hmotnosti. Obecně tedy platí, že hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu ve smyslu regulace pochodů v organismu a slouží tedy hlavně jako strukturní jednotka. Naopak hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností má velký vliv na různé pochody v tkáních a buňkách. Bylo dokázáno, že čím nižší molekulová hmotnost je, tím vyšší je biologická aktivita [28].

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako jsou například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celou dobu životnosti tkáně. Syntéza je obvykle vyvážena katabolismem, čímž se udržuje konstantní koncentrace ve tkáni. Jsou ale i buňky, které buď převážně syntetizují, nebo katalyzují. Příkladem jsou buňky v dermis, které aktivně syntetizují více hyaluronanu než katabolizují. Odhaduje se, že téměř jedna třetina celkového hyaluronanu v lidském těle je během průměrného dne metabolicky odstraněna a nahrazena [26].

O hyaluronanu tedy slyšíme nejvíce v souvislosti s těly obratlovců, ale můžeme jej nalézt také u některých Prokaryot (*Streptococcus* či *Pasteurella* aj.), kde je součástí buněčné stěny [21]. V této bakalářské práci se bude pracovat s kyselinou hyaluronovou, která se vyrábí ve firmě Contipro a.s. a kde získávají kyselinu hyaluronovou z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus*. Tyto bakterie nepředstavují žádné riziko pro člověka, protože jsou zbaveny všech patogenů. Pomocí procesu kvašení a následného čištění vzniká kyselina hyaluronová v podobě prášku, nebo dalších forem [29].

V posledních letech se kyselina hyaluronová a její deriváty používají i jako nosiče pro podávání steroidních léčiv, polypeptidů, proteinových léčiv, ale i různých protirakovinných léčiv. Tento typ nosiče léčiva může velmi významně prodloužit dobu zdržení léčiva v místě podání, zvýšit biologickou dostupnost a snížit nežádoucí účinky [30].

3.5 Izotermická titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) je metoda, která slouží k charakterizaci intermolekulárních interakcí s nízkou, ale i s vysokou afinitou. Je to tedy technika, která je založena na měření tepla, které je generováno nebo absorbováno při interakci mezi dvěma molekulami. Využívá se ke stanovení konstant stability, stechiometrie, entalpií a za určitých podmínek entropií, Gibbsových volných energií a změn tepelných kapacit [31]. Vztah mezi volnou energií (G), entalpií (H) a entropií (S) systému molekul popisuje následující rovnice:

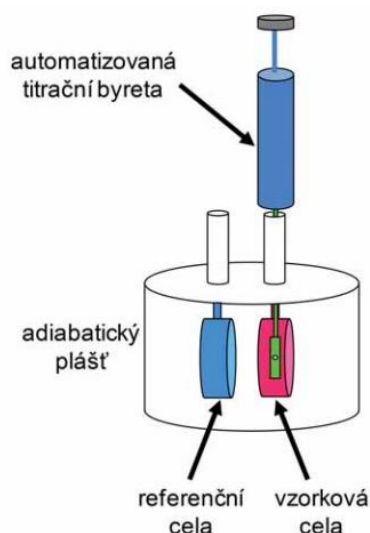
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Vazebná entalpie ΔH je z molekulárního hlediska teplo spojené se vznikem, zánikem a deformací chemických vazeb, tudíž obvykle popisuje změny v počtu a typu vodíkových můstků. Pokud je hodnota ΔH negativní, pak dochází ke zvýšení a zesílení vodíkových můstků. Naopak hodnota ΔH je pozitivní, jestliže dochází k zániku či zeslabení vodíkových můstků [32].

Termodynamické parametry interakce je možné měřit bez imobilizace, modifikace nebo značení vazebných partnerů a také bez omezení molekulové hmotnosti. U ITC lze látky studovat v roztoku, ale také v suspenzi, jelikož zákal nebo barva vzorků nemá žádný vliv na měření [31].

3.5.1 ITC přístroj

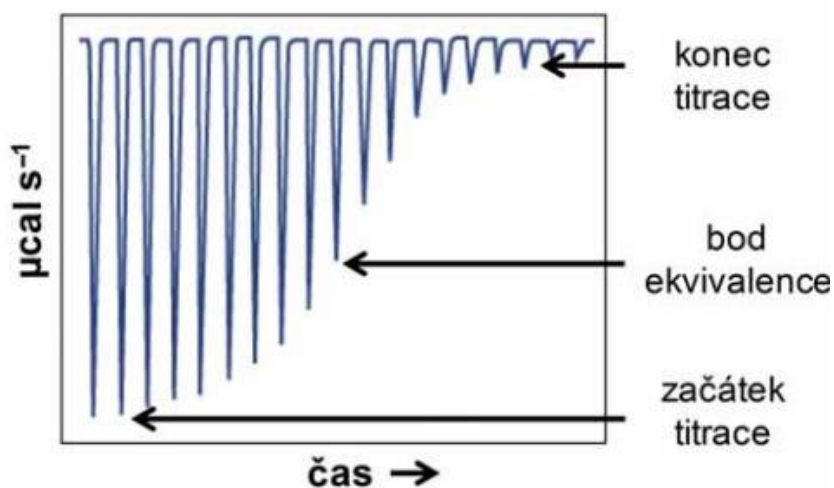
Na obrázku 10 je zobrazen typický ITC přístroj, který se skládá ze dvou identických cel, které jsou umístěné v adiabatickém plášti. Jedna cela se plní vodou nebo puřem a slouží čistě jako reference. Druhá cela, měrná, se plní jednou složkou zkoumané reakce. Obě cely se během experimentu udržují v tepelné rovnováze ($\Delta T = 0$). Plášť obklopující cely je chlazen, tudíž k udržení cel a jejich obsahu na experimentální teplotě je třeba určitá energie [33].



Obrázek 10: Schématické znázornění přístroje [34]

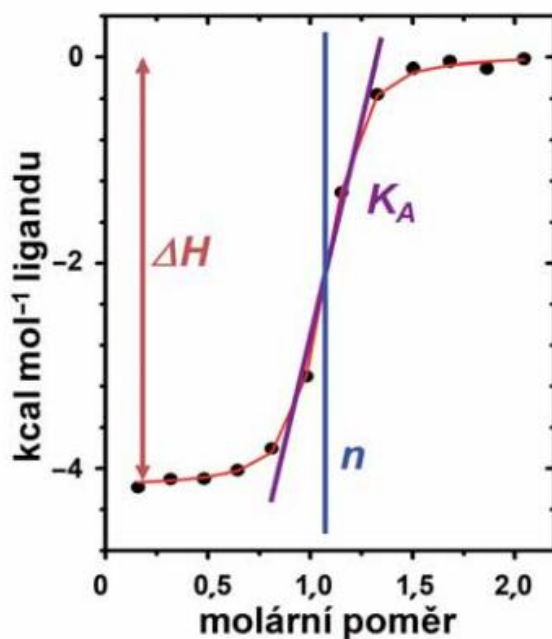
3.5.2 ITC měření

Při měření je do cely s roztokem makromolekul postupně přidáván roztok vázající se molekuly – ligandu. V průběhu titrace dochází k obsazování vazebných míst ligandem, kdy při úplném obsazení vazebných míst dojde k nasycení a v roztoku se poté nachází volný ligand. Během interakce makromolekuly s ligandem dochází k tepelným efektům, které se projeví rozdílem teplot cely referenční a měrné. Tento rozdíl je detekován termočlánkem, který je umístěný v prostoru mezi celami. Termočlánek zajišťuje změnu přísunu elektrické energie pro vyrovnání teplot obou cel. Při exotermické reakci se při vazbě molekul uvolňuje teplo, proto se přísun energie sníží. Pokud se ale při vazbě molekul teplo spotřebovává, jde o reakci endotermickou a přísun energie se zvýší. Na obrázku 11 je zobrazen graf, který zaznamenává změnu dodávané energie v závislosti na čase. Následně se provádí korekce na tepelné vlivy, které jsou spojené s ředěním ligandu a mícháním. Korekce se provádí odečtením referenční křivky získané při měření za stejných podmínek, ale bez přítomnosti makromolekul v roztoku [32].



Obrázek 11: Graf funkce času, kde se teplo uvolnilo při interakci dvou interakčních partnerů [34]

Integrací vzniká graf závislosti entalpie na molárním poměru mezi interakčními partnery [34]. Výsledná sigmoidální křivka je pak tvořena body, které udávají vazebnou entalpii příslušnou ke každému přidavku ligandu do reakce [33]. Z tohoto grafu (viz obrázek 12) je pak možné určit hodnotu asociační konstanty (K_A), entalpii (ΔH) a stechiometrii interakce (n) [34].



Obrázek 12: Graf závislosti entalpie na molárním poměru interakčních partnerů [34]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tématika interakcí hyaluronanu a povrchově aktivních látek je velice inovativní, a proto studium těchto interakcí pomocí izotermické titrační kalorimetrie není zatím široce popsáno. Tato kapitola je věnována některým objevům z vědeckých publikací týkajících se právě těchto interakcí. Kromě kalorimetrie jsou zde uvedeny i jiné instrumentální metody.

Obecně hyaluronan je velmi atraktivní molekulou pro použití v systémech cíleného podávání léků, protože buňky jsou schopné rozpoznat hyaluronan pomocí specifických receptorů v buněčné membráně. Problémem je, že se jedná o vysoce hydrofilní biopolymer, tudíž ho nelze využít k cílenému dodávání nepochárných látek. Jelikož mnoho potenciálně účinných léčiv je hydrofobních, je třeba využít určité látky k vytvoření hydrofobní domény schopné solubilizovat tyto nepochární látky. K tomuto účelu lze použít povrchově aktivní látky, které ve výsledném komplexu slouží jako solubilizační domény. Úloha hyaluronanu pak spočívá v rozpustnosti ve vodě, biokompatibilitě a cílení [35].

J. Krouská a kol. studovali termodynamiku tvorby micel kationických povrchově aktivních látek TTAB a CTAB s přidavkem hyaluronanu a bez něj. Pomocí kalorimetrie a konduktometrie byla detekována makroskopická fázová separace, která nastává, když jsou náboje povrchově aktivní látky a hyaluronanu vyváženy. Naopak pomocí turbidimetrie a potenciometrie byly prokázány interakce hyaluronanu a povrchově aktivních látek již při nízkých koncentracích povrchově aktivní látky. Pozorované rozdíly mezi systémy připravenými pomocí TTAB a CTAB naznačují, že kromě elektrostatických interakcí hrají významnou roli při této interakci i hydrofobní účinky [35].

Na interakce hyaluronanu a povrchově aktivních látek se také zaměřili T. Krutišová a kol. s cílem připravit nanočástice pro cílené dodávání hydrofobních léčiv. Pro toto měření byly použity zásobní roztoky hyaluronanu a CTAB ve vodném roztoku a také v 0,15 M roztoku chloridu sodného. Byla pozorována přítomnost zákalu a částice byly zkoumány pomocí metody dynamického rozptylu světla a Dopplerovy laserové velocimetrie. Bylo zjištěno, že rozpuštění hyaluronanu v roztoku chloridu sodného dává menší velikost částic než rozpuštění hyaluronanu o stejné koncentraci ve vodném roztoku. Nárůst velikosti agregátů byl pozorován poblíž bodu nulového náboje, kdy systém v tomto bodě vykazuje nulový zeta potenciál a minimální stabilitu, která má za následek separaci fází [36].

Je třeba ale zmínit, že některé kationické povrchově aktivní látky, jako CTAB a Septonex, jsou škodlivé pro určité typy buněk. Tuto problematiku studovali P. Sauerová a kol., kdy byl

testován cytotoxický účinek komplexů CTAB-HA a Septonex-HA na lidské buněčné typy – osteoblasty, keratinocyty a fibroblasty. Bylo zjištěno, že tyto komplexy snižují cytotoxicitu vyvolanou samotnými povrchově aktivními látkami. Tato studie tedy odhalila, že hyaluronan představuje užitečný modulátor cytotoxického účinku CTAB nebo Septonexu na různých úrovních [37].

An-Tsung Kuo a kol. se naopak zabývali studiem vlivu cholesterolu na stabilitu katanionických vezikulárních systémů. Katanionické vezikulární systémy byly vytvořeny z amfifilního iontového páru HTMA-DS a z dvouřetězcového kladně nabitého tenzidu DTDAB. Tyto systémy se studovaly v přítomnosti a nepřítomnosti cholesterolu. Účinky cholesterolu na stabilitu byly zkoumány analýzou velikosti, zeta potenciálu a pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Katanionické vezikuly připravené z IPA obvykle vykazují špatnou fyzickou stabilitu tím, že agregují nebo nemohou dlouhodobě uchovávat velikost. Pro zvýšení stability byly navrženy inter-vezikulární a intra-vezikulární metody založené na přidání DTDAB a cholesterolu k amfifilnímu iontovému páru. Experiment ukázal, že přidáním cholesterolu do vezikul se zvýší stabilita, jelikož přítomnost cholesterolu zvyšuje vzdálenost mezi nabitými skupinami molekul tvořících vezikuly. Kromě toho také snižuje tendenci protiontu vázat se na povrch vezikul, což vede k výraznějšímu nábojovému charakteru vezikul [38].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie

	Molekulová hmotnost	Výrobce	CAS
CTAB	364,45 g/mol	Sigma Aldrich	57-09-0
SDS	288,38 g/mol	Sigma Aldrich	151-21-3
DODAC	586,64 g/mol	Alfa Aesar	107-64-2
Cholesterol	386,65 g/mol	Sigma Aldrich	57-88-5
Chloroform	119,38 g/mol	PENTA	67-66-3
Hyaluronan sodný	250-450 kDa	Contipro a.s.	9067-32-7

5.2 Příprava zásobních roztoků

5.2.1 Příprava katanionických vezikul (cIPA)

Příprava cIPA o poměru 9:1 zahrnovala části obsažené v následujících bodech:

a) Příprava prášku IPA

Příslušné množství cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) bylo zalito 1 l deionizované vody tak, aby výsledná koncentrace roztoku tenzidu činila 20 mM. Stejným způsobem byl připraven i zásobní roztok dodecylsulfátu sodného (SDS) o stejné výsledné koncentraci. Roztoky se nechaly přes noc míchat a další den se smíchaly v poměru 1:1. Vzniklý roztok se opět ponechal přes noc míchat při teplotě 30 °C a poté následovala centrifugace (10 min při 3500 otáček/min) a filtrace za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Získaný prášek IPA byl usušen na Petriho misce v sušárně a uskladněn v suché vialce.

b) Příprava zásobního roztoku IPA v chloroformu a DODAC v chloroformu

Zásobní roztok IPA v chloroformu byl připraven rozpuštěním připraveného zásobního roztoku IPA v chloroformu tak, aby výsledná koncentrace roztoku činila 2 mM. Stejně tak byl připraven zásobní roztok dimethyl-di-n-octadecylammonium chloridu (DODAC) v chloroformu o stejné výsledné koncentraci.

c) Příprava kladně nabitých katanionických vezikulárních systémů cIPA s cholesterolem (43 mol. %)

Do suché nádoby Pyrex bylo naváženo určité množství cholesterolu a k tomuto množství byl následně přidán zásobní roztok IPA v chloroformu a zásobní roztok DODAC v chloroformu v poměru 9:1, tak aby celková koncentrace byla 2 mM. Do vzniklého roztoku byly přidány

skleněné kuličky a roztok byl zvortexován. Následně byl roztok ponechán přes noc, aby se odpařila chloroformová fáze. Další den byl vzniklý tenký film na skleněných kuličkách rehydratován deionizovanou vodou. Rehydratovaný roztok byl opět zvortexován a sonifikován tyčovým dispergátorem, dokud nebylo dosaženo energie 25 kJ, při amplitudě 50 %. Po sonifikaci byl vzorek připraven na měření.

Tímto způsobem probíhala i příprava druhého roztoku cIPA, jen zásobní roztok IPA v chloroformu a DODAC v chloroformu byly smíchány v poměru 7:3.

Výpočet koncentrace tenzidové složky:

Výsledná koncentrace 2 mM cIPA se přepočítává pro kladné náboje, v tomto případě pro DODAC, který v roztoku tvoří 10 % (v případě poměru 9:1) anebo 30 % (v případě poměru 7:3). Jelikož vezikuly tvoří vnější a vnitřní povrch, je třeba přepočítanou koncentraci vydělit dvěma. Koncentrace tenzidové složky tvořící cIPA je tedy 0,1 mM (poměr 9:1) a 0,3 mM (poměr 7:3).

5.2.2 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci 0,2 g/l a molekulové hmotnosti 250-450 kDa byl připraven před měřením a byl skladován v lednici.

Výpočet koncentrace hyaluronanu:

Jelikož software u ITC přístroje pracuje pouze s jednotkami mM, je třeba koncentraci hyaluronanu přepočítat. Pomocí podílu koncentrace hyaluronanu 0,2 g/l a molekulové hmotnosti jedné disacharidové jednotky hyaluronanu 421 g/mol se získala výsledná koncentrace 0,5 mM.

5.3 Kalorimetrické měření

Kalorimetrické měření probíhalo na izotermickém titračním kalorimetru MicroCal PEAQ-ITC (viz obrázek 13), kde se ligand vstříkoval do měrné cely typicky v 0,5 až 2 μl přidavcích. Ligandem byl záporně nabitý hyaluronan o koncentraci 0,5 mM, který byl vstříkován do měrné cely obsahující roztok cIPA o poměru 9:1 nebo o poměru 7:3. Pro lepší přehled o obsahu tenzidových složek tvořící cIPA je místo koncentrace tenzidové složky v dalších kapitolách uváděn pouze poměr těchto složek. Měření probíhalo při třech teplotách, a to při 25 °C jakožto při laboratorní teplotě, dále při optimální teplotě lidského těla 37 °C, a poté při extrémní teplotě 50 °C. Každé měření bylo zopakováno dvakrát, aby mohla být data nakonec zprůměrována.



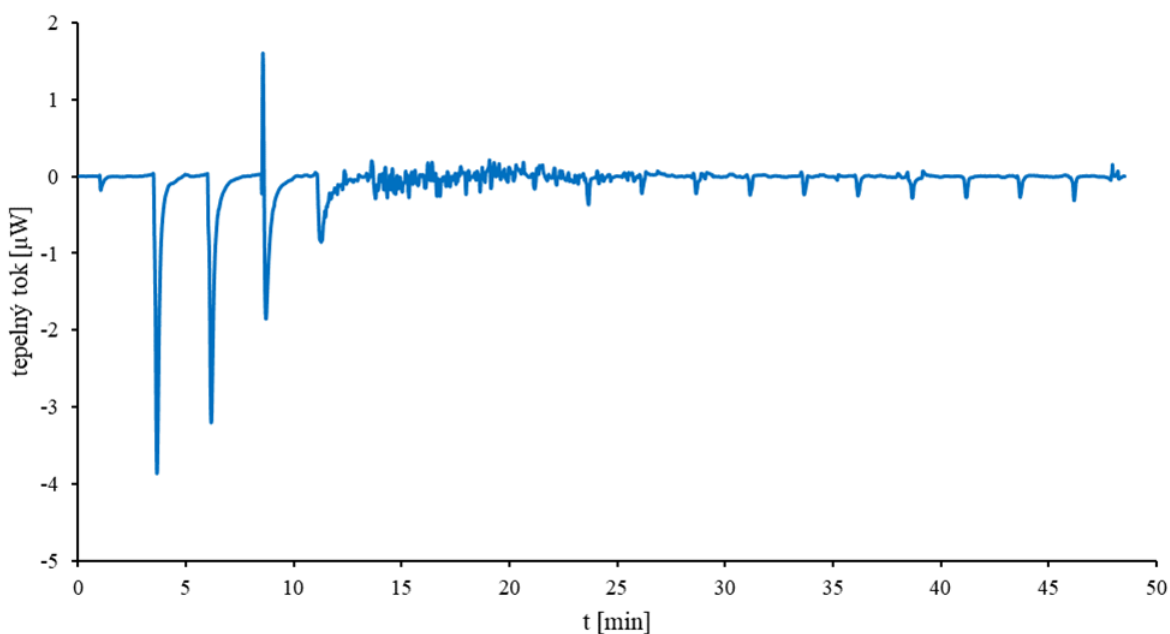
Obrázek 13: *MicroCal PEAQ-ITC* [39]

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Studie interakcí hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA)

Výstupem z izotermického titračního kalorimetru je graf závislosti tepelného toku na čase. Pomocí tohoto grafu bylo studováno, zda za různých experimentálních podmínek dochází mezi hyaluronanem a cIPA k interakci. Pro tuto studii nebyly důležité konkrétní hodnoty.

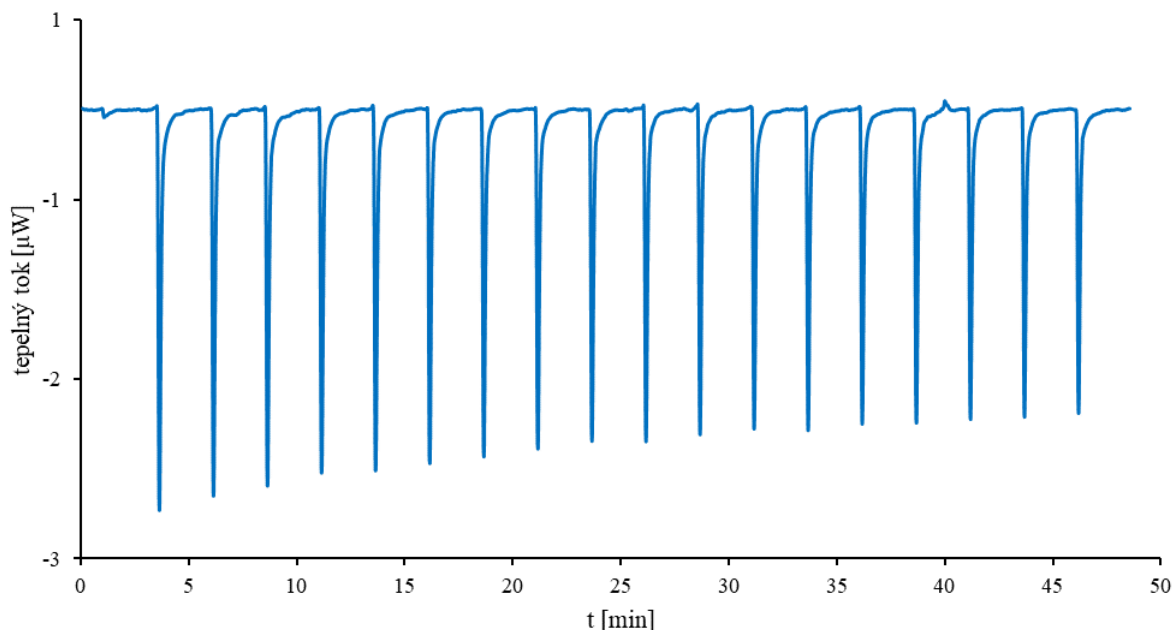
Pokud mezi hyaluronanem a cIPA dochází k interakci, pak dochází k zákalu, a to se projeví v grafu tak, že místo viditelných jednotlivých přidavků (které se projeví rozlišitelným píkem v titrační křivce) vzniká šum. Názorná ukázka vzniku interakce hyaluronanu s cIPA o poměru 9:1 a při teplotě 37 °C je zobrazena v grafu na obrázku 14.



Obrázek 14: *Graf závislosti tepelného toku na čase; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 při teplotě 37 °C*

Na tomto grafu lze vidět, že na začátku měření vznikají píky s největší intenzitou, které představují jednotlivé přidavky hyaluronanu do cIPA. Následně během titrace vzniká šum, kdy je interakce nejvíce patrná a kdy dochází k postupnému obsazování vazebných míst. Poté se jednotlivé píky v grafu zmenšují a na konci měření dochází k tzv. saturaci, což znamená, že jsou všechna vazebná místa obsazena.

Pokud naopak k interakci mezi hyaluronanem a cIPA nedochází, pak žádný šum v grafu nevzniká a v grafu jsou vidět jen jednotlivé přídavky hyaluronanu do cIPA v podobě stejně velkých píků. Jak vypadá titrace, při níž k interakci nedochází, znázorňuje obrázek 15 obsahující graf závislosti tepelného toku na čase. V tomto případě byl hyaluronan titrován do cIPA o poměru 7:3 a při teplotě 37 °C.

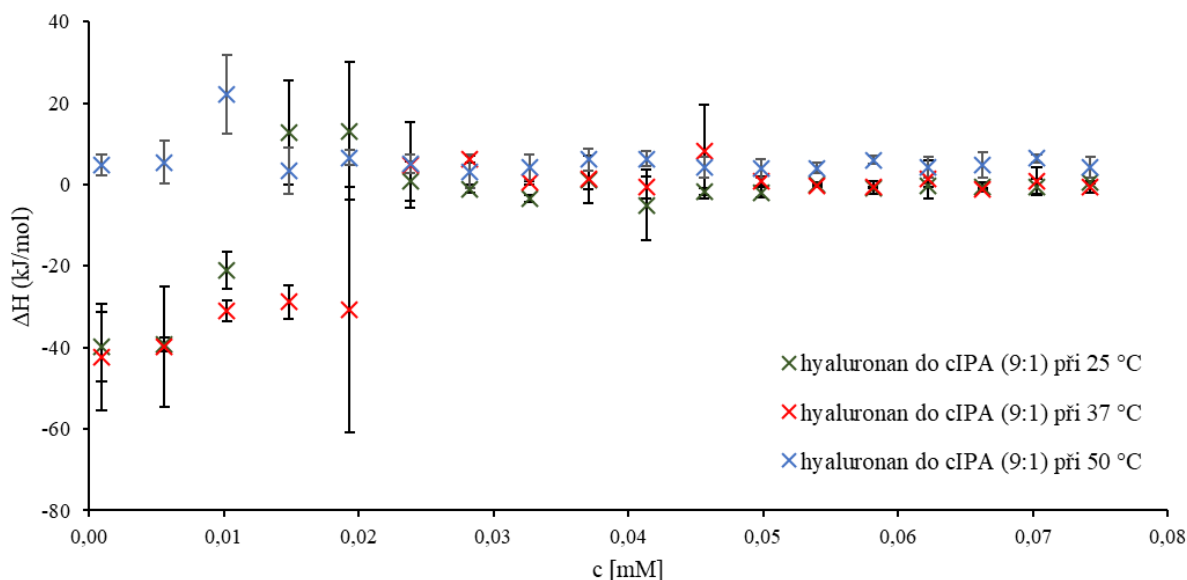


Obrázek 15: *Graf závislosti tepelného toku na čase; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 7:3 při teplotě 37 °C*

Pro správné vyhodnocení naměřených výsledků bylo také třeba provést slepý experiment, to znamená provést titraci do měřicí cely, kde je jen rozpouštědlo bez vzorku. Při vyhodnocení se tato data odečetla od reálného experimentu, abychom získali informaci o skutečném průběhu interakcí bez vlivu ředění vzorku. Integrací těchto dat pomocí softwaru byly získány hodnoty změny entalpie odpovídající jednotlivým přídávkům hyaluronanu do cIPA a hodnoty koncentrace hyaluronanu. Pro každý systém byl tak vytvořen graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu, který by měl mít v nejideálnějším případě tvar sigmoidální křivky. Inflexní bod v tomto grafu pak znázorňuje největší změnu při titraci, což představuje největší intenzitu interakce. Následně proložení bodů vhodným modelem se mohou získat parametry Gibbsovy rovnice, a to celkovou změnu entalpie, Gibbsovu energii a entropii.

6.2 Interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA) o poměru 9:1

Titrací hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 při třech různých teplotách a následnou integrací naměřených dat byl vytvořen graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu, kde je porovnáván vliv poměru cIPA 9:1 na interakce. Tento graf zobrazuje obrázek 16.

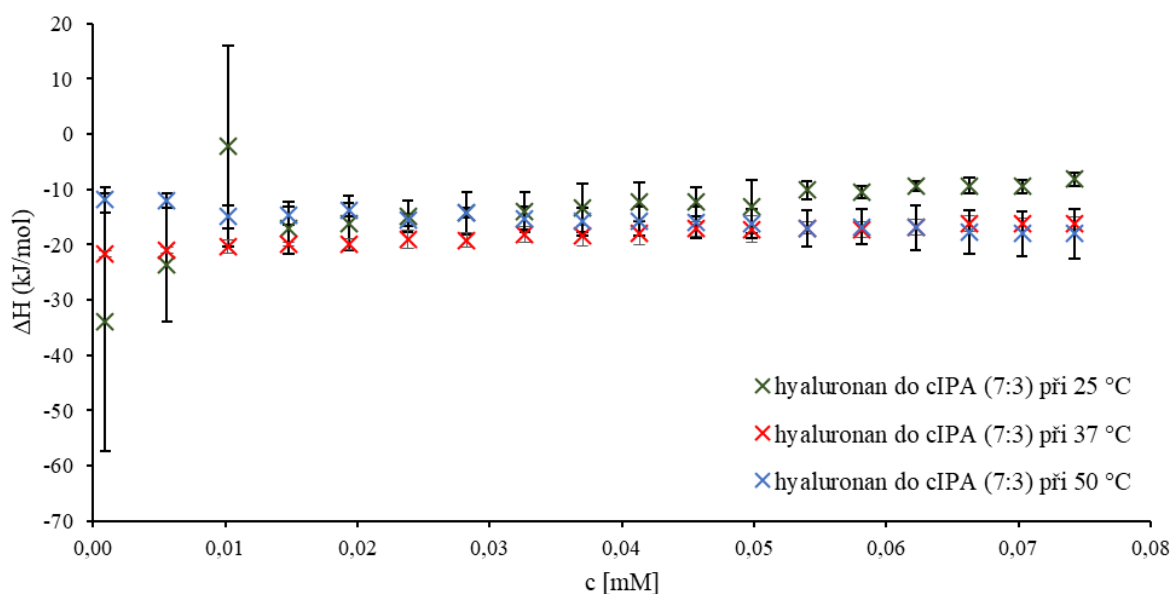


Obrázek 16: Graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 při všech třech teplotách

Na grafu je patrné, že poměr 9:1 cIPA umožňuje vznik interakcí. Vznik interakcí usuzujeme na základě toho, že se hodnoty entalpie na začátku titrace mění. Potvrzovaly nám to i výstupy z ITC, kde se jednotlivé píky v průběhu měření zmenšovaly a vznikl nám šum (viz obrázek 14). Nejvíce patrné interakce jsou okolo hodnoty koncentrace hyaluronanu 0,01 – 0,02 mM. Graf mimo jiné obsahuje i směrodatné odchylky v podobě chybových úseček. Velké odchylky jsou způsobeny tím, že v těchto bodech dochází k interakci a ta je při jednotlivých měření jiná.

6.3 Interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA) o poměru 7:3

Z naměřených dat vzniklých při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 7:3 při všech třech teplotách byl stejným způsobem byl vytvořen graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu (viz obrázek 17).



Obrázek 17: Graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 7:3 při všech třech teplotách

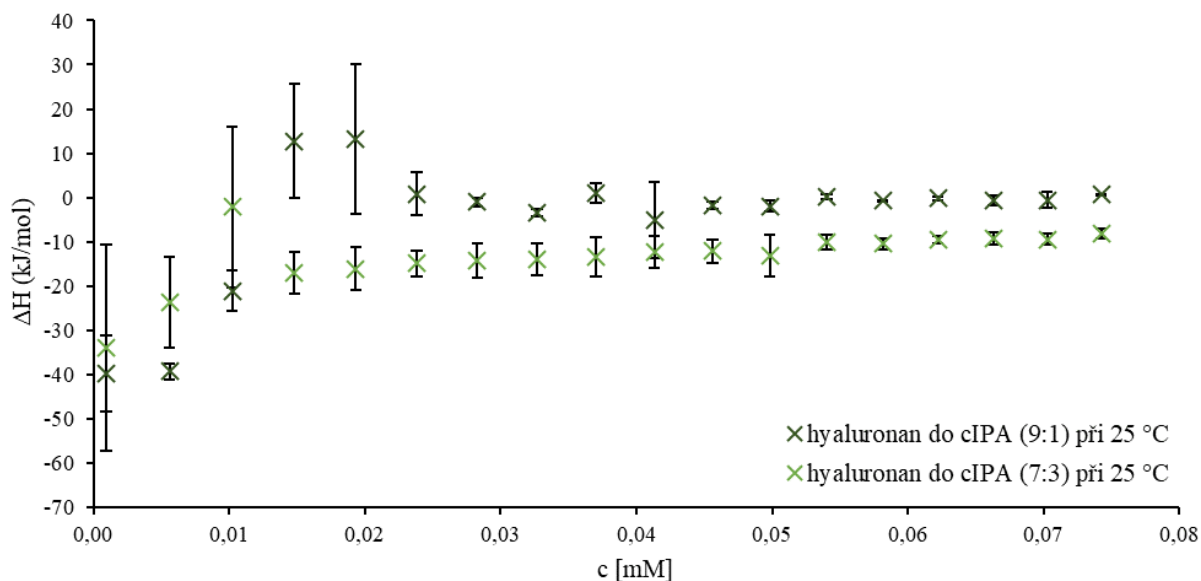
V grafu je porovnáván vliv poměru 7:3 na interakce. Oproti předchozímu grafu je patrné, že se hodnoty entalpie o tolik neliší, lze tedy konstatovat, že k žádným interakcím nedochází. To nám také potvrzovaly výstupy z ITC, kde nám vznikaly stejně velké píky (viz obrázek 15). Během titrace probíhaly exotermické děje, jelikož hodnoty entalpie se pohybují v záporných hodnotách.

Je třeba ale zmínit dva body v grafu (viz obrázek 17), které vznikly na začátku měření při teplotě 25 °C a které se hodnotami velmi odlišují od ostatních. To je způsobeno tím, že se data z dvou měření za stejných podmínek zprůměrovaly, kdy při jednom měření došlo k vychýlení dvou píků. K interakci zde tedy také nedochází.

Teoreticky by ale cIPA o poměru 7:3 měly s hyaluronanem interagovat více než cIPA o poměru 9:1, protože obsahují větší podíl kladného náboje, čímž by mělo být zajištěno více možných vazebných míst pro interakce s hyaluronanem. Tomu ale tak není. Jednou z příčin může být to, že je tento systém méně stabilní než cIPA o poměru 9:1. Méně stabilní systém se může projevovat tak, že tvoří agregáty a dlouhodobě si neuchovává svoji velikost. Tvorbou agregátů se pak snižuje počet vazebných míst pro hyaluronan, čímž se snižuje i možnost vzniku interakce s hyaluronanem.

6.4 Vliv teploty na interakce hyaluronanu a katanionických IPA (cIPA)

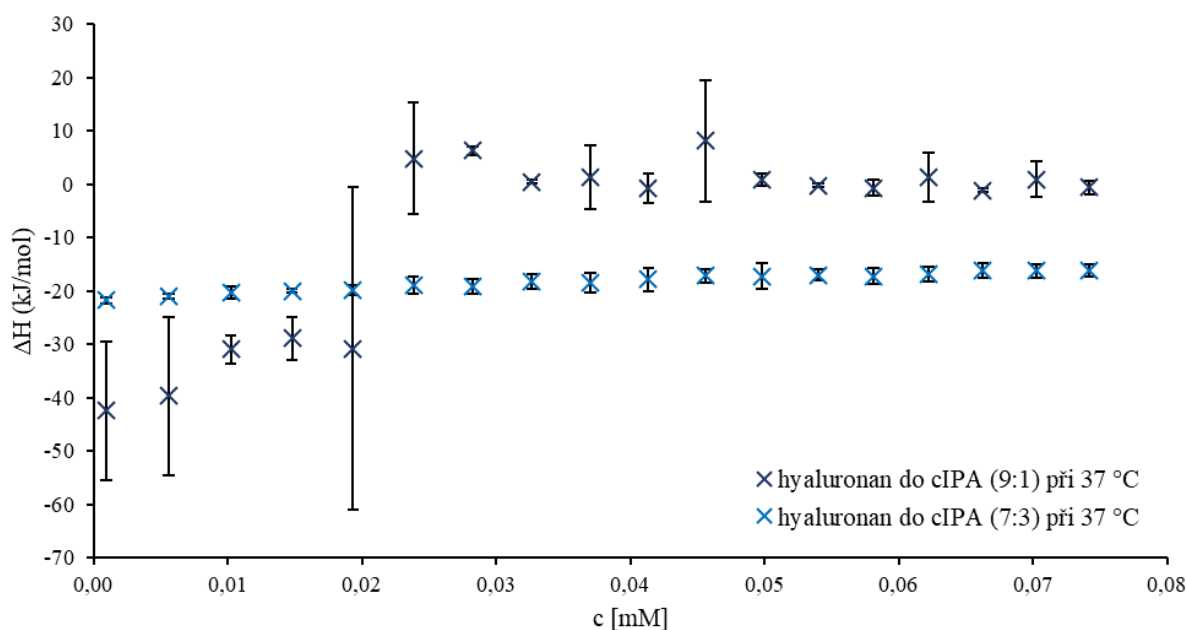
Na základě toho, že by systém hyaluronan a cIPA mohl jednou sloužit jako nosič léčiv, studovalo se, jak by se tento systém choval při určitých teplotách (25, 50 °C), a hlavně při teplotě lidského těla (37 °C). Pro větší přehlednost vlivu každé teploty na interakce o dvou různých poměrech cIPA byly vytvořeny celkem tři grafy závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu.



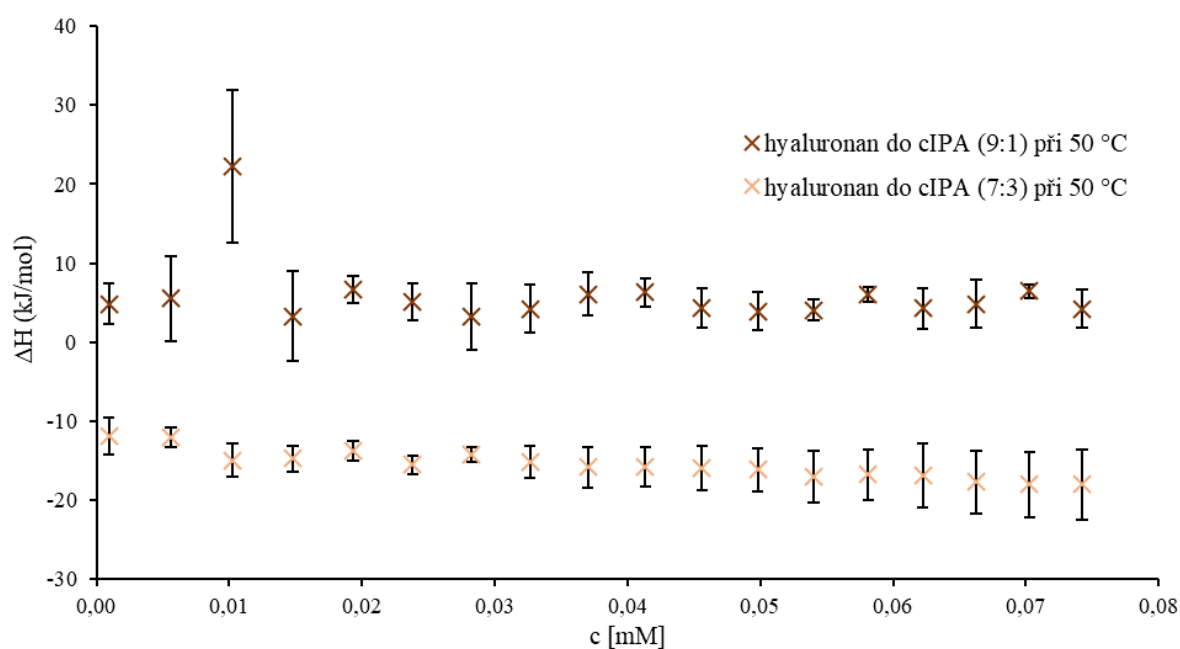
Obrázek 18: Graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 a 7:3 při 25 °C

Obrázek 18 zobrazuje graf pro titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 a o poměru 7:3 při teplotě 25 °C. Tato teplota má rozdílný vliv, jelikož při titraci s poměrem cIPA 9:1 dochází k interakci, zatímco s poměrem cIPA 7:3 k interakci nedochází.

Rozdílný vliv na interakce má i teplota 37 °C, to představuje obrázek 19, který jasně vystihuje situaci. Při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 se hodnoty entalpie výrazně mění. Je zde také vidět tvar sigmoidální křivky, kdy se hodnoty entalpie na začátku měření pomalu zvyšují, poté následuje prudké zvýšení hodnot entalpie a na konci jsou hodnoty entalpie prakticky konstantní. Během této titrace dochází k přechodu exotermické reakce na endotermickou. Naopak při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 7:3 vidíme, že se hodnoty entalpie od sebe tolik neliší, zde interakce neuvažujeme.



Obrázek 19: Graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 a 7:3 při 37 °C



Obrázek 20: Graf závislosti změny entalpie na koncentraci hyaluronanu; titrace hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 a 7:3 při 50 °C

Při měření při poslední teplotě 50 °C, u které byl studován vliv na interakce, by se mohlo zdát, že k interakci při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 nedochází. Tomu tak ale není. Z výstupu ITC sice nebyl vidět intenzivní šum, ale vzniklé píky se v průběhu měření prudce zmenšily. Je zde tedy patrná interakce, avšak o menší intenzitě. Při titraci s poměrem cIPA 7:3 a teplotě 50 °C k interakci nedochází.

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala studiem vlivu koncentrace tenzidové složky a teploty na interakce hyaluronanu a katanionických vezikulárních systémů. Teoretická část se zabývala charakterizací tenzidů, které jsou důležité pro přípravu katanionických vezikulárních systémů, dále samotnými vezikulami a kyselinou hyaluronovou. Také zde byla popsána metoda izotermické titrační kalorimetrie, která byla využita při měření.

V experimentální části byl popsán postup přípravy vzorků a průběh měření. Samotné měření bylo založeno na titraci záporně nabitého hyaluronanu do cIPA složených z kationického tenzidu CTAB, z anionického tenzidu SDS, a z kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC. Měření bylo provedeno při dvou různých koncentracích tenzidové složky (poměr 9:1, poměr 7:3) a při třech hodnotách teploty (25, 37 a 50 °C).

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 dochází k interakcím, a to při všech třech teplotách. Interakce se odlišují v intenzitě, přičemž nejméně intenzivní interakce nastává při 50 °C. Naopak při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 7:3 nedochází k žádné interakci, a to ani při jedné teplotě.

Bylo tedy zjištěno, že poměr tenzidových složek 9:1 tvořících cIPA umožňuje interakce, zatímco poměr 7:3 ne. Teoreticky by ale cIPA o poměru 7:3 měly více interagovat s hyaluronanem, jelikož obsahují větší podíl kladného náboje (30 %) než cIPA o poměru 9:1 (10 %). Zvýšením poměru kladného náboje by tak mělo vzniknout více možných vazebných míst pro interakce. Tomu tak ale není. Jednou z možných příčin může být menší stabilita, která se může projevit tvorbou agregátů, čímž by se snížila možnost vzniku interakce s hyaluronanem. Jediným možným důkazem, že by cIPA o poměru 7:3 byly méně stabilní, nám dokazuje fakt, že připravený roztok cIPA o poměru 7:3 byl zakalenější než roztok cIPA o poměru 9:1.

Na základě vzniku interakce při titraci hyaluronanu do cIPA o poměru 9:1 a při teplotě 37 °C je možné na závěr říct, že by jednou tento systém mohl sloužit jako nosič léčiv v lidském těle.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020, 298 stran: ilustrace; 25 cm. ISBN 978-80-7592-056-0
- [2] BAREŠ, Milan a Jiří ZAJÍC. *Chemie a technologie tensidů a detergentů*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1982.
- [3] Chemie a technologie tensidů II, Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D. [online]. Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 0132n. 1. [cit. 2020-12-03]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/29914679-Chemie-a-technologie-tenzidu-ii.html>
- [4] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-928-0.
- [5] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, 93(7), 421-427.
- [6] BLAŽEJ, Anton. *Tenzidy*. Bratislava: Alfa, 1977.
- [7] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [8] Sodium dodecyl sulfate. PubChem [online]. [cit. 2020-12-15] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate>
- [9] ABBOT, Vikrant a Poonam SHARMA. Thermodynamic and acoustic studies of quercetin with sodium dodecyl sulfate in hydro-ethanolic solvent systems: A flavonoid-surfactant interaction study. *Chemical physics* [online]. Elsevier B.V, 2020, **538** [cit. 2020-12-15]. ISSN 0301-0104. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphys.2020.110921
- [10] SUMMERTON, Emily, Martin J HOLLAMBY, Georgina ZIMBITAS, et al. The impact of N,N-dimethyldodecylamine N-oxide (DDAO) concentration on the crystallisation of sodium dodecyl sulfate (SDS) systems and the resulting changes to crystal structure, shape and the kinetics of crystal growth. *Journal of colloid and interface science* [online]. Elsevier, 2018, 527, 260-266 [cit. 2020-12-15]. ISSN 0021-9797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2018.05.058
- [11] *Velký lékařský slovník: lipofilní* [online]. [cit. 2020-12-17]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/lipofilni>
- [12] Cetrimonium bromide. PubChem [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5974>
- [13] Hexadecyl trimethyl ammonium bromide. *Chemical Book* [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5743258.htm

- [14] NIKOLA, Paunović a Pejić NATAŠA. Thermodynamics of micellization of hexadecyltrimethylammonium bromide in propylene glycol-water mixture: A conductivity study. *Facta Universitatis Series: Physics* [online]. University of Niš, 2014, **12**(1), 17-26 [cit. 2020-12-20]. ISSN 0354-4656. Dostupné z: doi:10.2298/FUPCT1401017J
- [15] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [16] JIANG, Yue, Feifei LI, Yuxia LUAN, Wenting CAO, Xiaoqing JI, Lanxia ZHAO, Longlong ZHANG a Zhonghao LI. Formation of drug/surfactant catanionic vesicles and their application in sustained drug release. *International journal of pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2012, **436**(1-2), 806-814 [cit. 2020-12-20]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.053
- [17] WU, Chih-jung, An-tsung KUO, Chen-hsuan LEE, Yu-min YANG a Chien-hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, **292**(3), 589-597 [cit. 2021-1-3]. ISSN 0303 - 402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-013-3104-9
- [18] KUO, An-tsung, Chien-hsiang CHANG a An-tsung KUO. Recent Strategies in the Development of Catanionic Vesicles. *Journal of oleo science* [online]. 2016, **65**(5), 377-384 [cit. 2021-1-4]. ISSN 13458957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess15249
- [19] DHAWAN, Vivek V a Mangal S NAGARSENKER. Catanionic systems in nanotherapeutics – Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications. *Journal of controlled release* [online]. Elsevier B.V, 2017, 266, 331-345 [cit. 2021-1-14]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.040
- [20] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Praha)*, 2008(53), 397-411.
- [21] SLÍVA, J. a J. MINÁRIK. Hyaluronát - nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, 1(2), 75-79.
- [22] Contipro. *Jaký je rozdíl mezi kyselinou hyaluronovou a hyaluronátem sodným?* [Online].[cit. 2021-1-15] <https://contipro.cz/ha-vs-sha>.
- [23] Hyaluronic acid. *Chemical Book* [online]. [cit. 2021-1-16]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb1176690.htm
- [24] BANSAL, Jyoti, Suresh KEDIGE a Samir ANAND. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian Journal of Dental Research* [online]. Medknow

Publications, 2010, **21**(4), 575-578 [cit. 2021-1-16]. ISSN 0970-9290. Dostupné z: doi:10.4103/0970-9290.74232

[25] ROBERT, L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. *Pathologie biologie (Paris)* [online]. Elsevier SAS, 2015, **63**(1), 32-34 [cit. 2021-1-17]. ISSN 0369-8114. Dostupné z: doi: 10.1016/j.patbio.2014.05.019

[26] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. Glycoforum [online], 1997, [cit. 2021-01-20], <https://www.glycoforum.gr.jp/article/01A2.html>

[27] FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* [online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 1997, **242**(1), 27-33 [cit. 2021-1-21]. ISSN 0954-6820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x

[28] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství: Hyaluronan - biopolymer for tissue engineering : teze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2012. ISBN 978-80-214-4420-1.

[29] *Contipro: Biotechnologická výroba* [online]. [cit. 2021-1-21]. Dostupné z: <https://www.contipro.cz/biotechnologicka-spolecnost-contipro>.

[30] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *Journal of controlled release* [online]. Elsevier B.V, 2018, **278**, 122-126 [cit. 2021-2-2]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.04.015

[31] BOUCHEMAL, Kawthar. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug discovery today* [online]. Elsevier, 2008, **13**(21-22), 960-972 [cit. 2021-3-1]. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2008.06.004

[32] HOFER, C. Mikrokalorimetrie biologicky významných molekul. *Československý časopis pro fyziku. Česká republika: Akademie věd České republiky*, 2006, č. 56, s. 288-292

[33] LADBURY, John E a Babur Z CHOWDHRY. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chemistry & biology* [online]. Elsevier, 1996, **3**(10), 791-801 [cit. 2021-4-8]. ISSN 1074-5521. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-5521(96)90063-0

[34] Durech M, Trčka F, Vojtěšek B, Müller P. Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí [Methods for analysis of protein-protein and protein-ligand interactions]. *Klin Onkol.* 2014;27 Suppl 1:S75-81. Czech. doi: 10.14735/amko20141s75. PMID: 24945541.

- [35] KROUSKÁ, J.; PEKAŘ, M.; KLUČÁKOVÁ, M.; ŠARAC, B.; BEŠTER-ROGAČ, M. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers*, 2017, vol. 157, no. neuvědno, p. 1837-1843. ISSN: 0144-8617
- [36] PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M.; HEJNÁ, J. Nanoparticles formed by self- assembly of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. In *NANOCON 2013 Conference Proceedings*. 1st. Ostrava: TANGER, Ltd., Keltickova 62, 710 00 Ostrava, Czech Republic, EU, 2013. p. 595-599. ISBN: 978-80-87294-47- 5.
- [37] SAUEROVÁ, P.; PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M.; HUBÁLEK KALBÁČOVÁ, M. Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 2017, vol. 103, no. 1, p. 1276-1284. ISSN: 0141-8130.
- [38] KUO, An-tsung, Cheng-lin TU, Yu-min YANG a Chien-hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. Elsevier B.V, 2018, **92**, 29-35 [cit. 2021-05-06]. ISSN 1876-1070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [39] MicroCal PEAQ-ITC. [online]. [cit. 2021-05-28]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range/microcal-peaq-itc>.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Seznam zkratk

cIPA	katanionické vezikulární systémy
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DODAC	dimethyldi-n-octadecylammonium chlorid
DTDAB	ditetradecyldimethylammonium bromid
HA	hyaluronan
HTMA	hexadecyltrimethylammonium-dodecylsulfát
IPA	amfifilní iontový pár
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
PAL	povrchově aktivní látka
SDS	dodecylsulfát sodný
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid

9.2 Seznam symbolů

c	koncentrace
μcal	mikrokalorie
ΔG	změna volné energie
g	gram
ΔH	změna entalpie
K_A	asociační konstanta
kDa	kilodalton
kJ	kilojoule
M	jednotka molární koncentrace (g/mol)
mM	milimol na decimetr krychlový
min	minuta
mol	mol
mol. %	molární procento
l	litr
μl	mikrolitr
n	stechiometrie interakce
ΔS	změna entropie
T	absolutní teplota
ΔT	změna teploty
t	čas
μW	mikrowatt
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia