



# 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

# PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOLOIDŮ HYALURONANU S MICELÁRNÍMI AGREGÁTY PRO NANOMEDICÍNSKÉ APLIKACE.

HYALURONAN-MICELLE AGGREGATES AND THEIR POTENTIAL FOR NANOMEDICINE APPLICATIONS

## DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Tereza Pilgrová

## ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2017

## Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Ing. Tereza Pilgrová**  
Studijní program: Fyzikální chemie  
Studijní obor: Fyzikální chemie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název dizertační práce:

Příprava a charakterizace koloidů hyaluronanu s micelárními agregáty pro nanomedicínské aplikace.

### Zadání dizertační práce:

Připravit a charakterizovat koloidní systémy typu koloidní roztok vznikající na základě interakcí hyaluronanu s micelárními agregáty a posouzení vhodnosti využití připravených systémů pro nanomedicínské aplikace.

### Termín odevzdání dizertační práce: 30.11.2017

-----  
Ing. Tereza Pilgrová  
student(ka)

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Dizertační práce je zaměřena na studium přípravy a charakterizaci koloidních systémů vznikajících na základě interakcí hyaluronanu s micelárními agregáty. Teoretická část práce se věnuje nosičovým systémům, popisu použitých materiálů a metodám charakterizace studovaných systémů, zejména fluorescenční spektroskopii, dynamickému rozptylu světla a turbidimetrii. Experimentální část je zaměřena na objasnění vyhodnocení naměřených dat. Výsledková část práce je rozdělena na dvě podsekcce věnující se různému způsobu přípravy komplexů hyaluronan-tenzid. Indukované agregáty hyaluronanu se Septonexem jsou charakterizovány z hlediska jejich vzniku a stability, přičemž výsledky jsou porovnávány s již dříve studovaným tenzidem CTAB. V druhé části jsou pak diskutovány tzv. ovrstvené micely, jejich formace, vlastnosti a stabilita.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Hyaluronan, micely, tenzid, Septonex, CTAB, fluorescence, dynamický rozptyl světla, turbidimetrie, nosičové systémy

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the study of preparation and characterization of hyaluronan-micelle aggregates. The theoretical part deals with drug delivery systems, characterization of used materials and methods especially fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and turbidimetry. Methods of determination of measured data are summarized in the experimental section. The result section is divided into two subsections dedicated to different preparation methods of hyaluronan-surfactant complexes. Induced aggregates of hyaluronan with Septonex are characterized in terms of their origin and stability, and the results are compared with previously studied surfactants CTAB. In the second part are discussed so-called decorated micelles, their formation, properties and stability.

## **KEYWORDS**

Hyaluronan, micelles, surfactant, Septonex, CTAB, fluorescence, dynamic light scattering, turbidimetry, drug delivery system



PILGROVÁ, T. Příprava a charakterizace koloidů hyaluronanu s micelárními agregáty pro nanomedicínské aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 119 s. (přílohy 69 s.). Vedoucí dizertační práce: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato dizertační práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....  
Ing. Tereza Pilgrová

*Dizertační práce byla podpořena projektem Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně – udržitelnost a rozvoj, r.č. LO1211, za finanční podpory Národního programu udržitelnosti I (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy).*

*Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala mému vedoucímu dizertační práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnoval během mého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala kolegům a kolegyním z biokoloidní skupiny na Fakultě chemické za hojně a podnětné diskuze a konzultace při řešení experimentálních problémů.*

*Speciální poděkování patří mojí rodině za neustálou podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu mého studia.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	9
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	10
2.1	Nosičové systémy .....	10
2.1.1	Cílení .....	10
2.1.2	Druhy nosičových systémů .....	11
2.2	Hyaluronan .....	15
2.2.1	Sekundární a terciární struktura .....	16
2.2.2	Síťování hyaluronanu .....	17
2.2.3	Metabolismus .....	18
2.2.4	Funkce a možnosti využití kyseliny hyaluronové .....	19
2.2.5	Role kyseliny hyaluronové při kancerogenních procesech .....	20
2.3	Tenzidy a micelární agregáty .....	22
2.3.1	Micely a kritická micelární koncentrace .....	23
2.3.2	Vnitřní struktura micel .....	23
2.3.3	Solubilizace .....	26
2.3.4	Závislost fyzikálních veličin na koncentraci tenzidu .....	26
2.4	Optické vlastnosti koloidních soustav .....	27
2.4.1	Absorpce světla .....	27
2.4.1.1	<i>UV-VIS spektrofotometrie</i> .....	28
2.4.1.2	<i>Lambert-Beerův zákon</i> .....	29
2.4.2	Rozptyl světla .....	30
2.4.2.1	<i>Turbidimetrie</i> .....	31
2.4.2.2	<i>Dynamický rozptyl světla</i> .....	31
2.5	Elektrické vlastnosti koloidních soustav .....	33
2.6	Fluorescence .....	34
2.6.1	Zákony a pravidla pro fluorescenci .....	35
2.6.2	Tvorba excimeru .....	35
2.6.3	Pyren .....	36
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	39
3.1	Nanomedicína a cílené nosiče léčiv .....	39
3.2	Interakce polyelektrolyt-tenzid .....	39
3.3	Interakce hyaluronan-tenzid .....	42
3.4	Fluorescenční spektroskopie .....	43

3.5	Turbidimetrie.....	44
<b>4</b>	<b>CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>47</b>
5.1	Materiály .....	47
5.2	Příprava vzorků .....	47
5.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	47
5.2.2	Metoda fluorescenční sondy .....	48
5.2.3	Charakterizace systémů pomocí metody DLS .....	48
5.2.4	Turbidimetrie.....	48
5.2.5	Studium solubilizace hydrofobního barviva .....	48
5.2.6	Cytotoxicita .....	49
5.3	Metody a standardní vyhodnocení .....	49
5.3.1	Fluorescenční měření (pyren) .....	49
5.3.2	Dynamický a elektroforetický rozptyl světla .....	53
5.3.3	Turbidimetrie.....	55
5.3.4	UV-VIS spektrofotometrie.....	55
5.3.5	Cytotoxicita .....	56
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>57</b>
6.1	Indukované agregáty tenzidu s hyaluronanem .....	57
6.1.1	Fluorescenční mapování interakce Septonexu s hyaluronanem.....	57
	6.1.1.1 <i>Agregační chování Septonexu.....</i>	57
	6.1.1.2 <i>Interakce při nízkých koncentracích Septonexu .....</i>	58
6.1.2	Stabilita indukovaných micel.....	61
	6.1.2.1 <i>Časová stabilita .....</i>	62
	6.1.2.2 <i>Teplotní stabilita.....</i>	64
	6.1.2.3 <i>Vliv iontové síly.....</i>	65
	6.1.2.4 <i>Vliv zředění .....</i>	68
	6.1.2.5 <i>Sumárně .....</i>	69
6.1.3	Studium interakce tenzidu a hyaluronanu pomocí DLS titrací .....	69
6.1.4	Testy na buňkách.....	72
6.2	Komplexy micelárních agregátů s hyaluronanem .....	76
6.2.1	Mapování interakcí hyaluronanu a micelárních agregátů tenzidů pomocí turbidimetrických titrací .....	76
6.2.2	Studium komplexů micelárních agregátů tenzidů s hyaluronanem pomocí DLS titrací .....	82

6.2.3	Studium solubilizace hydrofobního barviva v systému Septonex-hyaluronan.....	85
6.2.4	Studium micelárních agregátů během turbidimetrických titrací pomocí metody fluorescenční spektroskopie a dynamického rozptylu světla .....	87
6.2.5	Testy na buňkách.....	91
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>PŘEHLED ZKRATEK .....</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ .....</b>	<b>110</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>111</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>115</b>
<b>13</b>	<b>VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....</b>	<b>116</b>
13.1	Články v impaktovaném časopise .....	116
13.2	Konferenční příspěvky indexované v databázi Web of Science .....	116
13.3	Příspěvky na mezinárodních konferencích.....	116
13.4	Abstrakty na mezinárodních konferencích.....	117
13.5	Přednášky na konferencích.....	117
13.6	Postery na konferencích .....	118
<b>14</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>119</b>

# 1 ÚVOD

Předpona „nano“ (z řečtiny – znamená trpaslík, trpasličí) je v současné době nadužívána, nicméně je faktem, že trpasličí technologie mají mnohdy obří aplikace. Jedním z velmi slibných směrů je nanomedicína – využití specifických vlastností entit jako jsou vlákna a částice, pokud mají rozměry v nanometrové škále, v medicíně.

**Richard Smalley**, nositel Nobelovy ceny za chemii, řekl roku 2005 předtím, než zemřel na rakovinu: „Před dvaceti lety, bez dnešní surové chemoterapie, bych byl už mrtvý. Za dvacet let nám nanotechnologie poskytne speciálně zkonstruovaná léčiva, která se specificky zacílí na zmutované rakovinné buňky v těle, a všechno ostatní ponechá nedotčené. Rakovina bude minulostí.“

Vize Richarda Smalleyho vedla a stále vede řadu vědců ke zkoumání dalších možných systémů využitelných pro nosičové aplikace v oblasti medicíny či kosmetiky. Jednou z celé řady možností pro formulaci takových nosičových systémů je využití interakcí hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy, jelikož takové systémy by mohly těžit z výhod obou komponent a vzájemnou spoluprací převážit možné nedostatky jednotlivých složek. Mezi hlavní výhody takového systému patří kombinace biokompatibilního a vysoce hydrofilního polymeru s útvary vytvářejícími hydrofobní doménu schopnou rozpustit nepolární látky, tedy například hydrofobní léčiva.

Tato práce si proto klade za cíl „přispět se svou troškou do mlýna“, tedy přispět k celosvětové snaze o vývoj nosičů léčiv a to konkrétně prozkoumáním možností přípravy komplexů hyaluronanu s micelárními agregáty, v nichž může být solubilizována hydrofobní látka a poskytnutím komplexních informací o stabilitě a vlastnostech takových systémů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nosičové systémy

Nanonosiče začaly nedávno přitahovat stále více pozornosti v oblasti vývoje systémů pro podávání léků (tzv. drug delivery system), zejména z toho důvodu, že jsou schopny zvýšit rozpustnost hydrofobních léčivých látek (včetně většiny protinádorových léčiv), zajistit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním oběhu, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň, soubor buněk (např. nádor), jednotlivou buňku nebo dokonce i buněčné kompartmenty. Dále by nosičové systémy měly omezit nežádoucí účinky terapie a potlačit rezistenci cílové tkáně k léčivu. V neposlední řadě mají velký potenciál v oblasti stárnutí pokožky, protože umí překonávat kožní bariéru (*stratum corneum*) a doručit léčivo do hlubších vrstev kůže.

Největší pozornost je dnes zaměřena na vývoj nosičů kancerostatik a to zejména z důvodu vysoké společenské závažnosti nádorových onemocnění, která je dána jejich častým výskytem a dodnes mnohdy málo účinnou léčbou. Dnes užívaná protinádorová léčiva nejsou totiž dostatečně selektivní pro nádorovou tkáň, což se projevuje dlouhou řadou nežádoucích účinků (např. poškození krvevotvorby, kardiovaskulární potíže, arytmie, narušení činnosti gastrointestinálního traktu, poškození sliznic, poškození nervové soustavy či pohlavního ústrojí, ovlivnění plodnosti, atd.) [1–3]. Moderní věda se stále více zaměřuje na vývoj nových prostředků pro léčbu nádorových onemocnění, které budou schopny překonat rezistenci nádorových tkání, prodloužit uvolňování aktivních látek a doručit léčivo pouze na požadované místo účinku – **cílení**.

#### 2.1.1 Cílení

Cílení nosičů léčiv zajišťuje transport aktivní látky (např. cytostatika) přímo do postižené tkáně, čímž lze značně omezit nežádoucí účinky léčiv a zvýšit jejich účinnost.

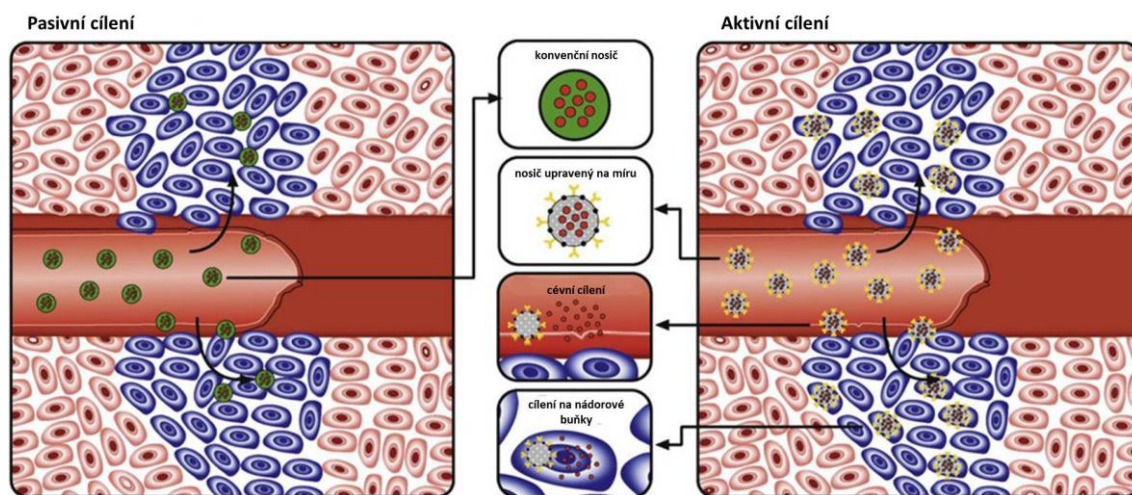
Konvenční metody podávání léčiv zahrnují orální podání léčiva nebo injekční aplikaci aktivní látky přímo do postiženého místa. Tyto metody však mají své nevýhody. Například orální podání tablet či kapsulí může mít za následek nerovnoměrnou farmakokinetiku po vystavení těchto nosičů metabolickým drahám v organismu. To může mít za následek větší než potřebnou podanou dávku léčiva, která může podpořit zvýšenou toxicitu.

Dodání léčiva do cílové tkáně může být dosaženo primárně dvěma cestami – pasivně a aktivně (Obr. 1).

**Pasivní cílení** využívá permeabilitu nádorové tkáně. V důsledku rychlé tvorby cévního systému v rostoucí rakovinné tkáni se tvoří „děravá“ defektivní struktura tkáně, která může být snadno přístupná toxickým chemoterapeutickým lékům. Některá léčiva mohou být podávána jako prekurzory nebo neaktivní léky, které mohou být aktivovány, jakmile jsou vystaveny nádorové tkáni. Pasivní cílení zahrnuje také dodávku léku k nádoru prostřednictvím několika invazivních způsobů. V případě pasivního cílení je velice podstatná velikost polymerního nosiče, která musí být v rozsahu 6 až 200 nm [4; 5]. Při menší velikosti může dojít k vyloučení nosiče renální exkrecí, při větších rozměrech by docházelo k pohlcování částic fagocyty a jejich vyloučení játry. Většina polymerních částic o příslušné

velikosti podléhá tzv. EPR efektu (Enhanced Permeability and Retention effect). Ten je založen na dvou faktorech. Prvním faktorem je fakt, že kapilární endothelium v maligní tkáni je neuspořádané a tak více propustné vůči makromolekulám, než kapilární endothelium normální tkáně. Druhý faktor zahrnuje nedostatečný nádorový lymfatický systém, který má za následek akumulaci léčiva v nádorovém lůžku.

**Aktivního cílení** se obvykle dosahuje vazbou specifického ligandu na nosič, což umožňuje přednostní akumulaci léčiva v nádorové tkáni, v rámci nádorových buněk, intracelulární organely nebo specifické molekule v nádorových buňkách. Tento přístup se používá pro nasměrování nanočástic k povrchu receptorů, jelikož mnoho typů nádorových buněk má na svém povrchu specifické receptory pro určité ligandy [6].



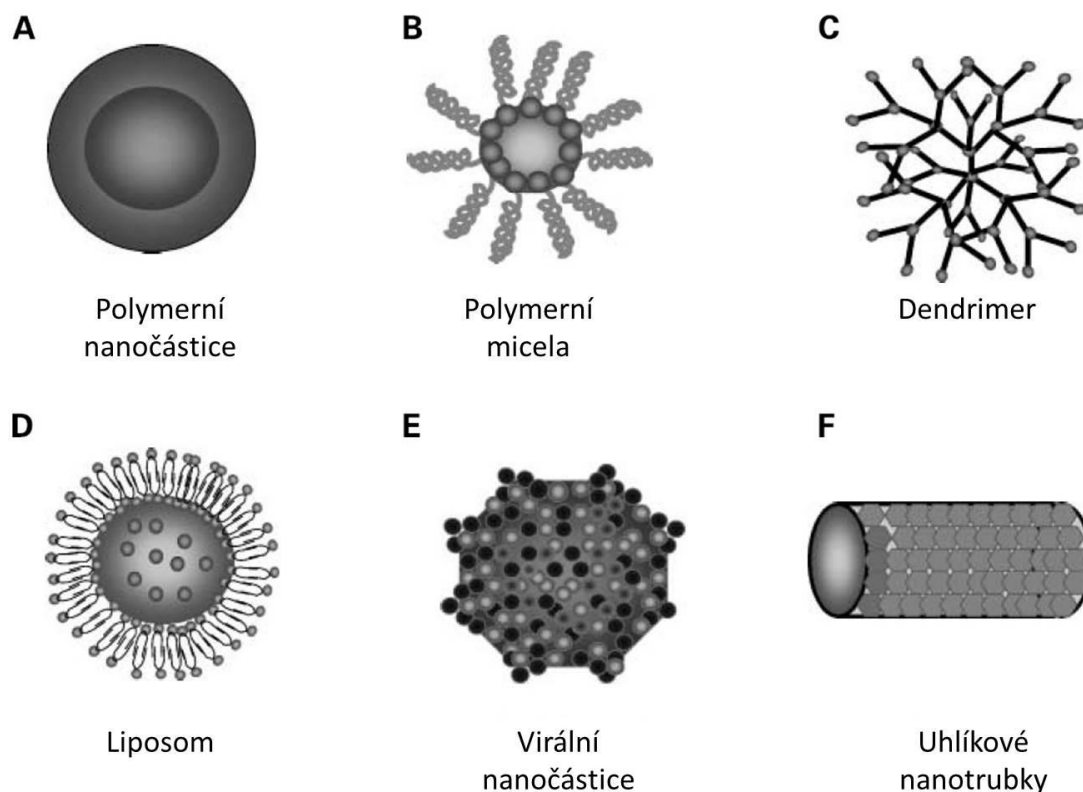
Obr. 1: Pasivní vs. aktivní cílení. V pasivním cílení (vlevo) mají částice tendenci pasivně difundovat skrz „děravou“ vaskulaturu nádorové tkáně a akumulovat se v důsledku EPR efektu. V případě aktivního cílení (vpravo) přítomnost ligandů na povrchu částic usnadňuje jejich interakce s receptory, na povrchu nádoru, což vede ke zvýšené akumulaci a přednostní buněčné absorpci [7].

Na vlastnosti nosičových systémů je kladena řada požadavků. Polymerní nosič léčiv by měl být stabilní v průběhu transportu, zejména by měla být stabilní chemická vazba léčiva na příslušný nosič. Dále je podstatná možnost řízeného uvolňování léčiva z nosiče, například procesem chemické hydrolýzy. Jak už bylo zmíněno, nosič léčiva musí mít určitou velikost a samozřejmě je potřeba, aby byl materiál nosiče biodegradovatelný.

Pro ideální nosič léčiva tedy platí, že nesená biologicky aktivní látka je v lékové formě neaktivní, bez jakéhokoli vlivu na organismus. V této formě je léčivo specificky dopraveno na místo požadovaného účinku, kde je aktivováno a působí pouze v požadované koncentraci a po dobu optimální k dosažení maximálního efektu. Léčivo, metabolity a všechny komponenty nosičového systému jsou následně po dosažení efektu eliminovány z organismu [3].

### 2.1.2 Druhy nosičových systémů

Nano- a mikročástice pro cílenou distribuci léčiv jsou založeny na různých materiálech zahrnující polymery (polymerní nanočástice, micely nebo dendrimery), lipidy (liposomy), viry (virální nanočástice) a dokonce také uhlíkové materiály (nanotrubky) (Obr. 2).



Obr. 2: Typy nanonosičů pro řízenou dopravu léčiv: (A) polymerní nanočástic, (B) polymerní micela, (C) dendrimer, (D) liposomy, (E) nanočástice založená na virech, (F) uhlíková nanotrubka [5].

### ***Polymerní nanočástice***

V závislosti na způsobu přípravy je léčivo vázáno buď pomocí fyzikálních interakcí, nebo pomocí kovalentní vazby na polymerní matici. Výsledné sloučeniny mohou mít strukturu například kapsule (polymerní nanočástice) či amfifilní „core-shell“ strukturu (polymerní micely).

Aby byl systém úspěšně použitelný jako nosič léčiva, musí být materiál chemicky inertní a bez vyluhovatelných nečistot. Materiály, které jsou v současné době používány či studovány v kontextu nosičů léčiv zahrnují například polyvinylalkohol, poly-N-vinyl-pyrrolidone či polyakrylamid. Do klinické praxe jsou zaváděny také některé syntetické a přírodní polymery s lineární strukturou náhodně svinutého klubka. Příkladem takového polymeru je polyethylenglykol. Důležitým faktorem při výběru polymeru pro nosičový systém je jeho biologická odbouratelnost. Polymer by měl být štěpen na biologicky akceptovatelné molekuly, které mohou být metabolizovány a vyloučeny z organismu normálními metabolickými cestami. Existuje mnoho faktorů, které budou ovlivňovat biodegradaci původního materiálu. Tyto faktory zahrnují jak chemické složení, tak molekulární strukturu, chemickou strukturu, difúzní kapacitu, morfologii, molekulární hmotnost a přítomnost iontových skupin [6].

Dalšími systémy vhodnými pro nosiče léčiv jsou polymerní micely. Polymerní micely vznikají samovolnou agregací na základě hydrofobních interakcí. Příslušný polymer tvořící micelu musí mít amfifilní charakter, neboli musí obsahovat část hydrofilní a část hydrofobní.



Tato podmínka je splněna u kopolymerů obsahující monomerní jednotky požadovaných vlastností. V úvahu přicházejí blokové a roubované kopolymery [8].

### ***Systém polyelektrolyt-tenzid***

Další možností přípravy nosičových systémů je strategie zahrnující kombinaci polymeru a tenzidu. Vázání obou komponent je zajištěno elektrostaticky. Výsledná částice má „core-shell“ strukturu, která s sebou nese řadu výhod [9; 10].

Polymer i tenzidový agregát tedy musí být nabitý, aby mezi nimi mohlo dojít k elektrostatické interakci. Polymerní řetězec, v němž jsou některé nebo všechny monomery nabité se nazývá polyion. Každý polyion je v roztoku obklopen ekvivalentním množstvím nízkomolekulárních opačně nabitých protiiontů pro zajištění elektroneutality. Kombinace polyionu a protiiontů se nazývá polyelektrolyt. Ve srovnání s polymery bez náboje mají polyelektrolyty vyšší rozpustnost ve vodě. Z důvodu vysokého elektrického náboje na polymerním řetězci zůstává velké množství protiiontů blízko řetězce polyionu, kde mohou být kovalentně vázány na nabitých skupinách, mohou být zapojeny v interakcích krátkého dosahu u těchto nabitých skupin ve formě iontových párů nebo mohou být drženy Coulombickými silami v iontové atmosféře blízko polyionu.

Podobnou představu o vázání protiiontů lze přijmout také pro systémy obsahující tenzidové protiionty, avšak v tomto případě může přistupovat do úvahy několik dodatečných efektů. Hlavními faktory, které ovlivňují vázání iontového tenzidu na polyelektrolyt s opačným nábojem, jsou hustota náboje na polyionu, hydrofobní charakter tenzidu (délka jeho uhlíkového řetězce) a přídatné přitažlivé síly mezi polyelektrolytem a micelami tenzidu v případě hydrofobních funkčních skupin přítomných na řetězci polyelektrolytu [11].

Příkladem systému polyelektrolyt-tenzid může být kombinace polysacharidu hyaluronanu a opačně nabitých tenzidů. Hyaluronan by mohl být vhodnou látkou pro cílenou distribuci léčiv vzhledem k jeho unikátním vlastnostem, biokompatibilitě a vazbě s receptorem CD44 (viz kapitola 2.2) [12; 13]. Hyaluronan je vysoce hydrofilní polymer s masivním hydratačním obalem, a proto jej nelze přímo využít pro přepravu nepolární látky. Jelikož má řada účinných léků hydrofobní charakter, musí být hyaluronan pro zmíněné použití hydrofobně modifikován, což ale může ovlivnit jeho biologickou aktivitu a kompatibilitu. Dalším způsobem je vazba hyaluronanu fyzikálními interakcemi s nějakým vhodným molekulárním partnerem, který zajistí rozpustnost hydrofobního léčiva. Kombinace hyaluronan-tenzid by mohla být vhodným typem takových agregátů. V těchto systémech je hydrofobní léčivo solubilizováno v hydrofobních prostorech tenzidů (v micelách), zatímco hyaluronan zajišťuje vnější ochranu a biokompatibilitu celého systému a obstarává cílení systému.

Speciálním podtypem těchto komplexních systémů jsou částice formované pomocí hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Takový hyaluronan má na své lineární struktuře „naroubován“ jeden či více hydrofobních uhlovodíkových řetězců o libovolné délce. Díky této struktuře je takový hyaluronan schopen samoagregace, interakce s hydrofobními molekulami přítomnými v jeho okolí. Ve vodných roztocích dochází ke tvorbě micelám podobným útvarů – kavit, které umožňují rozpustit hydrofobní domény ve vodě a mohou být tudíž využity při přípravě nosičů schopných transportovat lipofilní substance [14–16].

### **Liposomy**

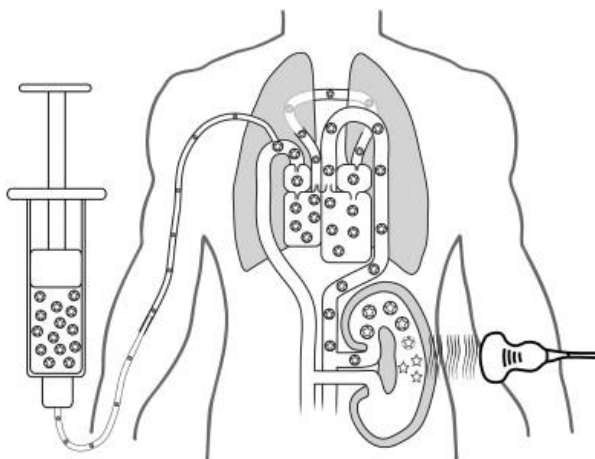
Liposomální dvojvrstvy mohou být složeny buď ze syntetických, nebo přírodních fosfolipidů. Převládající fyzikální a chemické vlastnosti liposomů jsou založeny na vlastnostech fosfolipidů, včetně propustnosti, hustoty náboje a sterické zábrany. Lipidové dvojvrstvy se uzavírají do sebe díky interakcím mezi molekulami vody a hydrofobními fosfátovými skupinami fosfolipidů. Tento proces tvorby liposomů je spontánní kvůli samouspořádání amfifilních fosfolipidů do dvojvrstvy. Zanesení léčiva do liposomu může být dosaženo pomocí několika metod (zformování liposomu ve vodném roztoku, který je nasycen rozpuštěným léčivem; použití organického rozpouštědla a metody výměny rozpouštědel; použití lipofilního léčiva nebo metoda pH gradientu). Pro prodloužení doby cirkulace liposomů v organismu jsou liposomy obalovány vhodným ochranným polymerem, například polyethylenglykolem. Liposomální nosiče protinádorových léčiv byly již schváleny pro humánní použití. Příkladem je Doxil<sup>®</sup> a DaunoXome<sup>®</sup>, což jsou liposomální nosiče antracyklinových léčiv doxorubicinu resp. daunorubicinu používané pro léčbu rakoviny spojované s AIDS (Kaposiho sarkomu a mnohočetného myelomu) [17].

### **Mikrobubliny**

Speciálním typem nosičů založených svou strukturou na micelách či liposomech jsou mikrobubliny. Mikrobubliny jsou plynem plněné koloidní částice s velikostí 1–8  $\mu\text{m}$ . Struktura zahrnuje plynové jádro, které je zabaleno do více nebo méně flexibilního obalu z bílkovin, tenzidů nebo polymerů. V současné době jsou mikrobubliny používány jako kontrastní částice pro ultrazvukovou diagnostiku a zobrazování. Do budoucna je očekáváno jejich využití v terapii jako účinný a bezpečný dopravce léčiv a genů.

Je známo, že po vystavení ultrazvuku se může zvýšit buněčné vstřebání polynukleotidů, proteinů a malých molekul léčiv [18–20]. Za tento efekt je zodpovědná kavitace. Pro vyvolání kavitace plynu je potřeba vysoká úroveň energie ultrazvuku, což může být škodlivé a klinicky nepraktické. Mikrobubliny nabízí různé přístupy pro ultrazvukem spuštěné vstřebávání bioaktivních látek. Tyto látky pak při jejich rezonanční frekvenci odpovídají na ultrazvukové pole oscilací. Při vysoké úrovni ultrazvukové energie může vysoká amplituda oscilace způsobit destrukci mikrobublin. Jestliže takové mikrobubliny nesou léčivo nebo gen, destrukce ultrazvukem cílených mikrobublin může být použita k lokální dopravě a uvolnění transportované látky (Obr. 3).

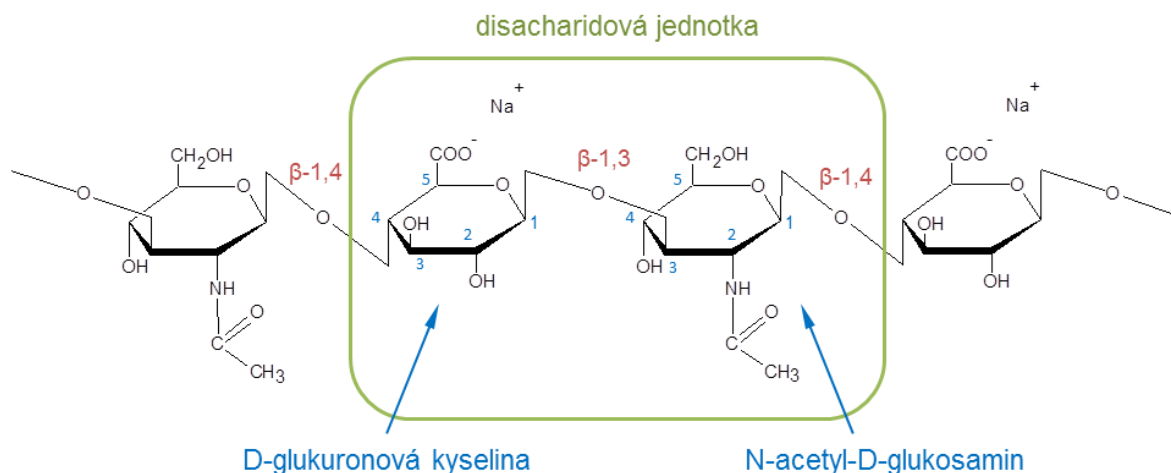
Molekuly léčiva mohou být spojeny s obalem mikrobubliny pomocí elektrostatických nebo hydrofobních interakcí, van der Waalsových sil nebo pouze na principu fyzikální enkapsulace [21; 22].



Obr. 3: Schéma znázorňující lokální dopravu léčiv do ledviny při využití mikrobublín a ultrazvuku. Mikrobublíny nesoucí léčivo (znázorněno hvězdičkami v kroužku) jsou injektovány intravenózně do krevního oběhu. Následně jsou mikrobublíny lokálně vystaveny ultrazvuku o vysoké energii, čímž uvolňují léčivo (znázorněno samostatnými hvězdičkami) na požadovaném místě [23].

## 2.2 Hyaluronan

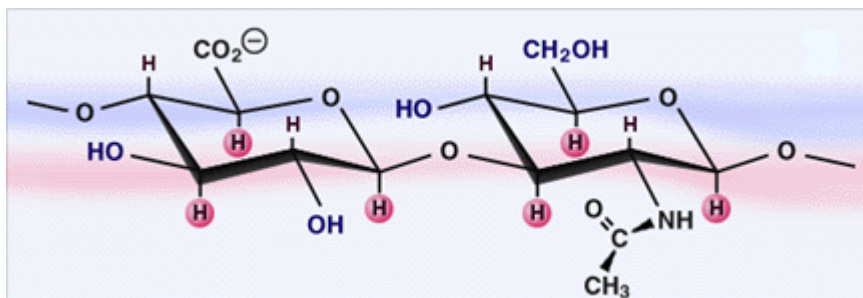
Hyaluronan existuje v živém organismu převážně v disociované formě sodné a draselné soli. Ve vodném roztoku má charakter polyaniontu kvůli disociaci karboxylových skupin v jeho struktuře. Molekula hyaluronanu (Obr. 4) má nerozvětvenou lineární strukturu tvořenou opakujícími se disacharidovými podjednotkami. Tyto jednotky obsahují D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin, které jsou spojeny pomocí střídajících se  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidických vazeb. Vazby jsou navíc stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky.



Obr. 4: Základní chemická struktura hyaluronanu

Obě sacharidové jednotky jsou prostorově spojeny glykosidovou vazbou, která v  $\beta$  konfiguraci dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují méně výhodné axiální polohy. V důsledku tohoto uspořádání se v molekule hyaluronanu vytváří hydrofobní oblasti tzv. hydrophobic patches, které jsou tvořeny právě axiálními vodíky a hydrofilní tvořené

ekvatoriálními postranními skupinami. Struktura molekuly je tedy energeticky velmi stabilní (Obr. 5) [24–29].



Obr. 5: Struktura hyaluronanu – vyobrazení prostorového uspořádání funkčních skupin [24]

Navzdory jednoduché primární struktuře vykazuje kyselina hyaluronová velmi rozdílné biologické účinky v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání. Největší zastoupení hyaluronanu můžeme nalézt v tkáních obratlovců, jelikož je tento biopolymer hlavní částí extracelulární matrix. Více než polovina z celkového obsahu hyaluronanu v organismu se nachází v kůži, čtvrtina pak kostech a kloubech. Zbytek je pak rozdělen mezi svaly a vnitřní orgány. V očním sklivci či v synoviální tekutině je hyaluronan majoritní složkou. Dále je nedílnou součástí chrupavek, kde hraje velmi důležitou roli. Vodné roztoky vysokomolekulárního hyaluronanu jsou velice viskózní, čímž snižují tření a tlumí nárazy v kloubech. Hyaluronan je také nedílnou součástí tkání, kde slouží jako strukturální organizátor díky schopnosti vázat se na ostatní komponenty matrix, například na kolagenová vlákna či jiné makromolekulární elementy [30].

### 2.2.1 Sekundární a terciární struktura

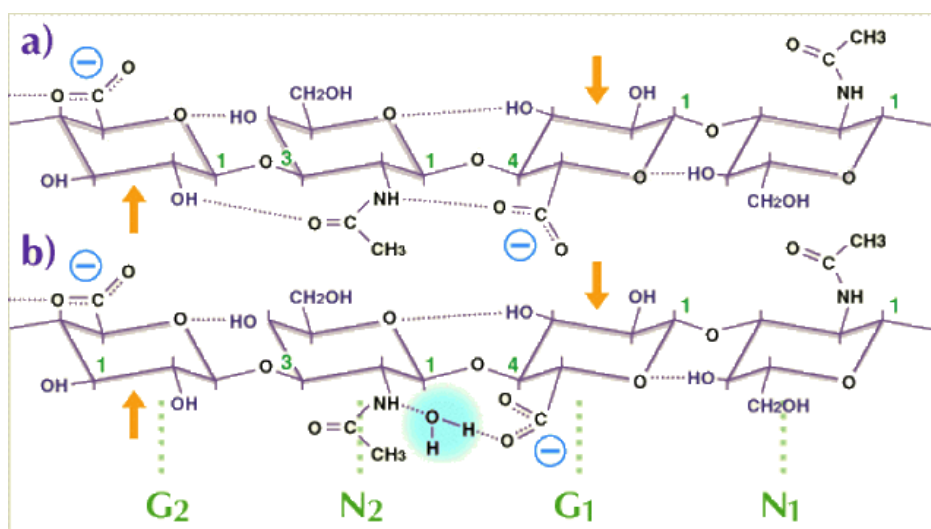
Na základě primární a sekundární struktury navrhl *Scott J. E. a kol.* [25], že řetězec hyaluronanu zaujímá v roztoku specifickou strukturu. Tuto strukturu si lze představit jako náhodně svinuté klubko, tzv. random coil. Nahodilost při formování struktury je však nepravděpodobná, uvědomíme-li si, že čím více náhodný systém je, tím méně informací je v tomto v systému uloženo. Vývoj živých organismů vždy tíhne ke snížení entropie, zvýšení počtu nesených informací a využívání trvalých a opakovatelných tvarů. Proto se na molekulu hyaluronanu pohlíží jako na systém, jež zaujímá preferované tvary [31].

Řetězce hyaluronanu obsahují dva typy vazeb – vazby v sacharidových jednotkách a vazby mezi jednotkami. Sacharidové jednotky si udržují relativně stálý tvar. Mezi těmito rigidními jednotkami existují glykosidické vazby, které sestávají z atomu kyslíku spojujícího jednotlivé sacharidy. Tyto vazby jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky (tečkovaná čára na Obr. 6). Atomy kyslíku jsou dvojvazné a jejich vazby jsou orientovány jako ramena písmene „V“. Substituenty připojené na koncích ramen se mohou otáčet o 360°. Ačkoli není možná úplná svoboda ve vytváření konfigurací substituentů okolo atomu kyslíku, každý glykosidický můstek poskytuje několik možných konfigurací. Vynásobením těchto možností počtem můstků v dlouhém řetězci získáme obrovské množství tvarů jedné molekuly. Uspořádání molekuly vypadá tedy jako náhodné, ale není tomu tak.

Pomocí NMR technik byla potvrzena přítomnost uspořádané struktury v roztoku, ve které každá disacharidová jednotka je pootočena o 180° oproti předchozí i následující. Dvěma otočkami se dostaneme zpět k původní orientaci. Struktura má tedy tvar dvakrát stočené

šroubovice, tzv. two-fold helix (ne dvoušroubovice, „double helix“, do níž jsou zapojeny dva molekulární řetězce), ve které hraje důležitou roli voda jako stabilizační faktor.

Význam této sekundární struktury spočívá v existenci hydrofobní oblasti ve dvojité spirále o velikosti osmi uhlíkových atomů. Hyaluronan má tudíž vlastnosti vysoce hydrofilního materiálu současně s hydrofobními doménami. Jedná se tedy o amfifilní molekulu [25]. Z tohoto důvodu molekula zaujímá v roztoku strukturu, která zabírá poměrně rozlehlou doménu. Doménová struktura hyaluronanu má zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny se mohou volně šířit rozpouštědlem uvnitř domény. Velké molekuly, jako bílkoviny, jsou částečně vylučovány z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti. Hyaluronanové sítě v doméně poskytují méně prostoru pro jiné molekuly, které jsou větší. To vede k pomalejší difúzi makromolekul skrz sítě a jejich nižším koncentracím v síti ve srovnání s volnými prostory v okolí hyaluronanu. Hyaluronanové řetězce se v roztoku neustále pohybují, což způsobuje neustálou změnu velikosti efektivních pórů v síti. Statisticky mohou existovat všechny velikosti pórů, jen s různou pravděpodobností, což znamená, že všechny molekuly mohou projít hyaluronanovou sítí, ale s různým stupněm zpomalení v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [25].

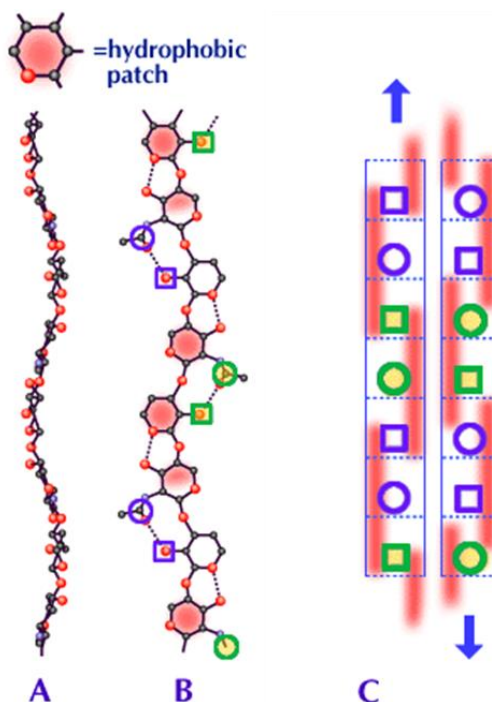


Obr. 6: Tetrasacharid obsažený v řetězci hyaluronanu, který se skládá ze dvou opakujících se disacharidových jednotek vykazujících ve vodě preferovanou konfiguraci. G označuje zbytek kyseliny glukuronové, N značí N-acetylglukosamin. Tečkovaná čára znázorňuje vodíkové vazby, které jsou přítomné v každém tetrasacharidu hyaluronanu. V nevodném prostředí (dimetylsulfoxid) je vodný můstek mezi acetamidem (N2) a karboxylem (G1) nahrazen přímou vodíkovou vazbou [25].

### 2.2.2 Sít'ování hyaluronanu

Řetězce hyaluronanu mohou také agregovat mezi sebou navzájem, částečně pomocí přitažlivých sil mezi hydrofobními oblastmi. Plochá stuhovitá sekundární struktura má specifické vlastnosti. Obě strany stuhy jsou identické, ale jedna strana je v opačném směru oproti druhé, jsou tedy antiparalelní. Následkem toho platí, že co je možné na jedné straně stuhy, je možné také na druhé. Agregáty mohou tedy vznikat z obou stran (Obr. 7).

Elektrostatické repulze mezi zápornými náboji, které by mohly podporovat disociaci agregátů, jsou v tomto případě překonány hydrofobními interakcemi a vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou. Síly, které drží síť pohromadě, jsou poměrně slabé, a proto se agregáty neustále tvoří a zanikají v závislosti na okolních podmínkách.



Obr. 7: Zobrazení interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu. A a B znázorňují zobrazení molekuly hyaluronanu, červené oblasti značí hydrofobní místa na střídajících se stranách polymerního řetězce, kroužky reprezentují acetamidovou skupinu a čtverečky karboxylovou skupinu. C znázorňuje schéma možného duplexu mezi dvěma molekulami hyaluronanu v bočním náhledu. Zúčastněné 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 [24].

### 2.2.3 Metabolismus

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celou dobu života tkáně. Syntéza je většinou vyvážena s rozkladem, čímž se udržuje konstantní koncentrace hyaluronanu v tkáni. Poločas rozkladu molekuly hyaluronanu v chrupavce je obvykle dva až tři týdny. Poločas rozpadu hyaluronanu v krvi je překvapivě krátký, jen několik minut. V některých případech však převládá syntéza nebo rozklad hyaluronanu. Příkladem mohou být keratinocyty, ve kterých převažuje syntéza. Odhaduje se, že téměř jedna třetina z celkového množství hyaluronanu v lidském těle je metabolicky odstraněna a nahrazena během průměrného dne [24].

Enzymy, které produkují hyaluronan se nazývají hyaluronan syntázy (HAS). Jde o membránové vázané enzymy, které využívají UDP- $\alpha$ -N-acetyl-D-glukosamin a UDP- $\alpha$ -D-glukuronát jako substráty pro výrobu glykosaminoglykanu hyaluronanu na buněčném

povrchu za následného vytlačení cytoplazmatického produktu přes membránu do extracelulárního prostoru, což umožňuje neomezený růst polymeru. V těle savců se vyskytují tři druhy tohoto enzymu (HAS1, HAS2 a HAS3). Dva z hlavních rozdílů jednotlivých izoform jsou délka řetězce formované molekuly hyaluronanu a snadnost s jakou může být molekula uvolněna z buněčného povrchu.

Rozklad hyaluronanu v těle savců zajišťují tři typy enzymů: hyaluronidázy,  $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázy. Po celém těle se tyto enzymy vyskytují v různých formách, intracelulárně i v séru. Obecně platí, že hyaluronidázy štěpí vysokomolekulární hyaluronan na oligosacharidy, zatímco  $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázy dále degradují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících terminálních cukrů. Produkty degradace hyaluronanu, oligosacharidů a hyaluronanu o velmi nízké molekulové hmotnosti vykazují antiangiogenní vlastnosti. Pomocí katalýzy hydrolyzy kyseliny hyaluronové, hlavní složka intersticiální bariéry, hyaluronidázy snižují viskozitu kyseliny hyaluronové, čímž se zvyšuje propustnost tkání. Proto jsou hyaluronidázy využívány v medicíně v kombinaci s dalšími léky, aby se urychlilo jejich rozptýlení a doručení. Nejčastější aplikací je oční chirurgie, kdy se používají v kombinaci s lokálními anestetiky [32; 33].

#### 2.2.4 Funkce a možnosti využití kyseliny hyaluronové

Intracelulární hyaluronan je lokalizován především v cytoplazmě nebo v jádru buňky nebo je vázán na cytoplazmatickou membránu. Intracelulární hyaluronan má funkci hlavně signalizační, váže se na různé receptory.

Extracelulární hyaluronan je extrémně hygrokopický a je nezbytným stavebním prvkem chrupavky, epidermis a dalších tkání, v nichž je potřeba udržet vysokou elasticitu a pevnost (sklivec, pupečník). Pericelulární hyaluronan může agregovat s fosfolipidy, s různými proteoglykany, versicanem či některými proteiny. Prostřednictvím vazby na buněčné receptory CD44 a RHAMM reguluje také buněčnou signalizaci.

Kyselina hyaluronová je mnohdy považována pouze za molekulu extracelulární matrix. Minulý a současný výzkum však objevuje nové a nové funkce této molekuly jak na buněčné, tak na orgánové úrovni.

Všechny získané znalosti o této molekule poukazují na to, že kyselina hyaluronová je molekula velkého významu. Je nutná pro správnou funkci organismu. Její všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů, jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran a dalších, ukazuje na celou řadu možností využití této molekuly jako léčivé látky.

Díky svým unikátním vlastnostem našla kyselina hyaluronová již řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích. V revmatologii, oftalmologii, diabetologii, farmaceutické technologii a dalších oblastech, například při hojení ran [34; 35].

Hyaluronan spolu s ostatními glykosaminoglykany a kolagenem tvoří důležitou složku mechanismu znovuoobnovení poraněné tkáně. Během prvních dnů po vzniku zranění je hyaluronan převládajícím glykosaminoglykanem v ráně. Při léčbě například kožních či očních poranění působí výrazně příznivě. U kožních popálenin a ran dochází k urychlení epitelizace



a projevuje se schopnost hojení bez jizev. Také při terapii očních onemocnění je pozorováno rychlejší hojení poškozené rohovky [36; 37].

Díky své vysoké biokompatibilitě a přítomnosti v extracelulární matrix tkáně získává hyaluronan popularitu jako vhodný materiál pro tkáňové inženýrství. Kvůli vysoké rozpustnosti nativního hyaluronanu ve vodě a jeho krátkému biologickému poločasu rozpadu je pro tyto aplikace častěji využíván zesítený modifikovaný hyaluronan ve formě hydrogelu [38–40].

Hyaluronan byl použit k syntéze biologických scaffoldů pro aplikaci při hojení ran. Tyto scaffoldy obvykle obsahují proteiny jako je fibronectin, které jsou navázány na hyaluronan, pro usnadnění migrace buněk do tkáně. Toho se využívá zejména u osob trpících na chronické diabetické rány [40–42].

Hyaluronan se používá také k léčbě osteoartrózy kolenního kloubu. Po aplikaci série injekcí do kloubu dochází ke zvýšení viskozity kloubní tekutiny. To má za následek promazání a odpružení kloubu a analgetický účinek. Bylo také dokázáno, že hyaluronan má pozitivní biochemický efekt na chrupavku [43; 44]. Tkáň chrupavky je tvořena pouze z 5 % buňkami, zbytek tvoří kolagen a proteoglykany, které vytvářejí velmi pevnou, ale také pružnou pojivovou hmotu. Hyaluronan se zde uplatňuje jako stavební glykosaminoglykan a spojuje molekuly aggrecanu složené z chondroitinsulfátu a keratansulfátu [45].

Hyaluronan je dnes také široce používán jako aktivní látka v řadě kosmetických přípravků, jelikož je hyaluronan schopen neutralizovat volné kyslíkové radikály, čímž chrání kůži před působením UV záření. Pleťové mléko s hlavní účinnou složkou hyaluronanem sodným je používáno k léčbě atopického ekzému [46; 47].

## 2.2.5 Role kyseliny hyaluronové při kancerogenních procesech

Kyselina hyaluronová má velký vliv při kancerogenním procesu. Hyaluronan stimuluje buněčné pochody jako proliferaci, migraci, agregaci a angiogenezi a inhibuje apoptózu. Dnes je známo nejméně 14 typů karcinomů, u kterých byla zjištěna zvýšená koncentrace hyaluronanu, a to jak přímo v buňkách samotných, tak i v mezibuněčném stromatu, přičemž vždy je akumulace hyaluronanu spjata se špatnou prognózou pro pacienta, agresivním růstem nádoru a metastázováním a mnohdy také i s rezistencí vůči klasické chemoterapeutické léčbě. Není však zcela jasné, zdali jsou tato zjištěná množství hyaluronanu vlastní příčinou anebo spíše až důsledkem některého jiného patologického pochodu [48]. Hyaluronan není sám schopen vznik nádoru vyvolat, avšak po vyvolání jeho tvorby již vzniklým nádorovým shlukem, je schopný jeho vývoj všemožně podporovat. Může se tedy stát zbraní proti rakovině, pokud bychom včas zamezili interakci hyaluronanu s příslušným nádorem [49].

Při zmíněných procesech je účinek hyaluronanu na buněčné úrovni a následně i na úrovni tkáňové a orgánové zprostředkován vazbou na charakteristické receptory. Hlavním receptorem pro kyselinu hyaluronovou je molekula CD44 [50–53]. CD44 je transmembránový receptor všudypřítomný v lidském těle. Vazba hyaluronanu na tento receptor vede k celé řadě buněčných odpovědí, jako jsou přilnavost, organizace a obrat extracelulární matrix na povrchu buněčné membrány a zprostředkování migrace lymfocytů v průběhu zánětu. Tento receptor může existovat v celé řadě izoform [48; 54]. Jedním z receptorů, který se svojí funkcí a expresí podobá molekule CD44 je RHAMM. Po navázání



hyaluronanu je hlavní funkcí RHAMM zprostředkovat adhezi a buněčnou hybnost. Oba receptory se podílejí na regulaci přenosu buněčných signálů.

Solidní neboli pevné nádory představují pevnou masu transformovaných buněk, které proliferují a omezují okolní tkáň. Maligní neboli zhoubný nádor je schopný proliferovat do okolní tkáň, jeho buňky jsou schopné migrovat a vytvořit tak vzdálené metastázy nádoru. Přeměnu benigního nádoru (který většinou neohrožuje pacienta na životě) v maligní nádor může stimulovat právě jeho interakce s hyaluronanem. Extracelulární nahromadění hyaluronanu bylo pozorováno v karcinomu plic, prsou, prostaty, ovarií, močového měchýře, dělohy, štítné žlázy a v plicním adenokarcinomu a bylo spojené se zvýšeným metastazováním nádoru [55–57]. Existují různé teorie, které se snaží vysvětlit mechanismy akumulace hyaluronanu v těchto karcinomech. První možností je zvýšená syntéza hyaluronanu. Druhou možností je nízký katabolismus hyaluronanu v těchto nádorech [58].

Interakce hyaluronanu s CD44 receptorem může stimulovat proliferaci a migraci nádoru. DNA takto vzniklých nádorových buněk rychle mutuje a časem mutují i geny kontrolující buněčný cyklus. Tyto zmutované geny pak umožňují nekontrolovatelnou proliferaci nádoru. Proliferace je naopak omezována množstvím živin, a proto nádor potřebuje stimulovat angiogenezi, ale i to umožňuje právě interakce CD44 a hyaluronanu.

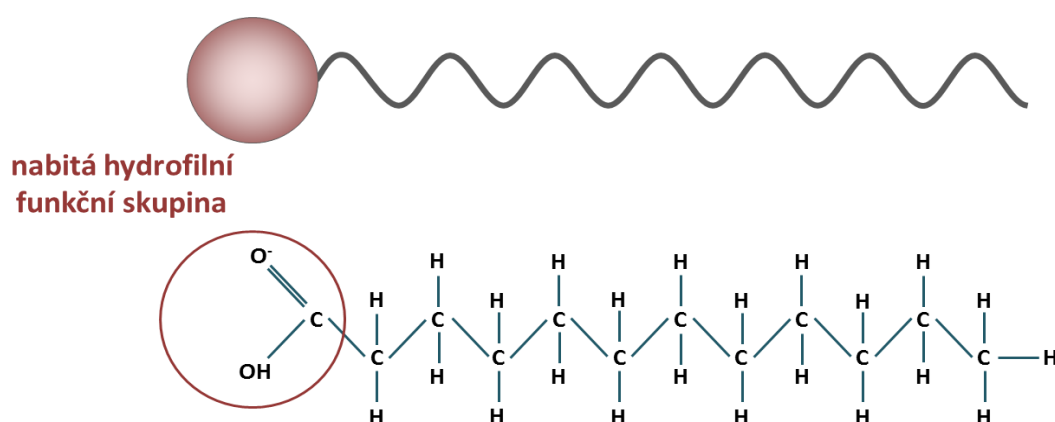
Akumulace hyaluronanu v prostředí podporuje onkogenezi a nádorovou angiogenezi. Extracelulární hyaluronan urychluje vznik monocytů a makrofágů, které jsou důležité pro angiogenezi. Tyto buňky se pohybují po síti z polymerů hyaluronanu a uvolňují zánětlivé růstové faktory, které se zde zachycují a podněcují vznik krevních kapilár. Bohužel imunitní buňky, které se díky tomu dostanou k nádoru, proti němu nejsou schopné bojovat, interakce hyaluronanu a CD44 jim totiž brání produkovat volné kyslíkové radikály [59].

Jak už bylo řečeno, akumulace hyaluronanu způsobuje vznik chemirezistence vůči mnoha chemoterapeutikům (například doxorubicin, taxol, vincristin, cisplatina a další). Klíčovou roli přitom hraje jeho interakce s receptorem CD44, která aktivuje vyloučení těchto toxických látek z buňky ven. Druhým mechanismem způsobujícím tuto rezistenci je vznik hyaluronanového pláště kolem rakovinných buněk, který chemoterapeutika nepropustí dovnitř. Velmi slibnou možností obrany proti vzniku takovéto chemorezistence je zabránění interakce hyaluronanu a CD44. Toho lze dosáhnout několika různými způsoby. První možností je znemožnění akumulace hyaluronanu, toho lze docílit buď inhibicí jeho produkce, nebo naopak stimulací jeho katabolismu. Druhou možností je zablokování vazebného místa pro hyaluronan na receptorech CD44. Toho lze dosáhnout podáváním oligomerů hyaluronanu o určité velikosti. Tato léčba je obvykle spojená s podáváním některého z chemoterapeutických léků, samotné oligomery hyaluronanu totiž rakovinné buňky nemohou zničit. Zatím je zkoušena hlavně na *in vitro* a *in vivo* experimentálních modelech [60]. Třetí možností jak zamezit interakci hyaluronanu s CD44, je inhibovat expresi receptorů CD44, nebo stimulovat jejich štěpení. Pokud by se to podařilo, interakce hyaluronanu a CD44 by již nebyla možná a hyaluronan by nemohl podporovat rakovinné bujení.

## 2.3 Tenzidy a micelární agregáty

Molekuly tenzidů mají v důsledku své amfifilní struktury tendenci adsorbovat se na rozhraní fází a schopnost organizovat se v roztoku a tvořit tak agregáty. Tento proces je poháněn termodynamicky a je spontánní. Výsledné agregáty se pak nazývají asociativní koloidy. Tyto koloidní struktury jsou formovány jako výsledek fyzikálních interakcí mezi amfifilními molekulami tenzidů.

Schopnost vytvářet micely je tedy podmíněna zvláštní strukturou molekul. Tato podmínka vyžaduje, aby molekula obsahovala hydrofilní skupiny, které svou velkou afinitou k rozpouštědлу zaručují značnou rozpustnost, a aby současně druhá část molekuly byla sama o sobě v daném prostředí nerozpustná, tedy hydrofobní. Takové molekuly se nazývají amfifilní.



Obr. 8: Struktura molekuly tenzidu

Amfifilní molekuly (Obr. 8) mají obecný vzorec  $RX$ , kde  $R$  označuje uhlovodíkový řetězec („chvost“ tenzidové molekuly) a  $X$  značí polární skupinu (hlavu tenzidové molekuly). Uhlovodíkový řetězec  $R$  má běžně osm uhlíkových atomů a víc, může být nasycený nebo nenasycený, lineární nebo rozvětvený a může také obsahovat aromatická jádra. Polární skupiny  $X$  mohou být neiontové nebo iontové (aniontové, kationtové či amfoterní). Neiontové skupiny jsou nejčastěji polyoxyethylenové členy  $-(C_2H_4O)_x-$  s relativně krátkými řetězci, ve kterých  $x$  leží v rozmezí 3 až 20 a víc. Mezi tyto tenzidy patří komerčně dostupný a známý Tween<sup>®</sup> a Triton<sup>®</sup>. Iontové skupiny jako sírany  $(-SO_4^-)$ , siřičitany  $(-SO_3^-)$  a uhličitanu  $(-CO_2^-)$  jsou běžné aniontové skupiny, různé kvarterní amoniové skupiny  $(-NH_3^+)$  jsou nejčastějším substituentem v kationtových tenzidech. Amfoterní tenzidy kombinují kladně i záporně nabitě skupiny. V případě iontových tenzidů je amfifilní iont doprovázen protiiontem; přičemž uvažujeme pouze jednomocné protiiony. Obecně můžeme iontové tenzidy napsat jako  $M^+S^-$ , přičemž předpokládáme 100% disociaci na  $M^+$  a  $S^-$  ionty. Příkladem může být běžně známý tenzid tohoto typu dodecylsírany sodný (SDS), ve kterém  $M^+ = Na^+$  a  $S^- = C_{12}H_{25}SO_4^-$ .

### 2.3.1 Micely a kritická micelární koncentrace

Označíme-li amfifilní molekulu  $S$ , pak může být proces asociace popsán reakcí:



kde  $S_n$  je micela se stupněm agregace  $n$ . Tato reakce je první ze série reakcí rostoucí komplexnosti agregátu, která je používána k vyjádření procesu micelizace. Reakce (1) je reverzibilní; zředění systému posune rovnováhu reakce zpět ve prospěch monomerního tenzidu.

Asociativní povrchově aktivní látky tvoří ve velkých zředěních pravé roztoky. Při určité koncentraci dojde v systému k samovolné agregaci molekul do útvarů koloidní velikosti. Hnací silou agregace jsou hydrofobní interakce. Jejich podstatou je poměrně značný vzrůst entropie (cca  $140 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) při přechodu tenzidu z monomerního do agregovaného stavu. Vznikající útvary se nazývají **micely** a příslušná koncentrace, při které k agregaci dochází, se nazývá **kritická micelární koncentrace** (označována z angl. CMC). Pod touto koncentrací existují molekuly tenzidů v systému pouze ve formě jednotlivých molekul, nad ní všechny přidávané molekuly tenzidu asociují do micel. CMC je tedy nejvyšší možná koncentrace, při níž je tenzid v roztoku v molekulové (iontové) formě [61–63].

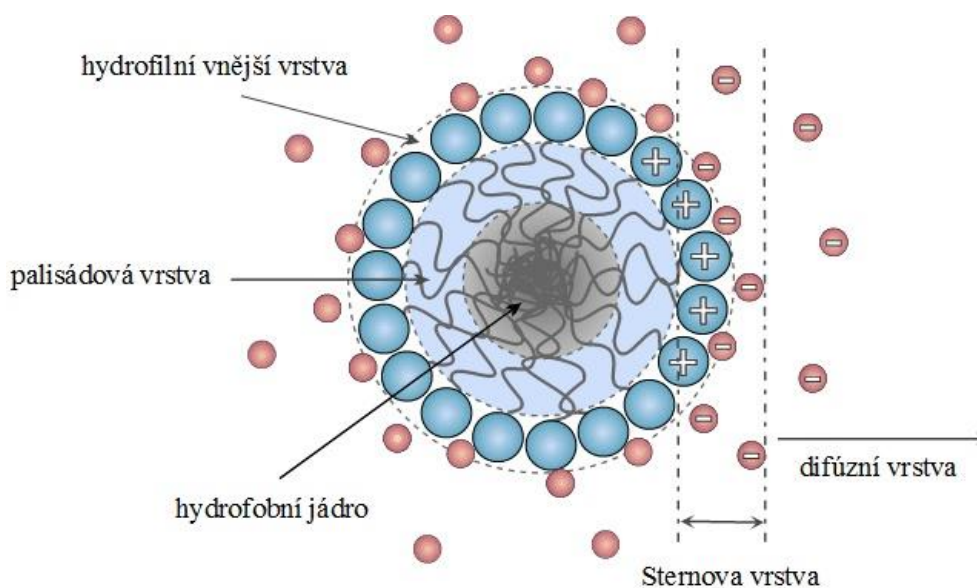
Experimentálně bylo dokázáno, že se micely tvoří ve vodném roztoku náhle při CMC a koncentrace monomerního tenzidu v roztoku se nad CMC mění jen minimálně. Tento typ chování je charakteristický pro fázovou rovnováhu. Z hlediska energie je vždy nutná nějaká minimální hodnota  $n$  pro vyloučení hydrofobního řetězce z vodného roztoku. Jakmile je roztok dost koncentrovaný pro agregaci s danou kritickou hodnotou  $n$ , každá další přidaná molekula tenzidu bude agregovat do micel.

Lze říci, že povaha reakce (reakční rovnováha či fázová rovnováha) bude záviset na velikosti formovaných micel. Ve vodném systému je obecně používaným modelem model fázové rovnováhy, zatímco na nevodný systém je lepší aplikovat model chemické rovnováhy.

### 2.3.2 Vnitřní struktura micel

Při kritické micelární koncentraci se tenzidové molekuly seskupují do přibližně sférických agregátů obsahujících 50–150 amfifilních jednotek. Pro účely orientace si představme micelu vytvořenou ve vodném prostředí, kdy uhlovodíkové řetězce směřují do středu micely a tam agregují mezi sebou, polární hlavy jsou orientovány směrem ven z micely a tvoří tak tzv. obal micely. Vyloučení uhlovodíkových řetězců tenzidových molekul z polárního média je důležitou hnací silou micelizace.

Struktura micely (Obr. 9) je tedy tvořena vnější vrstvou, jádrem a tzv. palisádovou mezivrstvou. V iontových micelách jsou uhlovodíkové řetězce obklopeny obalem, který je podobný koncentrovanému roztoku elektrolytu. Tento obal obsahuje iontové tenzidové hlavy a vázané protiionty v oblasti nazývané Sternova vrstva. V této oblasti je přítomna také voda a to ve formě volných molekul nebo jako hydratační obal. Zbývající protiionty existují kromě Sternovy vrstvy také volně v roztoku. Tyto ionty podléhají dvěma druhům sil: elektrostatické přitažlivosti, která je poháněna směrem k micelám a tepelnému pohybu, díky němuž tíhnou k dispergaci. Výslednicí těchto opačných sil je difúzní iontová atmosféra, druhá polovina dvojité vrstvy náboje při povrchu koloidu.



Obr. 9: Struktura kladně nabitých micely

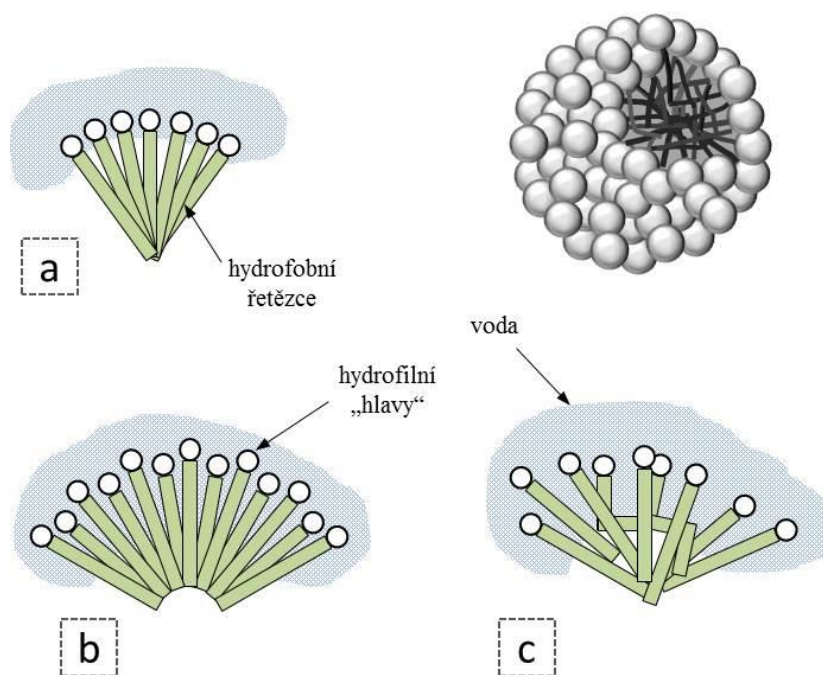
Velikost difúzní části dvojité vrstvy iontové atmosféry micely závisí na obsahu elektrolytu v roztoku. S rostoucím obsahem elektrolytu se iontová atmosféra smršťuje. Iontové micely budou migrovat v elektrickém poli a iontová atmosféra bude vlečena spolu s nimi. Bylo zmíněno, že existují vázané a volné molekuly vody. Jak vázané ionty, tak iontové tenzidové skupiny jsou hydratovány přibližně do stejné míry a to v micelle i jako samostatné ionty. Důležitým faktorem Sternovy vrstvy iontových micel je, že vázané protiiony pomáhají překonat elektrostatické odpuzování mezi nabitými hlavami tenzidových molekul. Nebylo by správné si myslet, že iontové micely formují a poté adsorbují protiiony. Sternova vrstva je část micely a energie potřebná na její zformování je součástí termodynamiky micelizace.

Při charakterizaci uhlovodíkové jádra micel je nejdůležitější, jak délka uhlovodíkových řetězců ovlivňuje micelární strukturu a také poloha hydratační vody. V první aproximaci může být jádro micely považováno za kapku uhlovodíkové kapaliny s maximálním poloměrem rovnajícím se délce plně nataženého uhlovodíkového řetězce. Podělením povrchu micely agregačním číslem dostaneme příslušnou oblast na povrchu micely náležející jedné tenzidové hlavě. Pokud budeme za agregační číslo uvažovat hodnotu mezi 50 a 100, dostaneme plochu 0,35 až 0,69 nm<sup>2</sup> připadající na jednu skupinu, což je zcela věrohodné číslo s ohledem na chování tenzidů v monovrstvách [62].

Alkylové řetězce tenzidových molekul nejsou jen „linky“ bez jakékoli tloušťky, které se mohou rozbíhat ven ze společného středu v neomezeném počtu. Místo toho řetězce samotné zabírají určitý objem (na Obr. 10 vyznačen pomocí obdélníků). Tenzidové hlavy (polární skupiny) jsou na Obr. 10 znázorněny pomocí koleček a modré oblasti zastupují oblasti vody. Obr. 10a schematicky znázorňuje, že blízké sbalení polárních hlav vyžaduje nepřijatelné překrývání konců řetězců, je-li poloměr jádra roven délce plně nataženého řetězce. Na Obr. 10b je poloměr micely znázorněn také pomocí obdélníků, ale uspořádaných tak, aby nedocházelo k překrývání. Otvor vytvořený ve středu micely je artefaktem tohoto zobrazení, zatímco klíny volného prostoru, které umožňují vodě penetrovat hluboko do jádra micely, jsou reálným znakem tohoto modelu. Znázornění na Obr. 10c se od předchozích modelů odlišuje, a to tak, že některé tenzidové molekuly vyčnívají z povrchu jádra dál než ostatní,

čímž zmírňují mačkání řetězců ve středu micely. Obecně je uznávána určitá flexibilita řetězců, která některým řetězcům umožňuje zkroucení a ohnutí takovým směrem, aby došlo k vyplnění klínu, který jinak obsahuje vodu. Kvůli výstupkům části uhlovodíkových řetězců do Sternovy vrstvy, získává jádro nerovný, drsný povrch.

Jedním z následků nerovného povrchu micelárního jádra je nárůst kontaktu mezi vodou a uhlovodíky. Obr. 10b vypadá nerealisticky kvůli tomu, že kontakt vody a uhlovodíků je v tomto modelu sotva menší než v objemu roztoku, což je stav, který zřejmě oslabuje důležitou část hnací síly micelizace. Model na Obr. 10c minimalizuje efekt kontaktu vody a uhlovodíků bez eliminace hnací síly a umožňuje zachycení části vody ve struktuře micely, což představuje část micelární hydratace, která nebyla vysvětlena pomocí hydratace iontů a nabitých skupin.



Obr. 10: Tři možná schematická zobrazení struktury micel: (a) řetězce překrývající se ve středu micely, (b) voda penetrující do jádra, (c) vyčnívající propletené řetězce opravující nedostatky modelu (a) a (b)

Nerovný povrch jádra představený na Obr. 10c poukazuje na to, že jádro micely by mělo být správně uvažováno jako dvě odlišné oblasti – vnitřní jádro, které je v podstatě bez vody a hydratovaný obal mezi vnitřním jádrem a polárními skupinami. Tento částečně vodný obal je někdy nazýván jako palisádová vrstva.

Rozsah, do kterého vyčnívají uhlovodíkové řetězce do vody nelze snadno určit, ale můžeme uvažovat o objemu palisádové vrstvy. Za předpokladu, že tloušťka palisádové vrstvy je definována určitou částí uhlovodíkového řetězce, například třemi metylenovými skupinami, které pro dodecylový řetězec odpovídají vnějším 3/12 poloměru, platí, že poloměr bezvodého vnitřního jádra je 3/4 z celkové délky řetězce. Třetí mocnina této části ukazuje, že  $(3/4)^3 = 0,42$ , což je část původního jádra, která je bezvodá a 58 % jádra je hydratováno (jiný poměr částí bychom dostali při zvážení jiného počtu metylenových skupin uhlovodíkového řetězce). Co je na tomto výpočtu významné, je to, že hydratace poměrně malé části řetězce má

za následek přítomnost vody ve významně rozsáhlé části objemu micely. Přítomnost vody v micelle byla již experimentálně ověřena [62; 63].

### 2.3.3 Solubilizace

Velmi důležitou vlastností micel, která má zvláštní význam v lékařství, je jejich schopnost zvýšení rozpustnosti ve vodě obtížně rozpustných látek [64–66]. V této souvislosti může být solubilizace definována jako spontánní rozpouštění látky reverzibilní interakcí s micelami povrchově aktivní látky ve vodě za vzniku termodynamicky stabilního izotropního roztoku se sníženou termodynamickou aktivitou solubilizovaného materiálu. Vyjádříme-li rozpustnost špatně rozpustné sloučeniny jako funkci koncentrace povrchově aktivní látky, můžeme pozorovat, že rozpustnost látky bude velmi nízká, dokud koncentrace povrchově aktivní látky nepřesáhne hodnotu kritické micelární koncentrace. Zvyšování koncentrace tenzidu nad CMC má za následek lineární nárůst rozpustnosti, což indikuje, že je rozpustnost vztažena k micelizaci. Z termodynamického hlediska může být solubilizace považována za normální rozdělení nepolární látky mezi dvě fáze, tj. mezi micely a vodnou fázi. Obecně existuje maximální limit pro množství materiálu, které může být solubilizováno v daném roztoku tenzidu, za tímto limitem vykazuje přebytek solubilizátu normální fázovou separaci.

Již delší dobu existuje značný zájem o stanovení lokalizace solubilizované komponenty uvnitř micely. Jak již bylo řečeno, při pohybu směrem do středu micely dochází ke změně prostředí od polárního vodného k nepolárnímu uhlovodíkovému. Ačkoli detailní struktura různých zón je sporná, bezpochyby existuje v micelle gradient polarity. V souladu s tím, může být jakákoli experimentální vlastnost, která je citlivá na molekulární prostředí, použita k monitorování místa, kde se v micelle solubilizát nachází. Spektroskopická měření či rezonanční metody jako je například nukleární magnetická rezonance, jsou vhodné metody pro určování mikroprostředí solubilizovaných molekul [63; 64].

### 2.3.4 Závislost fyzikálních veličin na koncentraci tenzidu

Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují typickým průběhem závislostí různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ty vykazují zlomy, které u jiných roztoků nepozorujeme. Tento zlom potvrzuje skutečnost, že v roztoku dochází při CMC k významným změnám. Existence těchto typických závislostí nám umožňuje využít rozličné metody k určení CMC, jakožto jednoho z nejdůležitějších hodnotících parametrů u asociativních koloidů. CMC se běžně stanovuje ze zlomu koncentrační závislosti povrchového napětí [67], dynamického rozptylu světla [68] a dalších fyzikálních parametrů.

Dnes je pro svou rychlost a jednoduchost velice populární metodou pro stanovení CMC metoda založená na měření fluorescence. Konkrétně například metodě využívající pyren a jeho deriváty jako fluorescenční sondy je kvůli vysoké citlivosti věnována vysoká pozornost. Je dobře známo, že optické vlastnosti fluorescenčních sond jsou silně ovlivňovány polaritou jejich prostředí. Pod CMC se budou sondy vyskytovat hlavně ve vodném prostředí, zatímco nad CMC jsou inkorporovány dovnitř micel. V případě nedostatečného objemu micely není fluorescenční sonda plně včleněna do hydrofobního prostoru, není úplně rozpuštěna v jádře micely. Změna prostředí sondy se projeví změnou intenzity vibračních pásů emisních či excitačních spekter a následně zlomem v koncentračních závislostech [67; 69; 70].

## 2.4 Optické vlastnosti koloidních soustav

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou silně závislé zejména na fyzikálních vlastnostech koloidních částic – především jejich velikosti, elektrické vodivosti a vlastní absorpci světla látkou tvořící disperzní fázi. Nejvíce informací z jevů spojených s interakcí světla s koloidními soustavami poskytují absorpce a rozptyl světla.

### 2.4.1 Absorpce světla

Při absorpci elektromagnetického záření (kvanta světelné energie) molekulou nastává interakce elektrické složky světla s elektrickým polem molekuly, které je vytvářeno pohybujícími se elektrony kolem jednotlivých jader atomů. Elektrony se pohybují v orbitalech, jejichž energie jsou kvantovány. Jestliže elektrony zaujímají nejnižší energetické stavy, říkáme, že jsou v základním stavu. Pohlcení fotonu molekulou má za následek zvýšení celkové energie a přechod elektronů molekuly z vazebných orbitalů  $\sigma$  a  $\pi$  do protivazebných  $\sigma^*$  a  $\pi^*$  o vyšší energii. Jinak řečeno, absorbuje-li molekula světelné záření, zaujmou elektrony v molekule vyšší energetické hladiny a dostanou se tak do excitovaného stavu. Konfigurace excitovaného stavu závisí na vlnové délce absorbovaného záření, bude-li energie převedena na excitaci elektronovou, či pouze na rotační nebo vibrační. Jelikož jsou vibrační a rotační hladiny blíže u sebe, excitaci mezi nimi obvykle způsobuje nízkoenergetické infračervené záření, zatímco UV a VIS záření způsobují excitaci elektronovou. Proces absorpce, resp. excitace je velmi rychlý trvající řádově  $10^{-14}$  až  $10^{-15}$  s. Rozdíl energie mezi stavem excitovaným, jemuž odpovídá vyšší energetická hladina  $E_1$  a stavem základním s energetickou hladinou  $E_0$  musí odpovídat Bohrově podmínce a být roven přijatému kvantu záření podle rovnice:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2)$$

kde  $\nu$  označuje frekvenci (vlnčet) fotonu,  $h$  je Planckova konstanta,  $c$  je rychlost světla a  $\lambda$  vyjadřuje vlnovou délku světla.

Absorpce fotonu molekulou v základním stavu ( $S_0$ ) způsobí excitaci jednoho elektronu z původně nízko ležícího obsazeného orbitalu do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Může dojít k vytvoření jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů – singletového nebo tripletového. Singletový stav ( $S_1$ ) je charakterizovaný energií základního vibračního stavu  $E_S$ , kde jsou spiny obou elektronů antiparalelní, zatímco tripletový stav ( $T_1$ ) je charakterizován energií základního vibračního stavu  $E_T$ , kde jsou spiny elektronů paralelní. Vytvoření singletového stavu přímou excitací je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější.

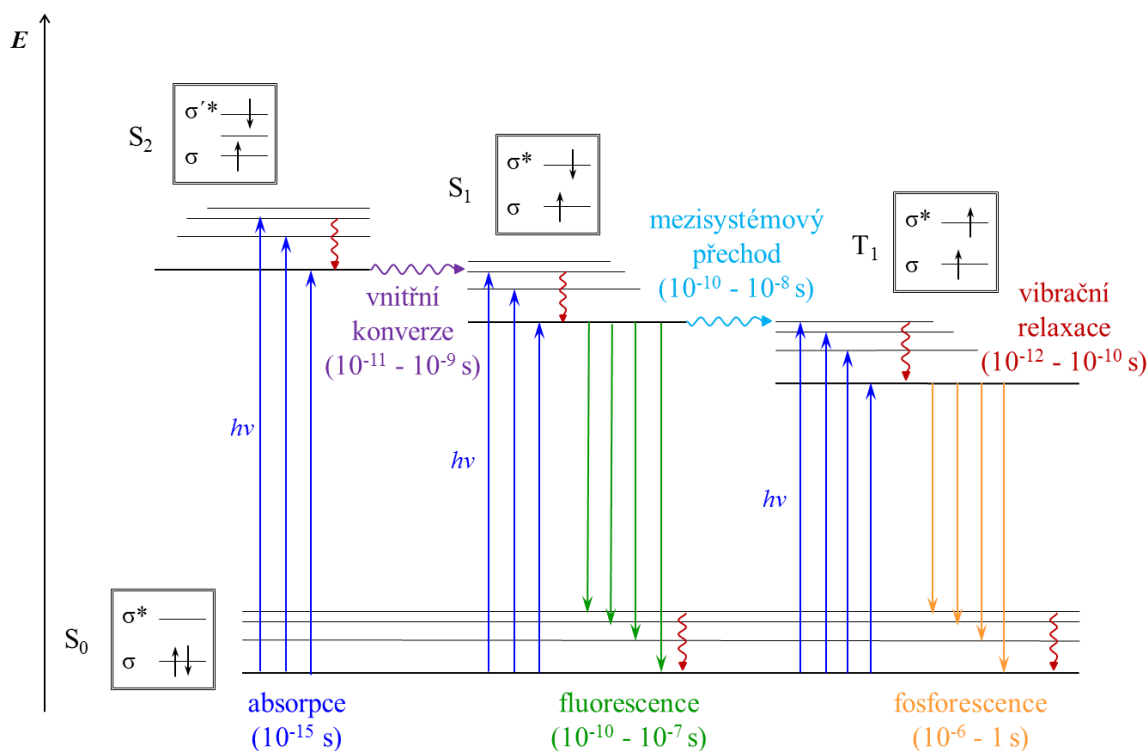
Excitovaná molekula se může zbavit přebytečné energie různými deaktivními procesy a to zářivými – emisí světla (fluorescence, fosforescence), nezářivými – zvýšení tepelné energie systému nebo fotochemickými reakcemi. Procesy, které se objevují mezi absorpcí a emisí světla jsou obvykle ilustrovány pomocí Jabloňského diagramu (Obr. 11), který znázorňuje relativní energie molekuly v základním stavu a stavech excitovaných.

Nezářivé procesy jsou v diagramu označeny vlnovkami a uskutečňují se mezi vibračně-rotačními hladinami různých elektronových stavů – isoenergetickými (vodorovně) nebo s různou energií (svisle). Jelikož se při nich nemění celková energie systému, nedochází



k emisi záření. Zářivé procesy jsou charakterizovány přechodem molekul z vyššího energetického stavu na nižší (nebo naopak), tedy vyzářením světelného kvanta (fotonu). V diagramu jsou označeny jako přímé šipky.

Obecně lze říci, že některé přechody jsou více pravděpodobné než jiné. Je-li pravděpodobnost přechodu menší než 0,01, potom takové přechody označujeme jako přechody zakázané. Pravděpodobnost přechodu zároveň určuje velikost absorpce [71].



Obr. 11: Jablonskiho diagram

Při absorpci elektromagnetického záření je změna elektromagnetického stavu molekul z nižší do vyšší elektronové hladiny doprovázena změnou vibračního a rotačního stavu. Proto jedinému přechodu elektronu odpovídá celá řada čar. Energeticky jsou přechody mezi elektronovými stavy v molekule mnohem energeticky náročnější ( $10^2$  kJ·mol<sup>-1</sup>) než přechody mezi elektronovými stavy vibračními a rotačními ( $10^{-2}$  kJ·mol<sup>-1</sup>). Výsledná absorpce záření a její následné elektronové spektrum jsou pásové, protože při jeho zaznamenání jednotlivé přechody splývají [72–74].

#### 2.4.1.1 UV-VIS spektrofotometrie

Podstatou spektroskopických metod je sledování interakcí záření s neznámou látkou s cílem využít pozorovaných jevů za účelem její identifikace, studia její struktury nebo stanovení její koncentrace. V molekulární absorpční spektrofotometrii je měřeno množství absorbovaného UV nebo VIS záření zředěnými roztoky molekul (v rozsahu 200 až 800 nm). Tato metoda zjišťuje, do jaké míry, a při kterých vlnových délkách roztok světlo pohlcuje, což samozřejmě závisí na struktuře sloučeniny.



UV a VIS spektroskopie se často používá ke studiu barevných látek. Skupiny, které zapříčiňují absorpci záření v UV a viditelné oblasti nazýváme chromofory. Jako chromofor je definován atom nebo skupina atomů, jejichž přítomnost je příčinou absorpce. Typické organické chromofory jsou konjugované  $\pi$ -systémy. Jejich účinek zvyšují auxochromy, což jsou organické složky obsahující volný elektronový pár a díky nimž jsou látky barevné. Ve většině sloučenin se vyskytuje víc chromoforů současně. To způsobuje existenci mnoha elektronových přechodů a pozorované absorpční spektrum je tvořené větším počtem vzájemně se překrývajících pásů.

Závislost absorbance na vlnové délce je znázorněna absorpční křivkou, která je kvalitativní charakteristikou látky či směsi látek. Absorpční křivky jsou ovlivňovány různými faktory. Prvním faktorem je teplota, jejíž vliv je patrný především ve zředěných roztocích, dále například iontová síla roztoku, díky které může být změněn tvar absorpční křivky. Vlivem polarizace rozpouštědla někdy dochází k bathochromnímu nebo hypsochromnímu posunu spektra. U bathochromního efektu dochází k posunu vlnové délky absorpčního signálu směrem k větším vlnovým délkám a u hypsochromního efektu dochází k posunu opačným směrem. Vliv na absorpční spektra mají též tenzidy. Jejich přítomnost v roztoku způsobuje posun  $\lambda_{\max}$  a vzrůst molárního extinkčního koeficientu [74–77].

#### 2.4.1.2 Lambert-Beerův zákon

Prochází-li světlo homogenním hmotným prostředím, dochází k zeslabení jeho intenzity z původní intenzity  $I_0$  na hodnotu  $I_p$ . To je způsobeno tím, že část původní energie světla je odražena, část je rozptýlena a část se absorbuje. Zbylá část energie prochází prostředím beze změny. **J. H. Lambert** zavedl roku 1760 pojem vnitřní transmitance  $T$ , jímž označil poměr intenzity záření, která projde vzorkem, a původní intenzity záření:

$$T = \frac{I_p}{I_0} . \quad (3)$$

Hodnota vnitřní transmitance je závislá na tloušťce vrstvy daného materiálu, kterou záření prošlo. Tyto zákonitosti doplnil v roce 1852 **A. Beer**, který prokázal závislost transmitance na koncentraci, je-li zachována konstantní tloušťka absorbující vrstvy a vlnová délka použitého světla. Jestliže zavedeme veličinu absorbance  $A$  jako záporný dekadický logaritmus vnitřní transmitance, je tato veličina přímo úměrná jak koncentraci absorbujícího roztoku  $c$ , tak tloušťce vrstvy  $l$ , což vyjadřuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log \frac{I_p}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot l , \quad (4)$$

kde konstanta úměrnosti  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient, který představuje absorbanci roztoku o jednotkové koncentraci a jednotkové tloušťce a charakterizuje pravděpodobnost daného elektronového přechodu. Molární absorpční koeficient závisí na frekvenci dopadajícího záření a je největší, když je absorpce nejintenzivnější. [73].

Lambert-Beerův zákon je limitním zákonem, jelikož platí pouze za určitých podmínek. Platí jen pro monochromatické záření a zředěné roztoky, v nichž absorbující částice nepodléhají žádným interakcím. V jiných případech lze často pozorovat, že při vyšších hodnotách koncentrace se závislosti absorbance na koncentraci ohýbá k ose koncentrace. Obsahuje-li roztok více druhů částic absorbujících záření při určité vlnové délce, platí

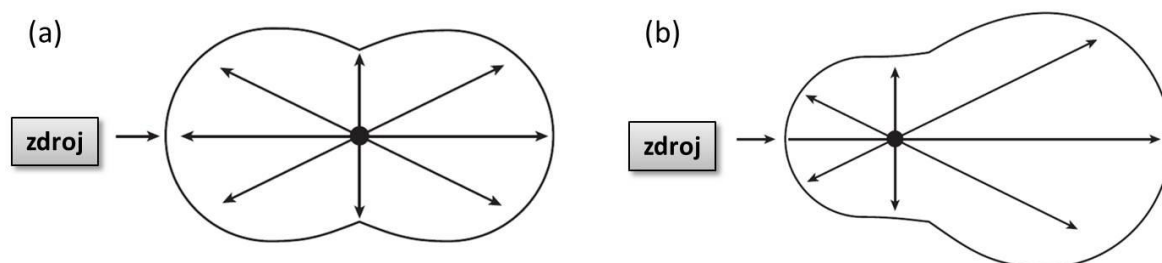
aditivita absorbancí, což znamená, že absorbance roztoku je součtem absorbancí jednotlivých částic [78].

## 2.4.2 Rozptyl světla

Čistý rozptyl světla nastává za podmínky, že vlnová délka světla  $\lambda$  je podstatně větší než koloidní částice v soustavě (o poloměru  $r$ ), platí-li tedy podmínka  $\lambda \gg r$ . Je-li tomu naopak, dochází přednostně k odrazu světla a pak pozorujeme zákal (hrubé disperzní soustavy).

Obecněji řečeno, při průchodu světelného paprsku o vlnové délce  $\lambda$  roztokem obsahujícím částice, jejichž největší rozměr je menší než  $3/2\lambda$ , je pozorován rozptyl záření ve všech směrech. Pokud prostředí obsahuje částice větší, dochází kromě rozptylu také k odrazu a lomu světla.

Jsou známy dva druhy rozptylu – elastický a neelastický. V případě elastického rozptylu je záření absorbováno analytem a následně zpětně vyzařeno beze změny energie. Naopak, pokud dochází ke změně energie záření, jedná se o rozptyl neelastický. Elastický rozptyl je dále dělen na dva typy dle velikosti částic, na nichž k rozptylu dochází. Jedná se o Rayleighův neboli rozptyl na malých částicích a rozptyl na velkých částicích. Rayleighův rozptyl nastává, pokud částice rozptylující světlo mají největší rozměr menší než 5 % vlnové délky záření. Intenzita rozptýleného světla je pak symetricky distribuována do všech směrů (Obr. 12a) a je úměrná čtvrté mocnině frekvence světla ( $\nu^4$ ), což má za následek mnohem větší rozptyl modrého světla v porovnání s červeným. V případě větších částic, distribuce rozptýleného světla roste v přímém směru a klesá ve směru zpětném v důsledku konstruktivních a destruktivních interferencí (Obr. 12b) [79].



Obr. 12: Distribuce světla pro (a) Rayleighův rozptyl a (b) rozptyl na velkých částicích

Mechanismus rozptylu záření spočívá v indukci elektrického dipólu v částici vlivem elektromagnetického pole dopadajícího záření, přičemž tento indukovaný dipól emituje sekundární záření o stejné vlnové délce, jako mělo záření dopadající. Mimoto dochází také k částečné polarizaci odraženého světelného paprsku.

Jak již bylo řečeno, pro charakter a intenzitu rozptýleného záření je rozhodující velikost částičky, která má být blízká vlnové délce dopadajícího záření (0,2–0,8  $\mu\text{m}$  pro UV a VIS záření). Intenzita rozptýleného záření je úměrná intenzitě primárního záření, koncentraci a velikosti částic, rozdílu indexů lomu částice a prostředí a je nepřímo úměrná  $\lambda$  (až  $1/\lambda^4$ ). V praxi se pro vyjádření intenzity rozptýleného záření používá zjednodušený Rayleighův zákon:

$$I_r = \text{konst.} \frac{I_0 \cdot c}{\lambda^n} \quad (5)$$

Rozhodující pro rozptyl záření je míra, s jakou je indukován dipólový moment v částici (polarizovatelnost částice). S rostoucí velikostí částice roste rozptyl až do zrcadlového odrazu a exponent  $n$  u vlnové délky ve výrazu (2) se zmenšuje ze 4 na 2. Při interakci záření s částicemi koloidní velikosti však dochází vedle dipolárních interakcí ke komplikovanému jevu, na němž se podílí odraz, lom, absorpce a polarizace záření.

Podíl rozptylu světla na zeslabení intenzity dopadajícího záření ve směru pozorování se kvantitativně popisuje zákonem obdobným Lambert-Beerovu:

$$-\log \frac{I}{I_0} = \tau l, \quad (6)$$

kde  $l$  je dráha, kterou primární paprsek urazí při průchodu disperzní soustavou a  $\tau$  je turbidita soustavy. Turbidita je mírou úhrnné energie, která se při průchodu světelného paprsku vrstvou suspenze o jednotkové tloušťce rozptýlí na všechny strany od tohoto paprsku. Turbidita je značně závislá na stupni disperzity, na vlnové délce dopadajícího záření a na optických vlastnostech koloidní soustavy [61; 69; 80].

#### 2.4.2.1 Turbidimetrie

Turbidimetrie je analytická metoda založená na měření stupně zákalu (turbidity). Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci. Sleduje se pokles intenzity záření procházejícího absorbující a rozptylující vrstvou. Prošlé záření má tedy vždy nižší intenzitu než záření dopadající. Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje jako u fotometrických postupů.

Ve zvláště zředěných disperzích (roztocích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu  $T_b$  (turbidance), již odpovídá v absorpčním fotometru  $A$  u klasické absorpční fotometrie (absorbance), vyjádřit vztahem

$$T_b = (e + T) \cdot cl, \quad (7)$$

kde  $e$  je absorpční koeficient,  $T$  turbiditní koeficient,  $c$  je koncentrace,  $l$  je světelná dráha měřicí kyvety. Závislost turbidance (absorbance) na koncentraci analytu je obecně nelineární (jde většinou o polynom 2. řádu). V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Turbidance závisí nepřímo na čtvrté mocnině vlnové délky. Proto se v současné době prakticky výhradně využívá měření v UV oblasti. Výrazný je vliv teploty, která ovlivňuje tvorbu i velikost částic.

K turbidimetrickému měření zákalu se obvykle využívají klasické absorpční fotometry a automatické analyzátory pracující metodou absorpční fotometrie.

#### 2.4.2.2 Dynamický rozptyl světla

Nahradíme-li klasický zdroj světla (žárovka, výbojka) laserem (zdroj koherentního záření), dochází v určitých směrech k interferenci rozptýleného záření. Interference pak způsobuje zesílení intenzity rozptýleného záření. Tento efekt je velmi významně ovlivňován difúzním pohybem částice, který způsobuje kolísání intenzity rozptýleného záření v čase okolo průměrné hodnoty – jedná se o tzv. dynamický rozptyl světla.

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) je v současné době široce používaná pro stanovení velikosti koloidních částic. Obvykle jsou výsledky v přiměřené shodě s výsledky elektronového mikroskopu. Určité nesrovnalosti ve výsledcích mohou být přisouzeny např. rozdílu mezi hydrodynamickým poloměrem, který může zahrnovat solvatační obal či naadsorbovanou vrstvu na povrchu částic, a skutečným poloměrem. V případě polydisperzních systémů se musí vzít do úvahy pohyb částic rozdílných velikostí a korelační funkce má poté složitější formu.

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

Čím rychleji částice difundují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného světla. Rychlost těchto změn je tudíž přímo závislá na pohybu molekuly. Difúzi molekul v principu ovlivňují následující faktory:

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

Jsou-li teplota a rozpouštědlo známy a konstantní, proměnlivost intenzity rozptýleného světla je přímo úměrná „velikosti“ molekuly. Tato veličina se nazývá *hydrodynamický poloměr*  $R_h$ . Tento poloměr je poloměrem koule, jejíž hydrodynamické chování je za dané teploty v daném rozpouštědle stejné jako chování sledované disperzní částice.

Jak již bylo uvedeno, fluktuace intenzity rozptýleného světla je závislá na velikosti částic. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase  $t$  popisuje pro monodisperzní systém tzv. autokorelační funkce  $g(t)$ , která je definovaná vztahem

$$g(t) = \exp\left(\frac{-t}{t_c}\right), \quad (8)$$

kde  $t_c$  je relaxační čas. Relaxační čas je charakterizován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Hodnotu relaxačního času lze vztáhnout k difúznímu koeficientu  $D$  rozptylujících částic prostřednictvím rovnice

$$t_c = \frac{1}{Dq^2}, \quad (9)$$

kde  $q$  je rozptylový vektor, jehož hodnota je funkcí vlnové délky dopadajícího záření, indexu lomu disperzního média  $n$  a úhlu  $\theta$ , pod kterým je intenzita rozptýleného světla měřena:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2}. \quad (10)$$

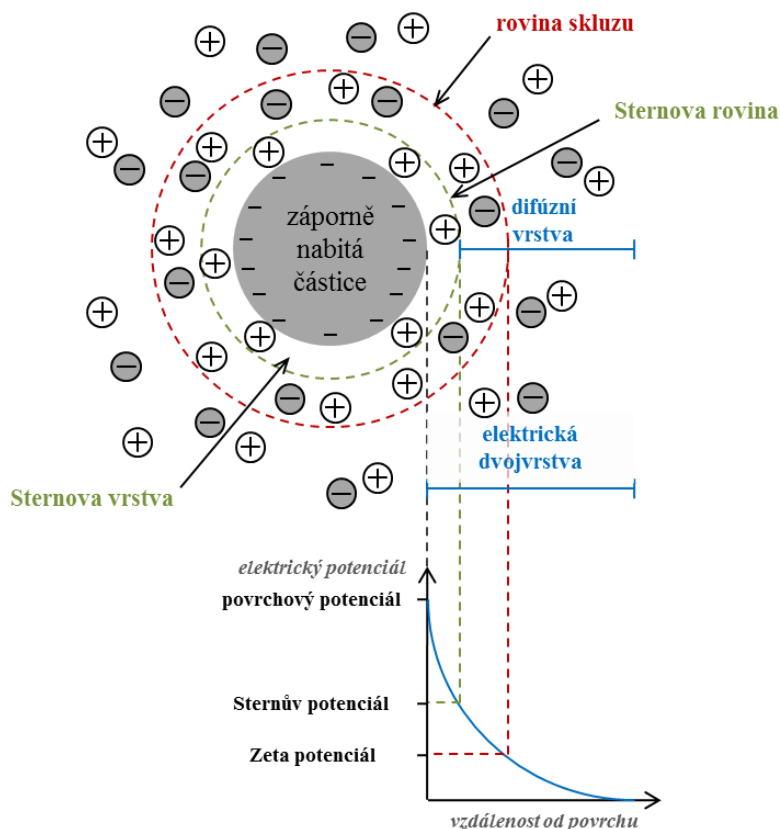
Difúzní koeficienty měřených částic je potom možno převést na velikost částic pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (11)$$

kde  $D$  je translační difúzní koeficient,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je teplota a  $\eta$  je viskozita disperzního prostředí [70; 80–82].

## 2.5 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Přítomnost částic disperzní fáze a široce rozvinutého fázového rozhraní v disperzních soustavách podmiňuje zvláštní ráz jejich elektrických vlastností a především vznik tzv. elektrokinetických jevů. Podobně jako malý jednoduchý iont kolem sebe vytváří iontovou atmosféru protiiontů, tak se i kolem nabitě koloidní částice seskupují malé ionty opačného znaménka, takže na povrchu této částice vznikají dvě nabitě vrstvy, tzv. **elektrická dvojvrstva** (Obr. 13).



Obr. 13: Elektrická dvojvrstva koloidních částic

V elektrické dvojvrstvě lze vymezit dvě základní části. Kompaktní část bližší k povrchu, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, kde lze tyto adsorpční síly zanedbat. Vzhledem k povrchovému náboji koloidních částic existuje potenciálový rozdíl mezi jejich

povrchem a roztokem. Lze rozlišit dva druhy potenciálových rozdílů. Prvním z nich je elektrokinetický potenciál, jehož hodnota je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny. Je odpovědný za jevy spojené s vedením elektrického proudu a za membránové potenciály. Druhým potenciálem je **elektrokinetický potenciál** (**ζ potenciál, zeta potenciál**), jímž se rozumí potenciálový rozdíl mezi objemem kapaliny a difúzní částí elektrické dvojvrstvy.

Podle Sterna je první vrstva, a s ní i několik vrstev protiiontů, přitahována k povrchu jak elektrostatickými, tak adsorpčními silami. Část protiiontů tedy zůstává v blízkosti povrchu. V této adsorpční vrstvě dochází k prudkému poklesu elektrického potenciálu. Zbylé protiionty, nutné ke kompenzaci náboje iontů určujících potenciál, vytváří v důsledku tepelného pohybu difúzní část elektrické dvojvrstvy. Po přidavku elektrolytu do systému se bude difúzní vrstva stlačovat a stále více protiiontů se ocitne v adsorpční vrstvě. Zeta potenciál se bude snižovat, až dosáhne téměř nulové hodnoty. Při ředění systému se difúzní vrstva naopak rozšiřuje a zeta potenciál roste.

Elektrický náboj dvojvrstvy charakterizuje a zároveň ovlivňuje stabilitu koloidních systémů. Zeta potenciál, který odpovídá náboji difúzní části dvojvrstvy, je právě mírou tohoto náboje [69]. Obecná dělicí čára mezi stabilním a nestabilním koloidním systémem se zpravidla bere  $\pm 30$  mV. Částice se zeta potenciálem kladnějším než  $+30$  mV, nebo zápornějším než  $-30$  mV se obvykle považují za stabilní.

## 2.6 Fluorescence

Jakmile je molekula excitována po absorpci fotonu, může se zbavit přebytečné energie, a tím se vrátit do základního stavu různými deexcitačními procesy. Jedná se buď o fotochemické reakce, nebo o nezářivé přechody, při kterých se zvýší tepelná energie systému. Nejdůležitější jsou však procesy zářivé, při kterých dochází k emisi světla, což znamená vyzáření světelného kvanta. Obecně se tyto procesy nazývají luminiscence. Luminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií – fosforescence a fluorescence – v závislosti na povaze excitovaného stavu. Fosforescence je přechod z energeticky vyššího triplexového stavu  $T_1$  do energeticky nižšího stavu  $S_0$ . Tento přechod je spinově zakázán, a proto probíhá emise pomalu. Fluorescence je důsledkem spinově dovoleného přechodu obvykle z rovnovážné hladiny stavu  $S_1$  do některé vibrační hladiny základního stavu  $S_0$ . Doba života fluorescence je přibližně 10 ns.

Dalšími cestami, které konkurují fluorescenci, jsou např. vnitřní konverze, nezářivé přechody (případně následované fluorescencí), intramolekulární přenos a konformační změny. Dále mohou být konkurentem fluorescence interakce s jinými molekulami v excitovaném stavu. Příkladem takových interakcí mohou být přesuny elektronů a protonů, přenos energie nebo tvorba excimeru nebo exciplexu. Tyto deexcitační dráhy mohou konkurovat fluorescenční emisi, pokud probíhají v časovém měřítku srovnatelném s průměrnou dobou, během které se molekuly vyskytují v excitovaném stavu. Fluorescence je však nejpravděpodobnějším deexcitačním procesem. Lze ji pozorovat po celou dobu buzení, ale po jeho ukončení u většiny látek prakticky ihned zmizí.

### 2.6.1 Zákony a pravidla pro fluorescenci

Fluorescence je řízena několika pravidly. Prvním z nich je **Stokesův zákon**, který říká, že vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je vždy větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ( $\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$ ). V praxi to znamená, že excitační světlo ztratí část své energie, což se projeví prodloužením vlnové délky emitovaného záření.

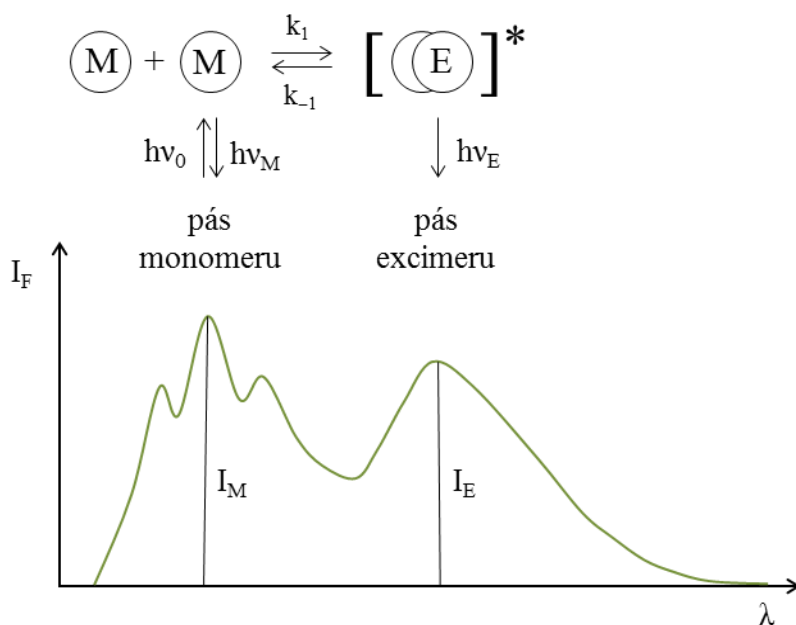
Druhým pravidlem je **Kashovo pravidlo**, podle něhož dochází před emisí fluorescenčního kvanta k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže nastává fluorescenční přechod z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$ . Důvodem je, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem  $S_1$  je malý, nežádivé přechody z těchto stavů do základního stavu probíhají velmi rychle.

Třetím principem je **Vavilovův zákon**, který tvrdí, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence a to, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.

### 2.6.2 Tvorba excimeru

Některé fluorofory, z nichž nejznámějším příkladem je pyren, mohou interagovat nejen s rozpouštědly, ale také sami navzájem. Komplexy vzniklé tímto způsobem se nazývají **excimery**. Excimer je dimer v excitovaném stavu. Jedná se o stechiometrický komplex, který je vytvářen při srážce mezi excitovanou molekulou a stejnou neexcitovanou molekulou. Schéma tvorby excimeru je vyobrazeno na Obr. 14.

Excimer je charakterizován v emisním spektru vlastním pásem. Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k vyšším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul. Na rozdíl od monomerního emisního pásu nevykazuje excimerový pás vibrační strukturu. Intenzita fluorescence excimeru v emisním spektru roste na úkor fluorescence monomeru [72].



Obr. 14: Schéma tvorby excimeru a odpovídající pásy v ukázkovém spektru

Vytváření excimeru je difúzně kontrolovaný bimolekulový proces, který se řídí kinetikou 2. řádu. Kinetika 2. řádu je závislá na difúzi, která je nepřímo úměrná viskozitě prostředí. Poměr intenzity fluorescence excimeru a monomeru je tedy ukazatelem viskozity prostředí, ve kterém se právě nachází fluorescenční sonda (např. pyren) [83].

### 2.6.3 Pyren

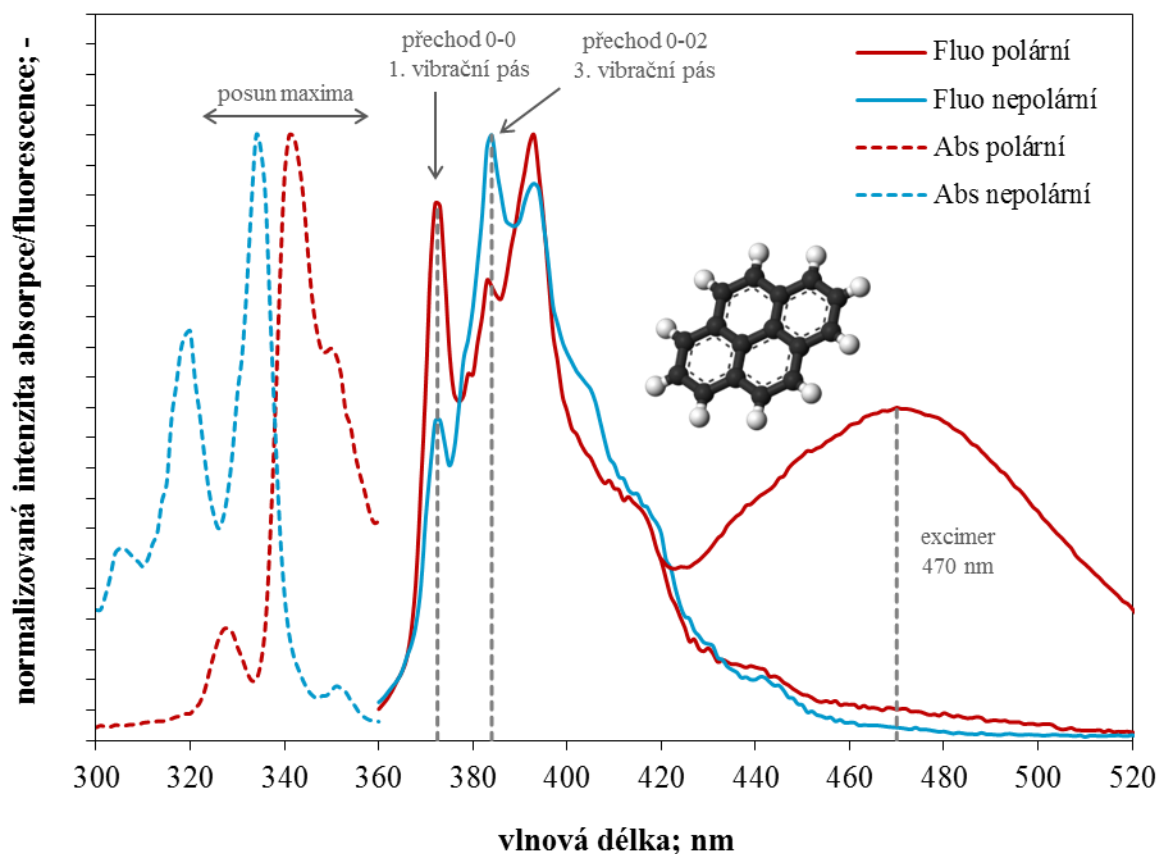
Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

Pyren je polyaromatický uhlovodík s vysokou symetrií a s unikátní reakcí na polaritu svého okolí (Obr. 15). U některých polyaromátů je vysoká symetrie spojována s faktem, že absorpční přechod  $S_0 \rightarrow S_1$  je zakázaný z hlediska symetrie. Jednotlivé vibrační přechody v tomto pásu jsou pak silně závislé na polaritě okolí molekuly. Tento jev se nazývá Hamův efekt [84; 85]. Vlivem překryvu zakázaného prvního a povoleného druhého excitovaného stavu dochází u pyrenu k interakci dipól-indukovaný dipól mezi pyrenem a prostředím. Tato interakce pak způsobuje, že vibrační přechod 0-0 je silně závislý na polaritě rozpouštědla. Polární prostředí zvyšuje pravděpodobnost zářivého přechodu 0-0, což znamená, že intenzita fluorescence tohoto přechodu roste s polaritou rozpouštědla. Vibrační maximum, které odpovídá tomuto přechodu je v emisním spektru pyrenu lokalizováno při vlnové délce 373 nm (značeno  $I_1$ ). Referenčním pásem je přechod 0-2, který je charakterizován vibračním maximem při vlnové délce 383 nm (značeno  $I_3$ ). Pyren má v koloidních roztocích prakticky vždy dobře rozlišenou vibrační strukturu emisního spektra, ve které se poloha vibračních páسů v závislosti na vlastnostech vzorku nemění. Tato skutečnost nám umožňuje pomocí poměru intenzity fluorescence prvního a třetího vibračního maxima vyhodnotit úroveň polarity systému (emisní polaritní index, značeno EmPI).

Průběh závislosti poměru intenzit fluorescence na koncentraci tenzidu v roztoku vykazuje tvar sigmoidní křivky. Pro polární prostředí je hodnota poměru intenzit fluorescence v rozsahu 1,25–2,0 a značí výskyt pyrenu ve vodném prostředí; pro nepolární (uhlovodíkové) prostředí se hodnota vyskytuje v rozsahu 0,57–0,61, což jsou hodnoty typické pro případ, kdy je pyren již plně solubilizován v kompaktních micelách [86]. Kompaktní micely svým tvarem, velikostí i pevností nedovolují polárnímu prostředí difundovat do jejich vnitřního prostoru. V micelárním prostředí je hodnota poměru v rozsahu 1,1–1,5 [86]. Tento rozsah hodnot naznačuje, že pyren je již lokalizován v micelách, které ještě nejsou příliš pevné ani kompaktní a dovolují polárnímu prostředí difundovat do jádra a zvyšovat tím polaritu daného prostředí [84; 87; 88].

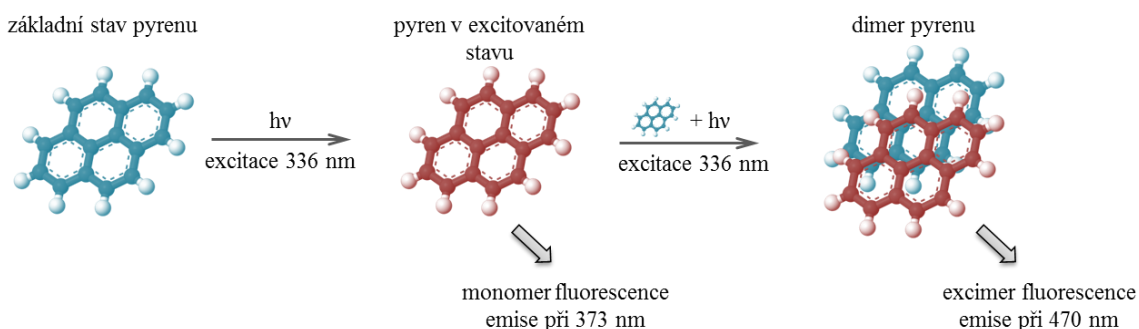
Z excitačního spektra pyrenu lze získat poměr intenzity fluorescence při vlnových délkách 333 a 338 nm, který je také ukazatelem úrovně polarity systému, resp. úrovně polarity blízkého okolí fluorescenční sondy (excitační polaritní index, značeno ExPI). Průběh závislosti tohoto poměru na koncentraci tenzidu v roztoku má obdobný průběh jako index EmPI.





Obr. 15: Absorpční a emisní spektrum pyrenu v závislosti na polaritě prostředí a struktura molekuly pyrenu

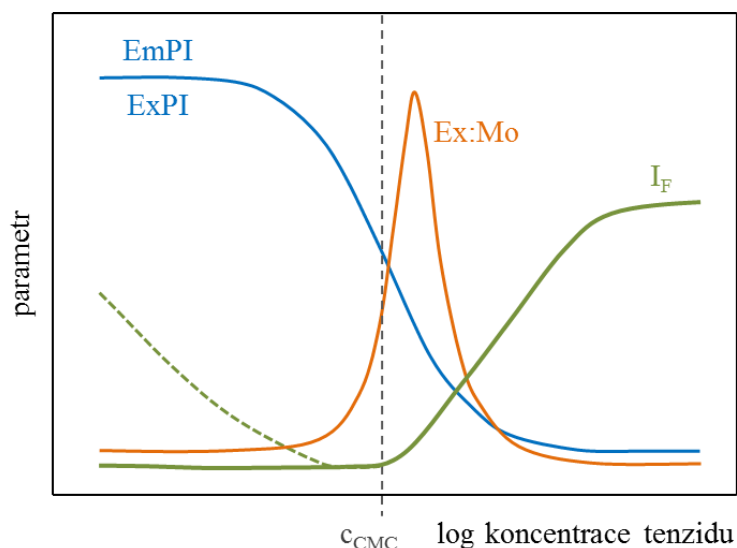
Pyren je schopen tvořit excimer s emisním maximem při 470 nm. Excitací pyrenu dojde ke změně jeho struktury a díky vzniku indukovaného dipólu je molekula pyrenu schopna v tomto stavu interagovat s jinou neexcitovanou molekulou. Tato interakce a tvorba „sandwichového“ komplexu (Obr. 16) má za následek ztrátu části energie excitované molekuly, čímž dochází k posunu maxima fluorescence excimeru k vyšším vlnovým délkám.



Obr. 16: Schéma principu vzniku excimeru pyrenu

Intenzita fluorescence excimeru je přímo úměrná pravděpodobnosti tvorby excimeru. Při koncentraci tenzidu pod CMC je pravděpodobnost tvorby excimeru velmi nízká. Při postupném zvyšování koncentrace tenzidu až na koncentraci blíží se CMC, kdy se právě začínají v roztoku tvořit micely, se pyren začíná lokálně koncentrovat. Pravděpodobnost

srážky dvou molekul pyrenu v jedné micelle se zvyšuje. Zvyšuje se tedy také pravděpodobnost tvorby excimeru a intenzita fluorescence excimerového pásu roste. S dále rostoucí koncentrací tenzidu, resp. micel v roztoku, pravděpodobnost obsazení micel dvěma molekulami pyrenu zase klesá, protože daná koncentrace pyrenu je již pod úrovní koncentrace micel v roztoku [89]. Poměr intenzity fluorescence excimeru a intenzity fluorescence prvního vibračního maxima (poměr Ex:Mo) tedy vykazuje průběh znázorněný na Obr. 17.



Obr. 17: Modelové průběhy hodnotících pyrenových indexů

Díky faktu, že tvorba excimeru je difúzně kontrolovaný proces [90; 91], je intenzita maxima fluorescence excimeru funkcí koncentrace pyrenu, mikroviskozity okolí a v případě koloidních roztoků je funkcí rozdělení jednotlivých molekul pyrenu v hydrofobních jádrech micel. Jedná se tedy o tzv. viskozitní index.

Dalším parametrem, který je možno využít pro zhodnocení lokalizace pyrenu v systému a úrovně polaritu v okolí sondy, je emisní intenzita fluorescence ( $I_F$ ) při dané excitační vlnové délce. Závislost tohoto parametru na koncentraci tenzidu v roztoku je znázorněna na Obr. 17. Pod kritickou micelární koncentrací tenzidu je tato závislost konstantní nebo mírně lineárně klesá a to podle charakteru tenzidu v roztoku [86]. Pyren se v této oblasti koncentrací tenzidu nachází ve vodném prostředí, je částečně rozpuštěn ve vodě a jeho intenzita je proto nízká nebo postupně klesá. Pokles intenzity fluorescence lze vysvětlit postupným koncentrováním molekul pyrenu na fázovém rozhraní spolu s molekulami tenzidu. Pyren tak „mizí“ z pozorované oblasti a jeho intenzita klesá. Při kritické micelární koncentraci je hodnota intenzity fluorescence minimální, neboť se pyren začíná koncentrovat v nově vznikajících micelách. Se zvyšující se koncentrací tenzidu intenzita fluorescence postupně roste, v systému je formováno stále více micel, do kterých může být pyren solubilizován. Nárůst intenzity fluorescence dosáhne svého maxima při rovnoměrném rozložení dané koncentrace pyrenu v přítomných micelách.

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Nanomedicína a cílené nosiče léčiv

Nanotechnologie má jednu z nejslibnějších aplikací na poli medicíny. Nanomedicína je definována jako soubor věd a technologií využívaných pro diagnózu, terapii a prevenci chorob a traumatických poranění, utišení bolesti a pro ochranu a zlepšení lidského zdraví, které používají molekulární nástroje (nanozařízení, nanostruktury) a znalosti o lidském těle na molekulární úrovni.

Aplikace nanotechnologií v medicíně jsou velmi slibné, přičemž oblast diagnostiky nemocí, cílené dopravy léčiv na specifické místo v těle a molekulární zobrazování jsou v současnosti intenzivně studovány, některé produkty dokonce již podstupují klinické testování. Současná generace léčiv je často založena na malých molekulách o molekulární hmotnosti okolo 1 000 Da nebo menší, které systematicky cirkulují v těle. Běžné škodlivé následky systémové biodistribuce zahrnují toxicitu ve tkáních, do kterých nebylo léčivo cíleno, z terapeutického pohledu obtížně udržitelnou koncentraci léčiva a metabolismus a exkreci léčiva, přičemž všechny z těchto parametrů snižují efektivnost léčiva. Systémy pro dopravu léčiv založené na nanotechnologiích (nanonosiče) by mohly zmírnit tyto problémy kombinací tkáňového nebo orgánového specifického cílení a terapeutických kroků. Tyto nosiče by měly především umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň. Tím lze omezit nežádoucí účinky terapie či zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných aktivních látek [92; 93].

Cílený transport léčiv je založen na obecném postupu, kdy nanočástice v sobě enkapsuluje léčivo. Přitom částice sama nebo rozpoznávací elementy na jejím povrchu umějí na základě specifických receptorů na povrchu buňky najít to pravé místo pro účinek [1; 94]. Byla vyvinuta celá řada nosičů, založených na rozpustných polymerech, liposomech, dendrimerech [17; 95; 96] a polymerních micelách [8; 17; 87; 97]. Některé z těchto nosičů jsou již zavedeny do klinické praxe [17].

Na nosiče léčiv je kladena celá řada požadavků jak z hlediska jejich chemických vlastností, jako je tvar, velikost, náboj, povrchová hydrofilnost či povaha a hustota ligandů na jejich povrchu, ale také co se týče jejich biodegradovatelnosti, biokompatibility a schopnosti specifické interakce na cílovém místě. Dále je nezbytné, aby nesená biologicky aktivní látka byla v lékové formě neaktivní a bez negativního vlivu na organismus. Léčivo má být aktivováno až v místě požadovaného účinku a uvolňováno po optimální dobu a v optimální koncentraci potřebné pro dosažení maximálního účinku. Je potřeba, aby léčivo, metabolity a všechny komponenty nosičového systému byly nakonec eliminovány z organismu [98; 99].

#### 3.2 Interakce polyelektrolyt-tenzid

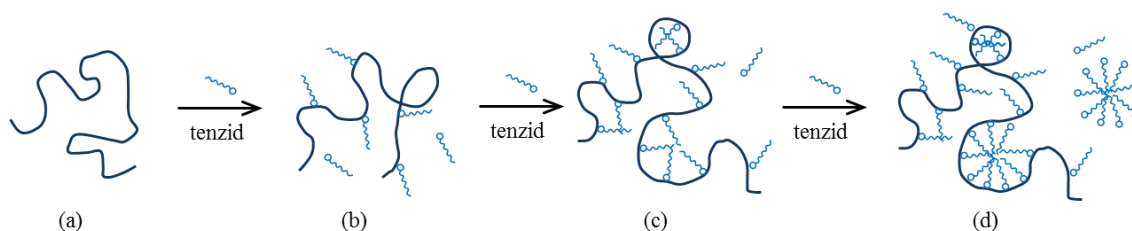
V současné době je uvažováno o využití interakcí tenzidů a polyelektrolytů jako dalšího vhodného způsobu přípravy cílených nosičů léčiv [10; 100]. Takové systémy jsou spojením výhod obou látek. Tenzid v těchto systémech vytváří hydrofobní prostor, ve kterém je možné solubilizovat léčivo, polyelektrolyt zajišťuje vnější ochranu agregátů a cílení na specifické místo v organismu. Zmíněný model je však značně zjednodušený a je velmi důležité jeho

bližší prozkoumání, především pak podmínky interakce mezi komponentami a stabilita agregátů.

Polymer je obecně přidáván do roztoku pro kontrolu reologie, stability systému nebo pro manipulaci s povrchovou adsorpcí. Interakce uvnitř směsi jsou poháněny hydrofobními, bipolárními a elektrostatickými silami. Pokud je tenzid přidán do roztoku, který obsahuje opačně nabitý polymer, mluví se o „silně interagujícím systému“, v kterém jsou na prvním místě přitažlivé elektrostatické síly opačně nabitého polymeru a tenzidu. V současné době je napsána celá řada článků a knih zaměřených na asociaci mezi opačně nabitými polyelektrolyty a tenzidy [101–105].

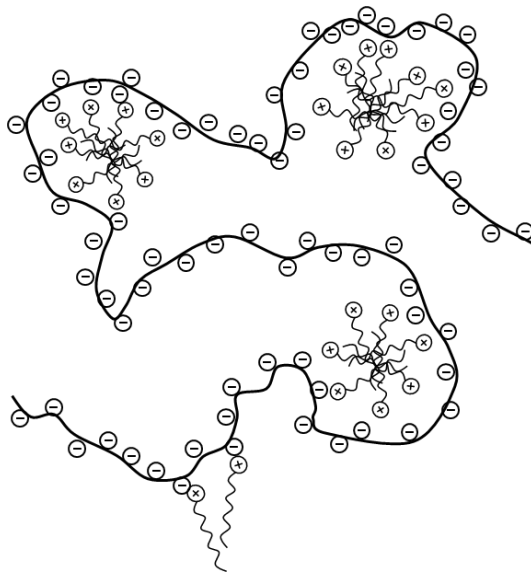
Tenzid v přítomnosti opačně nabitého polyelektrolytu začíná formovat agregáty s polyelektrolytem, když jeho koncentrace přesáhne kritickou agregační koncentraci (zkratkou CAC). Agregace polyelektrolytu a tenzidu s opačným nábojem značně závisí na vlastnostech tenzidu a polyelektrolytu [101]. Formování komplexu polyelektrolyt-tenzid vzniká na základě elektrostatické vazby, která je následně stabilizována pomocí hydrofobních interakcí tenzidových řetězců [106]. V tomto procesu je protiiont polyelektrolytu nahrazen tenzidovým iontem a vazebné místo polyelektrolytu tenzidu formuje neutrální iontový pár. Rozsáhlé elektrostatické interakce v asociačním procesu závisí na nábojové hustotě polyelektrolytu. Konformační vlastnosti a dynamické chování řetězce polyelektrolytu jsou dány stupněm ionizace a koncentrací a distribucí protiiontů [107]. Ve vodném roztoku jsou také důležité solvatační vlastnosti a hydrofobní interakce, jelikož silně ovlivňují konformační vlastnosti polymeru. Hlavním důvodem kooperativního vázání tenzidových molekul na opačně nabitý polyelektrolyt je elektrostatická stabilizace tenzidových micel.

**Thalberg K. a Lindman B.** [108] studovali fázové chování systému polyakrylátu a kationtových tenzidů. Studium kombinace homopolymeru a tenzidu odhalilo, že při nízké koncentraci tenzidu nedochází k žádné asociaci, nehledě na koncentraci polymeru. Nad CAC roste počet vázaných tenzidů na polymerovém řetězci až do určité koncentrace tenzidu, která se lineárně vyvíjí s koncentrací polymeru. Formace micel začíná, jakmile se po nasycení polymerních řetězců koncentrace tenzidu ještě zvýší. V této fázi vedle sebe v roztoku koexistují volné tenzidové micely a tenzid agregovaný k polymeru. V přítomnosti polyelektrolytu je velikost micel tenzidu menší než micel formovaných při absenci polymeru v roztoku. Kromě vytváření micel může tenzid izolovat jeho hydrofobní řetězce z vodného roztoku jejich asociací s hydrofobními částmi polymeru.



Obr. 18: Schematická ilustrace (a) řetězce polyelektrolytu, (b) asociace tenzidu na polymer, (c) navázaných molekul tenzidu po CAC a (d) formace komplexu po CMC v systému opačně nabitého polymeru a tenzidu ve vodném roztoku [109].

V sérii článků ukázali **Hansson P. a Almgren M.** [110–112], že tenzidové agregáty tvořené v roztoku polyelektrolytu jsou podobné volným micelám (Obr. 19). Byl studován vliv nábojové hustoty polyelektrolytu (sodné soli karboxymethylcelulózy NaCMC a polyakrylátu sodného NaPA) na vazebnou izotermu a na agregační číslo tenzidu. Dále byla zkoumána vazba alkyltrimethylamonium bromidů k sérii NaCMC o různé nábojové hustotě použitím tenzidové selektivní elektrody spolu s metodou časově rozlišeného zhášení fluorescence. Objevili, že nárůst v nábojové hustotě vede k silnější interakci, ale agregační číslo dodecyltrimetyl-amonium bromidu (DTAB) v roztoku NaCMC a NaPA bylo téměř stejné jako těch odpovídajících volným micelám. Nicméně, rozdíl ve flexibilitě mezi NaPA a NaCMC neměl vliv na agregační číslo  $DTA^+$  iontů.



Obr. 19: Polyelektrolyt-tenzid komplexy ve zředěném roztoku – model perlového náhrdelníku.

Vliv nábojové hustoty na vazbu polyelektrolytů na tenzidy studovali například také **Hayakawa K. a kol.** [113; 114] Zkoumali systém různých karboxylových polyelektrolytů (NaCMC, NaPA, algináty a pektany) a dodecyl- a tetradecyltrimethylamonium bromidů. Zjistili, že detailní struktura polymeru hraje důležitou roli v procesu vázání tenzidů. Vazebnou konstantu či kooperativní efekt složek může zřejmě ovlivňovat také hydrofobní charakter, flexibilita a detailní lokální struktura polymeru. Vliv nábojové hustoty kationtových a aniontových kopolymerů v předem vytvořených komplexech rozpustných záporně nabitých polyelektrolytů na interakci takových komplexů s kationtovým tenzidem dodecylpyridinium chloridem studovali **Kötz J. a kol.** [115; 116]. Zjistili, že vázání je kooperativní pro všechny studované systémy, ale jeho síla je závislá na nábojové hustotě polyelektrolytu v předem vytvořených komplexech.

Přidání soli do systému vždy redukuje vazebnou afinitu mezi tenzidy a opačně nabitými polyelektrolyty. Lineární vztah mezi vazebnou afinitou a koncentrací soli byl studován na řadě systémů [117–119]. Ačkoli přidaná sůl snižuje vazebnou afinitu, zvyšuje také kooperativitu interakce. Kooperativita je dosažena prostřednictvím interakce molekul bočních částí *n*-alkylových řetězců v micelárních agregátech. Přídavek nízkomolekulární soli podporuje formování řetězců polyelektrolytu kvůli potlačené expanzi polymerních řetězců.

**Anthony O. a Zana R.** [120; 121] studovali efekt hydrofobicity polymeru na vazbu kationtového tenzidu pomocí metody časově rozlišeného zhasení fluorescence na dvou polyelektrolytech o různé hydrofobicitě. Vazebná konstanta pro dodecyltrimethylamonium chlorid na polyelektrolyty se zvyšovala, přestože kooperativní parametr se snižoval, jak rostl hydrofobní charakter kopolymeru. Bylo zjištěno, že vázání není v tomto případě kooperativní, ale nekooperativní či dokonce antikooperativní. Vazebná izoterma neukazuje žádnou kritickou agregační koncentraci. Tenzidy se dělí mezi vodnou fázi a hydrofobní mikrodomény polymeru. Pro velmi hydrofobní polyelektrolyty, kde je většina opakujících se jednotek zahrnuta do mikrodomén, je tenzidové agregační číslo úměrné koncentraci tenzidu. Naopak, hydrofilní polyelektrolyty váží tenzidy kooperativně nad CAC a agregační číslo tenzidu je téměř nezávislé na koncentraci tenzidu.

### 3.3 Interakce hyaluronan-tenzid

Jako velmi vhodný polyelektrolyt pro nosičové systémy nejen v kombinaci s tenzidy se již dlouhá léta jeví hyaluronan [12; 13; 122], díky jeho biokompatibilitě, biodegradabilitě, unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem a schopnosti interagovat s receptory na povrchu buněk. Hyaluronan je také díky svým vlastnostem schopen zajistit jak pasivní tak aktivní cílení.

V komplexech hyaluronan-tenzid se projevují jak elektrostatické tak hydrofobní interakce. Podmínkami a problémy interakcí tenzidů s hyaluronanem se zabýval **Thalberg K. a kol.** [108; 123; 124] v řadě studií. Byly zkoumány interakce mezi sodnou solí kyseliny hyaluronové a kationtovými tenzidy s různou délkou řetězce. Systémy byly zkoumány pomocí metod fázové separace, měření vodivosti, NMR a pomocí solubilizačních experimentů. Bylo zjištěno, že tenzidy se váží na hyaluronan pouze v případě, mají-li ve svém řetězci deset a více uhlíkových atomů. Při nižším počtu uhlíkových atomů tenzidové molekuly upřednostňují agregaci do micel než asociaci s polymerním řetězcem. Tyto výsledky se shodují s jinými zdroji, podle kterých interakce hyaluronanu a takových tenzidů vede k tvorbě agregátů podobných micelám připojeným na řetězci polyelektrolytu (model perlového náhrdelníku zobrazený na Obr. 19). Interakce tenzidů a hyaluronanu je velmi závislá na délce řetězce tenzidu, ale v podstatě nezávislá na molekulové hmotnosti polymeru nad určitou minimální hodnotou. Dále se autoři zabývali fázovým chováním systému tetradecyltrimetyl-amonium bromid-hyaluronan-voda a vlivem nízko-molekulárního elektrolytu na fázovou separaci systému cetyltrimetyl-amonium bromid-hyaluronan. Bylo zjištěno, že po přidání již malého množství elektrolytu dochází ke zmenšení dvoufázové oblasti ve fázovém diagramu. Při překročení určité koncentrace soli fázová separace už neprobíhá. Studie ukazuje, že přidání soli do systému omezuje interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, z čehož vyplývá, že značná část interakcí v systému je elektrostatické povahy.

**Xu, J. a kol.** [125] a následně **Tao Y. a kol.** [126] zkoumali systém kationtový tenzid-hyaluronan metodami dynamického rozptylu světla, měření zeta potenciálu, optické a fluorescenční mikroskopie a turbidimetrie. Výsledky daných studií potvrdily, že dané systémy vznikají především elektrostatickými interakcemi, a že průběh navázání tenzidu na řetězce hyaluronanu je podmíněn molárním poměrem jednotlivých složek. Samovolná agregace složek v systému vede k tvorbě micelární agregátů typu „core-shell“. Následně tento

systém studovali z hlediska schopnosti solubilizace léčiva paclitaxelu a využití nového komplexu pro dopravu léčiv.

**Gřundělová L. a kol.** [127] studovali interakce mezi hyaluronanem a kvartérní soli benzalkonium-chloridu (BAC). Na základě experimentů dynamického rozptylu světla, viskozimetrie a měření povrchového napětí došli k závěru, že hyaluronan má v roztoku konformaci náhodného klubka, které se postupným přidáváním BAC rozbaluje, čímž roste i střední velikost částic. Zároveň bylo také prokázáno, že od určité koncentrace BAC, vznikají v roztoku agregáty. Zmíněné metody poukazují na to, že termodynamické upřednostňování interakcí BAC-BAC nebo hyaluronan-BAC v roztoku hyaluronanu závisí na koncentraci BAC.

### 3.4 Fluorescenční spektroskopie

Stabilita a solubilizační vlastnosti agregátů biopolymer-tenzid jsou důležitými parametry pro jejich další využití. Oba tyto parametry je možno vyhodnotit pomocí fluorescenční spektroskopie, kdy je hydrofobní léčivo představováno hydrofobní fluorescenční sondou. Touto problematikou se zabývají odborníci z celého světa [9; 128; 129]. Z fluorescenčních sond je snad nejpoužívanější pyren [86; 130; 131]. Pyren je z hlediska vlastností jeho emisních spekter považován za sondu se schopností charakterizovat polaritní úroveň jeho blízkého okolí, čímž je vhodnou sondou ke studiu procesu micelizace a agregace v systému hyaluronan-tenzid. Velmi dobře rozlišená vibrační struktura emisního spektra je vysoce závislá na polaritě rozpouštědla. Změny ve vibrační struktuře nastávají v celém spektru, avšak nejvýznamnější rozdíly závislé na polaritě prostředí fluorescenční sondy se vyskytují u vrcholu při 373 nm. Vrchol při 384 nm je využíván jako referenční pás. Vyjádřením poměru intenzity fluorescence při těchto dvou vrcholech získáváme parametr velmi citlivý na polaritu rozpouštědla.

**Wilhelm M. a kol.** [132] a následně také **Astafieva I. a kol.** [133] poukázali na to, že poměr intenzity fluorescence dvou nejvýznamnějších vrcholů emisního spektra nemusí být pravým ukazatelem pro zjištění počátku micelizace, protože je tato hodnota závislá na vlnové délce excitace. Takže při excitační vlnové délce např. 339 nm by se poměr posunul ve prospěch pyrenu v hydrofobním prostředí (v micelách), kdežto při 333 nm je hodnota nakloněna k pyrenu ve vodném prostředí. Autoři ukázali, že koncentrační závislost poměru intenzit fluorescence při 333 nm a 338 nm excitačního fluorescenčního spektra je citlivější k pravému počátku micelizace.

Interakcemi tenzidů s hyaluronanem se dále zabývali **Yin, D. a spol.** [134]. Byly zkoumány možné interakce hyaluronanu a tenzidů, a to aniontových i neionogenních, pomocí metody fluorescenční spektroskopie. Autoři zjistili, že neionogenní tenzidy interagují s hyaluronanem buď velmi slabě, nebo vůbec, a že hyaluronan ovlivňuje agregaci aniontového tenzidu SDS stejně jako přídavek elektrolytu a to tak, že snižuje CMC. Dále byl také zkoumán vliv dalších sacharidů (glukózy, galaktózy nebo mannitolu) na příslušné interakce.

**Halasová T. a kol.** [128] zkoumali interakce hyaluronanu s tenzidy v roztoku za přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu (NaCl). Výsledky ukázali, že přítomnost NaCl sice potlačuje interakce mezi hyaluronanem a opačně nabitým tenzidem, ale tyto interakce jsou přítomny i v jiných systémech bez ohledu na iontový charakter tenzidu. Interakce byly prokázány pomocí metody fluorescenční spektroskopie a částečně také tenziometrie.

Fluorescenční data ukázala, že tvorba micel nastává v určitém intervalu koncentrací tenzidu a ne při konkrétní koncentraci, zvláště v přítomnosti hyaluronanu. Největší vliv hyaluronanu byl pozorován na tenzid Tween 20 a cetyltrimetylamonium bromid (CTAB).

Stejní autoři dále zkoumali vliv koncentrace tenzidu na životaschopnost vybraných lidských buněk (osteoblasty a keranocyty). Výsledky potvrdily cytotoxický účinek tenzidu CTAB. Bylo zjištěno, že přítomnost hyaluronanu o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a molekulové hmotnosti 806 kDa potlačuje toxicitu CTAB při nejnižší použité koncentraci  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na základě těchto poznatků lze očekávat, že by hyaluronan mohl být použit jako úspěšný ochránce specifických typů buněk proti toxickým účinkům CTAB [135].

### 3.5 Turbidimetrie

Turbidimetrická metoda bývá nejčastěji používána ke studiu agregace proteinů měřením optické hustoty vzorku založené na rozptylu světla v blízké UV nebo viditelné oblasti světla. Prostup světla vzorkem může být měřen pomocí UV-VIS spektrometru při vlnových délkách, kde ingredience jako jsou proteiny, DNA/RNA či pomocné látky (např. aminokyseliny) neabsorbují světlo, tzn. typicky v rozsahu vlnových délek 320 až 800 nm. Čírost a stupeň opalescence je pak často vyhodnocován pomocí roztoku formazinu jako reference.

Měření turbidity je jednoduché a použitelné pro relativní porovnání zákalu vzorků, např. pro rychlé otestování agregace komponent v systému. Ačkoli turbidimetrie neposkytuje informace o velikosti, koncentraci nebo povaze komponent či agregátů ve vzorku, je tato metoda používána k detekci relativních změn vzorku během agregačního procesu. Metoda je citlivá k malým částicím v systému, a lze ji tudíž využít ke sledování raného stádia formace agregátů v kapalném vzorku při studiu degradace nebo stability.

Autoři *Lahlou A. a kol.* [136] a *Paul M. a kol.* [137; 138] provedli rozsáhlou fyzikálně-chemickou studii stability protilátek cetuximab, bevacizumab a rituximab. Různé metody charakterizace proteinů, včetně UV-VIS turbidimetrie a dynamického rozptylu světla, byly použity k určení změn fyzikálně-chemických vlastností těchto látek. Agregace byla sledována pomocí monitorování absorbance použitím UV-VIS spektrometru Varian Cary 50 Probe. Turbidance byla měřena jako absorbance při 350 nm. Pomocí metody dynamického rozptylu světla zkoumali populaci agregátů v systému.

*Seitz R. a kol.* [139] zkoumali botnání polymerních kuliček mimo jiné také pomocí měření turbidance vzorků. Botnání ve většině případů způsobuje, že index lomu mikrokuliček se blíží indexu lomu hydrogelu, což má za následek snížení turbidity membrány, což se projeví na průchodu či odrazu světla vzorkem. Autoři zjistili, že spektra turbidity jsou ovlivněny velikostí mikrokuliček ve vzorku, přičemž testovali kuličky o velikosti 0,6 a 1,4  $\mu\text{m}$ . Zjistili, že pokud je průměr kuliček stejného řádu jako vlnová délka použitého světla, turbidita vykazuje silnou závislost na vlnové délce. Naopak, v případě je-li průměr kuliček větší než vlnová délka světla, turbidita se mění s vlnovou délkou jen mírně.

Jak již bylo řečeno, velmi často je metoda UV-VIS turbidimetrie použita ke studiu agregace proteinů. Měření je prováděno v oblasti blízké UV, neboť při nízkých vlnových délkách mají proteiny již zanedbatelnou absorpci [140; 141]. *Mahler H-Ch. a kol.* [141] použili metodu turbidimetrie a analýzu rozptylu světla jako analytický nástroj pro sledování formace agregátů proteinů v průběhu času. Autoři využili faktu, že čírost či zákal (opalescence) vzorků je



založena na zeslabení svazku světelných paprsků kvůli rozptylu světla. Přítomnost rovnoměrně rozptýlených částic jako např. nerozpustných proteinových agregátů a sraženin vede ke zdánlivému zvýšení v UV absorbanci při všech vlnových délkách a to kvůli rozptylu světla. Turbidita byla proto měřena jako fotometrická absorbance při 350 a 550 nm, kde žádný ze známých vnitřních chromoforů v proteinové formulaci neabsorbuje. Absorbance, resp. turbidance byla opět měřena pomocí UV-VIS spektrometru Varian Cary 50 Probe. Dále autoři prováděli ještě vizuální porovnávání vzorků s referenční suspenzí dle Evropského lékopisu, kapitoly 2.2.1, podle kterého rozlišovali čtyři stupně opalescence (čiré, mírně opalescentní, opalescentní a velmi opalescentní). Zvýšení turbidity vlivem agregace bylo zároveň potvrzováno pomocí metody dynamického rozptylu světla.

**Wang G. a kol.** [142] a **Xikui L.** [143] studovali agregaci micel s diblokovým kopolymerem mimo jiné pomocí UV-VIS turbidimetrie. Autoři zjistili, že pokles turbidity byl ve shodě s pozorovaným snížením počtu agregátů v systému. Dále zjistili, že turbidimetrie je vhodná metoda pro studium procesu micelizace blokových kopolymerů, neboť roztok rozpustného komplexu byl transparentní zatímco micelární roztok silně rozptyloval světlo, čímž docházelo ke změně v turbiditě vzorků.

Autoři **Kayitmazer A. B. a kol.** [144] zkoumali vliv tuhosti řetězce polyelektrolytu na jeho afinitu k opačně nabitě koloidní částici (směsné micelle kationtového a neiontového tenzidu nebo proteinového sérového albuminu) a následné interakce pomocí turbidimetrické titrace. Turbidita byla měřena pomocí Brickmanova PC800 kolorimetru při vlnové délce 450 nm. Tenzid DTAB byl titrován do systému hyaluronan-TX100. Počátek formace komplexů v systému byl charakterizován nárůstem turbidity nad nulovou hodnotu. Strmý nárůst turbidity pak indikoval počátek makroskopické fázové separace. V případě relativně tuhého řetězce hyaluronanu byla vazba s tenzidy obecně slabší než tomu bylo u více flexibilních řetězců kopolymeru akrylaminomethylpropansulfonátu a akrylamidu. Byl studován také vliv iontové síly na interakce komponent. Bylo prokázáno, že tužší řetězce se k sobě váží slaběji při vyšší iontové síle.

Již zmínění autoři **Xu, J. a kol.** [125] studovali agregaci tenzidu a opačně nabitého hyaluronanu pomocí měření turbidity vzorku. Zákal vzorků byl vyhodnocován na základě měření absorbance při 550 nm pomocí TU-1901 UV-VIS spektrofotometru. Následně byla absorbance přepočtena na turbiditu pomocí jednoduchého vztahu. Autoři pomocí měření turbidity zjistili, že zákal roztoku hyaluronanu s tenzidem postupně roste s rostoucím poměrem nábojů tenzidu a hyaluronanu ve směsi, přičemž nárůst turbidity si vysvětlovali agregací složek na základě elektrostatických a hydrofobních interakcí.

## 4 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Hlavním cílem předložené dizertační práce je příprava a charakterizace koloidních systémů vznikajících na základě interakcí hyaluronanu s micelárními agregáty a uvážení potenciálního použití těchto systémů pro nanomedicínské aplikace.

Interakce mezi hyaluronanem a tenzidy jsou studovány již řadu let, ovšem aplikační potenciál a metody přípravy takových komplexů jsou většinou opomíjeny. Komplexy hyaluronanu s kationtovými tenzidy, zejména CTAB, jsou již řadu let zkoumány a diskutovány na školícím pracovišti. V návaznosti na předchozí studium komplexů hyaluronan-tenzid je část této dizertační práce zaměřena na studium přípravy a vlastností komplexů hyaluronanu se Septonexem, českou specialitou, jejíž struktura je podobná tenzidu CTAB, a porovnání získaných výsledků s předchozím studiem. V souvislosti s tím byla studována stabilita těchto komplexů za různých podmínek, zahrnujících čas, iontovou sílu prostředí, teplotu či vliv zředění systému. Systémy byly připraveny již známým tzv. indukovaným způsobem, tedy postupným přidáváním kationtového tenzidu do roztoku hyaluronanu.

Druhá část práce je pak zaměřena na možnosti přípravy komplexů hyaluronanu s micelárními agregáty inovativním neindukovaným způsobem, tj. interakcí hyaluronanu s již hotovým micelárními agregáty, v nichž může být solubilizována hydrofobní látka. Výhodou tohoto řešení je kombinace biokompatibilního a vysoce hydrofilního polymeru s útvary vytvářejícími hydrofobní doménu schopnou rozpustit nepolární látky. Biopolymer vystupuje ve funkci vlastního nosiče, micelární agregát ve funkci solubilizátoru navázaného na nosič. Již hotové agregáty jsou pak pokryty hyaluronanovými makromolekulami a tak biokompatibilizovány. Příprava komplexů neindukovaným způsobem byla provedena metodou postupného přidávání hyaluronanu k micelárnímu roztoku vybraných tenzidů (CTAB nebo Septonexu). Následně byla provedena optimalizace postupu přípravy a studium vlivu molekulové hmotnosti hyaluronanu na přípravu komplexů. V neposlední řadě byly provedeny experimenty prokazující interakci micel s hyaluronanem. U vybraných koloidů byl sledován vliv přítomnosti solubilizátu v micelách na jejich interakce s hyaluronanem a stabilita výsledných koloidů se solubilizátem v daném prostředí.

Proces tvorby koloidů a jejich vlastnosti (stabilita, solubilizační schopnosti, velikost částic) byly studovány zejména pomocí metody fluorescenční spektroskopie, která poskytuje informace o tvorbě a vlastnostech agregátů s nepolárními doménami, dále také pomocí metody dynamického rozptylu světla či turbidimetrie.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiály

Hyaluronan:

Hyal. acid  $M_w = 8-15$  kDa, CPN s.r.o., š. 213-6147

Hyal. acid  $M_w = 15-30$  kDa, CPN s.r.o., š. 213-6481

Hyal. acid  $M_w = 70-120$  kDa, CPN s.r.o., š. 213-3842

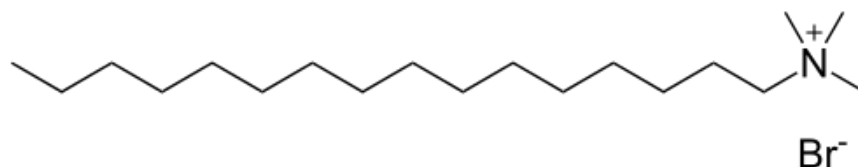
Hyal. acid  $M_w = 80-130$  kDa, CPN s.r.o., š. 260315-E2

Hyal. acid  $M_w = 90-130$  kDa, CPN s.r.o., š. 212-2859; 213-3842; 213-6547; 214-8707

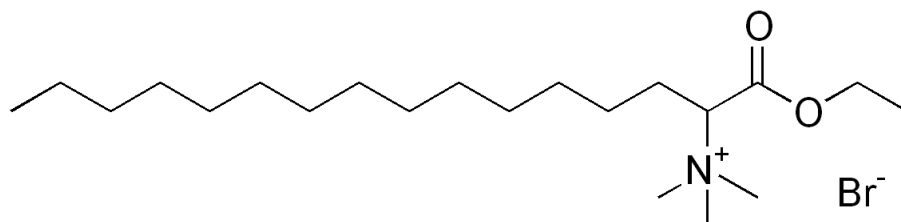
Hyal. acid  $M_w = 1\ 400-1\ 600$  kDa, CPN s.r.o., š. 181214-4-D1

Hyal. acid  $M_w = 1\ 500-1\ 750$  kDa, CPN s.r.o., š. 212-1271; 213-4722; 213-5226

CTAB (Cetyltrimetylamonium bromid), Sigma Aldrich, š. 910SEP002



Septonex (Karbethopendeciniumbromid), GBNchem, š. 40808244



Pyren, Fluka, puriss p.a. for fluorescence, š. 4301661

Sudan Red G, š. 401930/1

NaCl, Lach-Ner s.r.o., š. 30453; PP/2009/06278

Rozpouštědla – aceton (Penta, čistota 99,5 %), demineralizovaná voda (Milipore: Mili-Q; Purelab: ELGA), ethanol

### 5.2 Příprava vzorků

#### 5.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky tenzidů a hyaluronanu byly připraveny navážením potřebného množství látek na analytických vahách a analytickým převedením do zásobní lahve. Navážka byla následně rozpuštěna v potřebném množství rozpouštědla za stálého míchání po dobu minimálně 24 h při laboratorní teplotě. Roztoky tenzidů byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě. Roztoky hyaluronanu byly skladovány za snížené teploty (4 °C), maximálně po dobu 1 týdne.

### 5.2.2 Metoda fluorescenční sondy

Systémy zkoumané pomocí fluorescenční spektroskopie, tj. pomocí fluorescenční sondy byly připraveny standardním způsobem přípravy vzorků spočívající v použití zásobního roztoku sondy v těkavém rozpouštědle. Zásobní roztok fluorescenční sondy v acetonu byl připraven navážením potřebného množství látky na analytických vahách a analytických převedením navážky do zásobní lahve, přičemž koncentrace zásobního roztoku byla  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Při přípravě vzorku bylo potřebné množství zásobního roztoku fluorescenční sondy napipetováno do čistých skleněných vialek, tak aby výsledná koncentrace sondy ve vzorku byla  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Poté bylo provedeno odpaření těkavého rozpouštědla za sníženého tlaku. Do takto připravených vialek byly následně připravovány vzorky o požadované koncentraci jednotlivých komponent v požadovaném rozpouštědle. Pro zajištění důkladné solubilizace fluorescenční sondy byly vzorky před měřením ponechány minimálně 24 h na třepačce při laboratorní teplotě.

### 5.2.3 Charakterizace systémů pomocí metody DLS

Pro studium systémů pomocí metody dynamického rozptylu světla byly připraveny obdobné vzorky jako pro fluorescenční měření, tedy o požadované koncentraci jednotlivých komponent v požadovaném rozpouštědle, ale bez fluorescenční sondy. Vzorky byly opět ponechány na třepačce po dobu minimálně 24 h při laboratorní teplotě.

Pro titrační měření byly připraveny zásobní roztoky tenzidů a hyaluronanu o požadované koncentraci v požadovaném rozpouštědle. Z těchto roztoků pak byly odebrány potřebné objemy do nádobek automatického titrátoru.

### 5.2.4 Turbidimetrie

Pro turbidimetrická měření byly připraveny zásobní roztoky tenzidů a hyaluronanu o požadovaných koncentracích v prostředí demineralizované vody. Zásobní roztoky byly ponechány při laboratorní teplotě na třepačce po dobu minimálně 24 h.

### 5.2.5 Studium solubilizace hydrofobního barviva

Zásobní roztok barviva Sudan Red G byl připraven navážením potřebného množství látky na analytických vahách a rozpuštěním analyticky převedené navážky pomocí ethanolu. Výsledná koncentrace zásobního roztoku Sudanu Red G byla  $7,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Zásobní roztok byl ponechán na třepačce po dobu 24 h při laboratorní teplotě a následně byl skladován při snížené teplotě (4 °C).

Pro kalibrační přímkou byly připraveny čtyři vzorky Sudanu Red G v ethanolu o koncentracích v rozsahu  $10^{-8}$  až  $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pomocí kalibrační přímky byly následně vypočítány koncentrace solubilizovaného barviva ve studovaných systémech.

Pro studium solubilizace barviva v systému tenzid-hyaluronan byly připraveny vzorky o různé koncentraci tenzidu Septonexu (0,5; 2; 5; 10 a  $20 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) buď v přítomnosti hyaluronanu o výsledné koncentraci ve vzorku  $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo čisté bez hyaluronanu. Barvivo bylo do systému přidáno v práškové formě v množství přesahující nasycení systému barvivem a to buď před přidáním hyaluronanu do systému nebo až nakonec. Pro zajištění solubilizace

barviv byly vzorky ponechány na třepačce po dobu minimálně 24 h při laboratorní teplotě. Před měřením byly vzorky centrifugovány kvůli separaci nerozpuštěného barviva.

### 5.2.6 Cytotoxicita

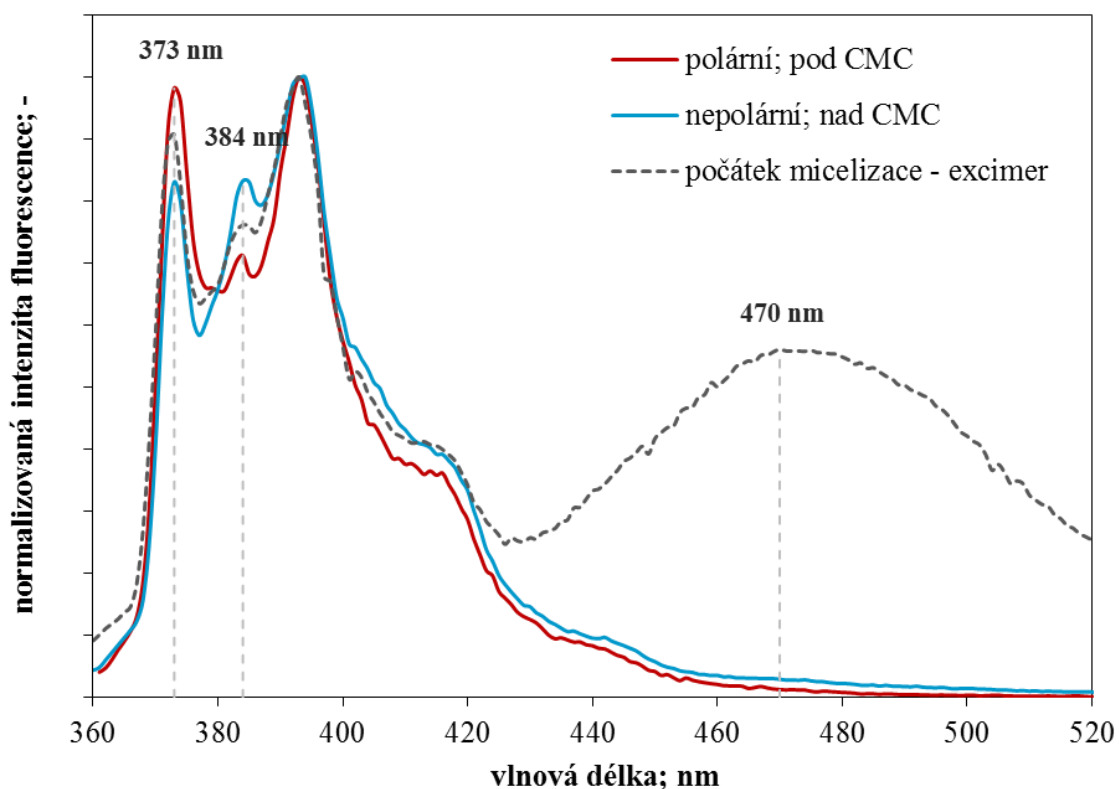
Pro testování cytotoxicity vzorků na buňkách byly připraveny vzorky obsahující indukované agregáty tenzidu s hyaluronanem a to metodou postupného přidávání tenzidu (CTAB nebo Septonex) do roztoku hyaluronanu (1 000 kDa) o výsledné koncentraci ve vzorku 0,05, 1 a 5 g·l<sup>-1</sup>. Koncentrace tenzidu v těchto systémech byla 0,03, 0,06 a 0,08 mmol·l<sup>-1</sup>. Také byly připraveny komplexy micelárních agregátů s hyaluronanem a to naopak metodou postupného přidávání roztoku hyaluronanu do micelárního roztoku tenzidu CTAB. Výsledná koncentrace hyaluronanu v těchto systémech byla 0,0746 g·l<sup>-1</sup> a tenzidu 1,27 nebo 2,50 mmol·l<sup>-1</sup>. Jako blank byly použity roztoky tenzidu o příslušné koncentraci, ale bez přídavku hyaluronanu. Kontrolou byl pak samotný hyaluronan. Tyto testy byly provedeny spolupracujícími kolegy v rámci projektu COST (Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D., Ústav dědičných metabolických poruch, Univerzita Karlova).

## 5.3 Metody a standardní vyhodnocení

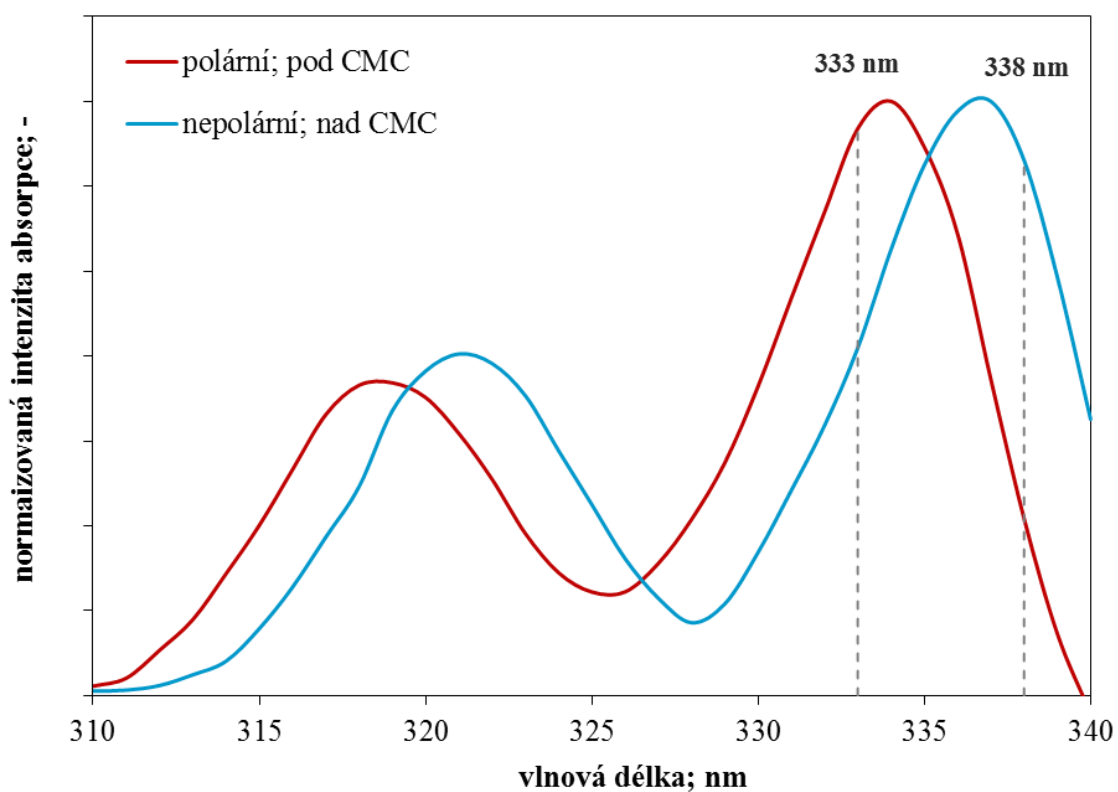
### 5.3.1 Fluorescenční měření (pyren)

Fluorescenční spektra pyrenu byla měřena na fluorimetru FLUOROLOG (HORIBA Scientific) nebo AMINCO-Bowman Series 2 (Thermo Fisher Scientific). Stálá teplota měřených vzorků 25,0 ± 0,1 °C byla zajištěna pomocí termostatu. V případě měření teplotních závislostí byl termostat využit pro teplotu vzorků v teplotním rozsahu 10–50 °C s odchylkou 0,1 °C. Pro měření emisních spekter byl excitační monochromátor nastaven na 336 nm. Spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 360 až 530 nm. V emisním spektru pak byla sledována intenzita fluorescence prvního a třetího maxima, tedy při vlnových délkách 373 a 384 nm. Jejich poměr je v práci označován jako EmPI neboli emisní polaritní index, neboť jde o parametr silně závislý na polaritě v okolí sondy (Obr. 20). Dalším vyhodnocovacím parametrem byl poměr intenzity fluorescence excimeru, jehož maximum se ve spektru nachází při 470 nm a monomeru (prvního vibračního maxima). Tento poměr je označován jako Ex:Mo a lze podle jeho hodnoty vyvozovat informace o rozložení pyrenových molekul v systému, resp. v hydrofobních jádrech.

Dále byly měřeny také excitační spektra pyrenu a to v rozsahu vlnových délek od 310 nm do 340 nm, přičemž emisní monochromátor byl nastaven na 392 nm. Z excitačních spekter byl vyhodnocován další významný parametr reagující na polaritu v okolí pyrenu a to poměr intenzit fluorescence při 333 a 338 nm. Excitační spektrum totiž reaguje na polaritu vzorku posunem svého maxima (Obr. 21). Tento poměr bude nadále označován jako ExPI neboli excitační polaritní index.



Obr. 20: Změny v emisním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí



Obr. 21: Změny v excitačním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí. Červená křivka znázorňuje excitační spektrum roztoku tenzidu o koncentraci menší než CMC, zatímco modrá křivka znázorňuje spektrum roztoku tenzidu o koncentraci větší než CMC.

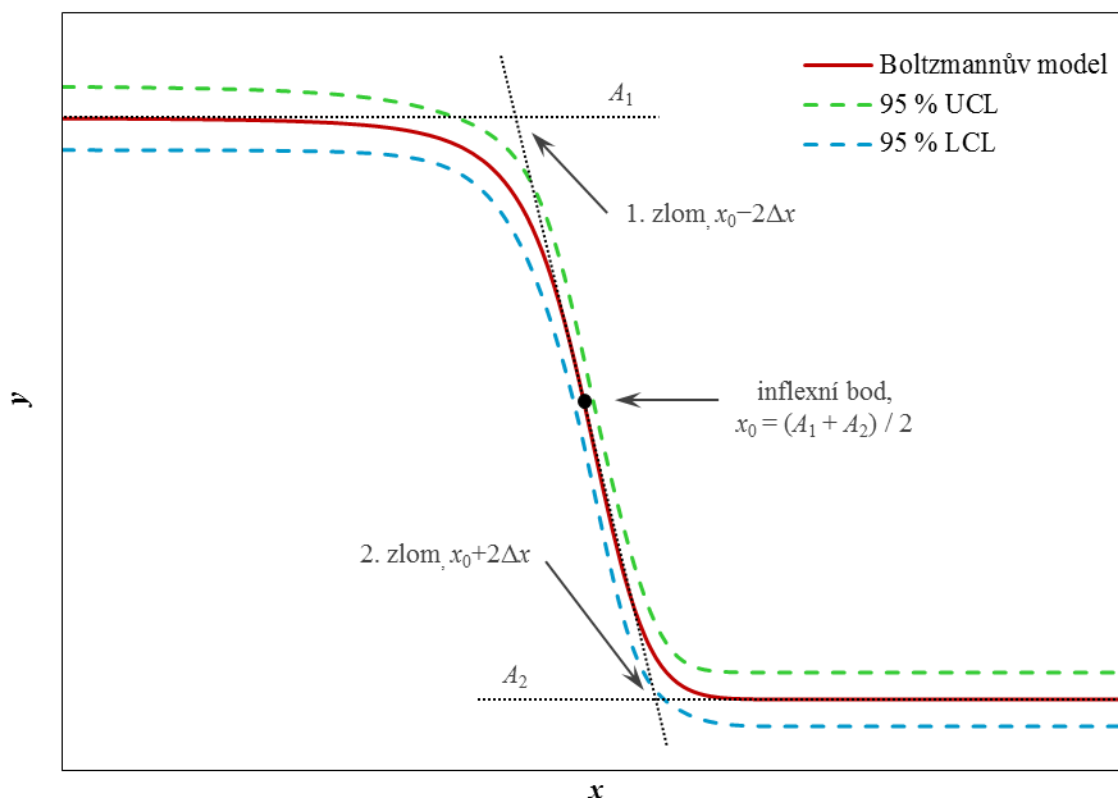
Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, závislost EmPI a ExPI na koncentraci tenzidu obvykle vykazuje jednoduchý sigmoidní charakter [145]. Tato závislost je standardně prokládána Boltzmannovým modelem znázorněným na Obr. 22. Naměřené závislosti byly vyhodnocovány pomocí programu OriginPro 8.1, přičemž byly vypočítány parametry Boltzmannova modelu a interval spolehlivosti na hladině významnosti 0,05 (přerušované čáry na Obr. 22 – UCL neboli upper confidence limit a LCL neboli lower confidence limit).

Zmíněnými parametry jsou inflexní bod  $x_0$ , jehož souřadnice na ose  $x$  se pokládá za hodnotu CMC, dále pak 1. a 2. zlom odpovídající počátku a konci agregace a hodnoty  $A_1$  a  $A_2$  vyjadřující horní a spodní limitu Boltzmannova modelu. Tyto hodnoty pak vypovídají o vlastnostech systému před a po agregaci, např. z hodnoty  $A_2$  lze zjistit polaritu hydrofobních jader ustálených agregátů. Posledním parametrem je  $\Delta x$ , jehož hodnota charakterizuje strmost poklesu klesající části křivky a vypovídá tak o průběhu, resp. rychlosti agregačního procesu [145].

Rovnice Boltzmannova modelu je dána jako:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (12)$$

kde proměnná  $y$  odpovídá poměru EmPI resp. ExPI a nezávislá proměnná  $x$  označuje celkovou koncentraci tenzidu,  $A_1$  a  $A_2$  jsou horní a spodní limita křivky.



Obr. 22: Boltzmannův model a jeho parametry

Hodnoty polaritní v okolí pyrenu resp. hodnoty polaritních indexů EmPI a ExPI nelze brát jako absolutní a jednoznačné. Vyhodnocování fluorescence pyrenu skýtá několik komplikací, které je potřeba brát v úvahu při interpretaci dat. Pyren je polyaromatický uhlovodík hydrofobní povahy. Překvapivě se nejedná o látku ve vodě zcela nerozpustnou, ale o látku s omezenou rozpustností (rozpustnost pyrenu ve vodě při 25 °C je přibližně  $6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [146]). Lze tedy pozorovat charakteristický fluorescenční signál, který emituje z prostředí vody obdobný signálu při velmi nízkých koncentracích tenzidu v roztoku (o několik řádů nižších než CMC daného tenzidu), kdy se přítomné molekuly tenzidu adsorbují na mezifázovém rozhraní voda – vzduch. Horní rameno sigmoidní křivky tak odpovídá vodnému prostředí v okolí molekul pyrenu. S rozpustností pyrenu ve vodě a odpovídajícím signálem je tedy potřeba počítat při interpretaci získaných dat, neboť signál vzorku bude vždy více či méně ovlivněn signálem pyrenu z vody a to podle rozdělení pyrenových molekul mezi vodné a hydrofobní prostředí.

Dalším příkladem často diskutované interpretace dat je oblast poklesu polaritních indexů v blízkosti CMC a spodní zlom na sigmoidní křivce. Tento pokles a zlom nastává v důsledku postupné inkorporace pyrenových molekul do nově vznikajících hydrofobních domén během procesu micelizace. Na tento proces se lze ovšem dívat dvěma způsoby. První z nich je založen na tvorbě premicelárních útvarů v okolí CMC, jejichž jádra jsou poměrně dobře přístupná polárním prostředí, a které se postupně ustalují až do vzniku micel s relativně uzavřeným hydrofobním jádrem (oblast spodního zlomu).

Z druhého úhlu pohledu lze uvažovat již po překročení CMC postupnou tvorbu stále většího množství plnohodnotných ustálených micel, které jsou sami důvodem klesajících hodnot polaritních indexů. V oblasti velmi blízké CMC, kdy je v systému vytvořeno jen pár prvních micel, které jsou schopny solubilizovat jen určitou poměrnou část molekul pyrenu obsažených v systému, jsou hodnoty EmPI dány jak signálem pyrenu emitujícího z micel, tak signálu z vody. Nesolubilizovaný pyren tak může zkreslovat hodnoty polaritních indexů. Skutečnou polaritu ustálených micel lze pak zjistit až ve chvíli, kdy je v systému dostatečná koncentrace tenzidu, resp. micel schopných solubilizovat většinu molekul pyrenu a kdy bude vliv pyrenu emitujícího z vody již zanedbatelný.

Dalším parametrem, který byl využit ke zhodnocení procesu micelizace byl poměr Ex:Mo, charakterizující pravděpodobnost tvorby excimeru v systému. Na základě faktu, že tvorba excimeru je difúzně kontrolovaný proces [90; 91], můžeme z poměru Ex:Mo zjistit informace o mikroviskozitě hydrofobních domén v systému. Princip vzniku excimeru je totiž založen na přiblížení dvou molekul pyrenu během doby života excitovaného stavu. V případě, je-li prostředí v nepolárním jádře agregátu rigidní, pak je pravděpodobnost, že se k sobě dvě molekuly pyrenu přiblíží a vytvoří tak excimer nízká. Naopak je-li prostředí fluidní, molekuly pyrenu se v rámci doby života excitovaného stavu dostanou na potřebnou vzdálenost interakce snadněji a rychleji a zvýšená pravděpodobnost tvorby excimeru se tak projeví nárůstem poměru Ex:Mo.

K tvorbě excimeru ovšem dochází pouze v případě určitého poměru koncentrace micel a pyrenu v systému, tak aby docházelo k vícenásobnému obsazení hydrofobních jader micel molekulami pyrenu.

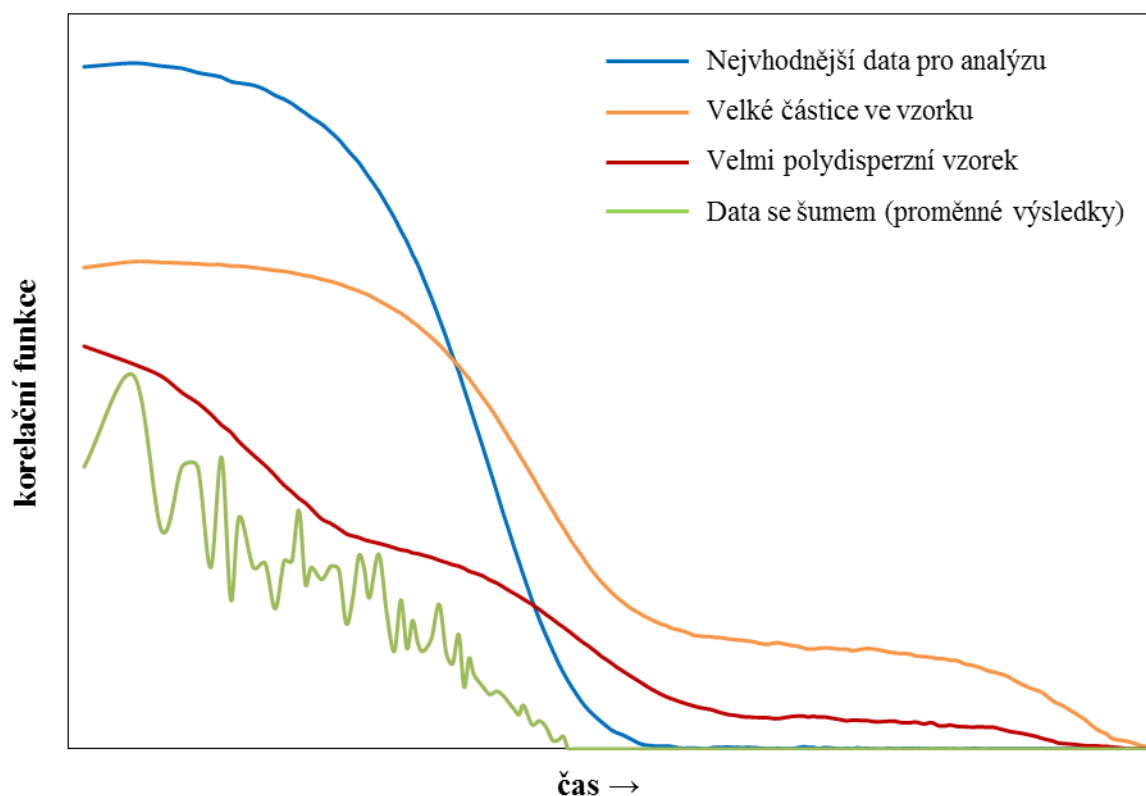


Tvorba excimeru a tím i hodnoty poměru Ex:Mo mohou být v kombinaci se znalostí polaritních indexů nápomocné při vyhodnocování lokalizace pyrenových molekul v systému a tím i struktury vznikajících agregátů.

### 5.3.2 Dynamický a elektroforetický rozptyl světla

Distribuce velikosti částic komplexů tenzid-hyaluronan byly měřeny metodou dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Titrační experimenty byly provedeny v kombinaci s autotitrátorem MPT-2 (Malvern Instruments). Výsledky prezentované dále v dizertační práci představují průměrné distribuce velikosti částic získané vždy nejméně ze tří opakování, v případě titračních experimentů pak nejméně z devíti.

Při měření distribuce velikosti částic byl sledován především tvar autokorelační funkce (Obr. 23) a počet detekovaných fotonů za sekundu, tzv. count rate neboli rychlost čítání fotonů. Oba tyto parametry vypovídají o kvalitě a polydisperzitě vzorku ve smyslu přítomnosti nečistot či nedetekovatelných agregátů v systému. Výstupem měření pak byly intenzitní distribuce velikosti částic, neboť dochází k analýze fluktuací intenzity rozptýleného světla.

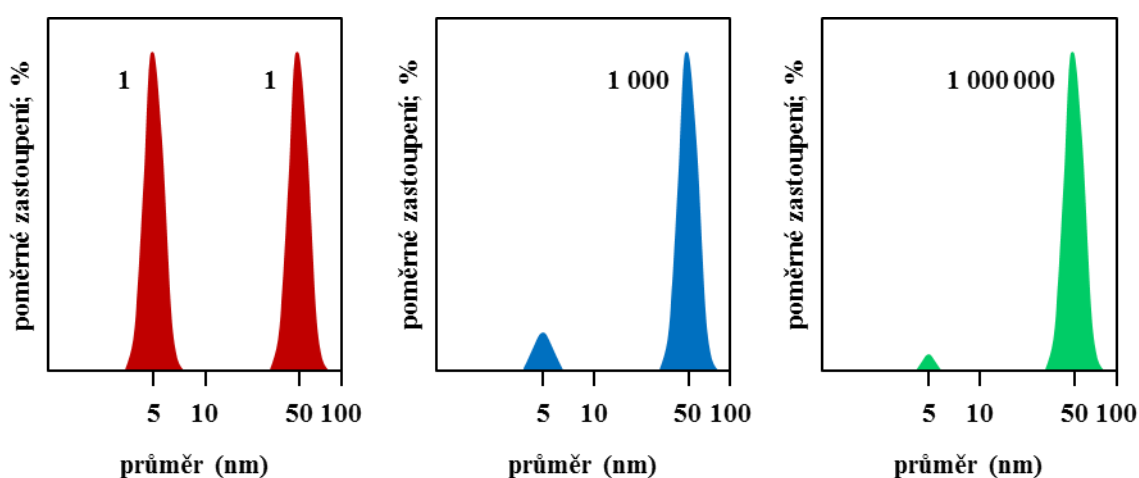


Obr. 23: Ukázky korelačních funkcí v závislosti na kvalitě vzorku

Distribuce intenzity jsou základními výstupními distribucemi softwaru Zetasizer. Je však nutno vysvětlit, jak tyto distribuce vznikají, neboť značně zkreslují významnost jednotlivých distribučních maxim. Existují tři základní typy distribucí velikosti částic a to početní, objemová a intenzitní. Početní distribuce vyobrazuje početní zastoupení částic ve vzorku. Objemová distribuce pak vzniká přepočtem z početní pomocí vztahu pro objem koule. Plocha distribučního maxima větších částic je pak oproti menším 1000krát nadhodnocena. Intenzitní

distribuce jsou počítány z početních pomocí Rayleighovy aproximace, podle které velké částice rozptylují světlo s milionkrát větší intenzitou než částice malé. Z tohoto důvodu jsou intenzitní distribuční maxima velkých částic až  $10^6$ krát nadhodnoceny oproti malým částicím v systému. Vztah jednotlivých distribucí je znázorněn na Obr. 24. Tento fakt je nutno brát na vědomí při analýze získaných dat a jejich interpretaci.

Při posuzování získaných dat musíme mít na mysli, že princip měření není založen na počítání částic, nýbrž na kolísání intenzity světla rozptýleného částicemi dispergovanými ve vzorku. Intenzitní distribuce a výsledná hodnota průměrné velikosti částic ( $Z$ -average,  $Z-d_H$ ) jsou tím, co je skutečně měřeno. Ostatní distribuce, objemová a početní, jsou velmi užitečné, ale méně přesné, neboť jsou vypočteny z údajů naměřené intenzity a optických vlastností materiálu, které nejsou často známy (např. index lomu samotných částic a prostředí či viskozita prostředí).



Obr. 24: Znárodnění vztahu početní, objemové a intenzitní distribuce velikosti částic

Dále je při analýze získaných dat nutné myslet na fakt, že v případě studovaných systémů (hyaluronan-tenzid) se nejedná o agregáty ideálních tvarů (tedy kulovitých agregátů), ale že se jedná o rozmanité systémy, v nichž vystupují makromolekuly. Metoda dynamického rozptylu světla měří tzv. hydrodynamický průměr částice, který je definován jako průměr koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient, jaký byl naměřen. V praxi ovšem platí, že částice a makromolekuly v roztoku jsou nekulové, dynamické a solvatované.

Neméně důležitou sledovanou veličinou byl tzv. derived count rate, který poskytuje informaci o intenzitě rozptýleného světla v případě, když by nebyl použit filtr pro zeslabení intenzity laseru. Tohoto filtru se využívá zejména v případech velmi koncentrovaných vzorků nebo při měření velkých částic pro zeslabení intenzity laseru a tím pádem také intenzity rozptýleného světla. Naopak je také možné použít filtr k propuštění vyšší intenzity laserového paprsku, pokud je to nutné. Větší intenzita je pak potřeba při měření velmi malých velikostí částic nebo vzorků o nízké koncentraci, tedy vzorků, které rozptylují málo světla. Hodnota „derived count rate“ je dána podílem celkového počtu rozptýlených fotonů a faktoru zeslabení intenzity světla a lze podle ní také posuzovat velikost a zastoupení agregátů v systému. Čím větší je hodnota „derived count rate“, tím vyšší koncentrace částic je ve vzorku.

Koloidní stabilita komplexů tenzid-hyaluronan byla v práci studována metodou elektroforetického rozptylu světla na Zetasizeru Nano ZS (Malvern Instruments). Pro získání zeta potenciálu ( $\zeta$ ) komplexů byly použity vzorky připravené pro měření distribucí velikosti částic. Získané hodnoty zeta potenciálu představují vždy střední hodnoty z devíti dílčích opakování a jsou prezentovány ve formátu střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka.

### 5.3.3 Turbidimetrie

Interakce tenzidů s hyaluronanem byly studovány pomocí UV-VIS turbidimetrie. Metoda je založena na sledování vzniku zákalu, který indikuje interakci komponent za vzniku agregátů, na kterých dochází k rozptylu světla, jenž se následně projeví zvýšením absorbance vzorku. Pro každý studovaný systém bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 200–600 nm na spektrometru Varian Cary 50 Probes s použitím ponorné sondy proti odpovídajícímu čistému roztoku tenzidu jako blanku. Pro vyhodnocení dat byly použity hodnoty absorbance při 400 nm.

Turbidimetrické titrace byly provedeny přikapáváním hyaluronanu k 25 ml zásobního roztoku tenzidu. Titrace byly prováděny na základě předem navržené titrační řady, která zahrnovala přídavky hyaluronanu s krokem 200, 500, 1000, 2000 a 5000  $\mu\text{l}$ .

Bylo provedeno mapování široké škály koncentrací obou komponent. Během všech experimentů bylo pro kontrolu také prováděno vizuální pozorování vzorků po každém přídavku hyaluronanu. Vzhled vzorku byl porovnáván s čistým roztokem tenzidu.

Získaná data absorbance byly vyneseny do grafu proti poměru nábojů tenzidu a hyaluronanu (značeno jako T/D).

$$T/D = \frac{M_w(DJ) \cdot c_T}{c_{\text{HyA}}}, \quad (13)$$

kde  $M_w$  vyjadřuje molekulovou hmotnost jedné disacharidové jednotky (DJ) řetězce hyaluronanu, tedy  $401,299 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace tenzidu v systému ( $c_T$ ) je ve vztahu vyjádřena v jednotkách  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace hyaluronanu ( $c_{\text{HyA}}$ ) v jednotkách  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Parametr T/D tedy vyjadřuje poměr počtu molekul tenzidu a vazných míst na polymeru vyjádřených koncentrací karboxylových skupin, resp. počtu dimerů na řetězci. Ze získaných závislostí pak byly většinou odečítány hodnoty T/D odpovídající vzniku agregátů v systému.

### 5.3.4 UV-VIS spektrofotometrie

Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na míru solubilizace hydrofobního barviva micelami tenzidu byl studován pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Pro měření absorpčních spekter byl využit UV-VIS spektrofotometr HITACHI. Připravené vzorky byly proměřeny v rozsahu vlnových délek od 400 do 800 nm proti roztoku tenzidu o příslušné koncentraci v přítomnosti nebo nepřítomnosti hyaluronanu o koncentraci odpovídající koncentraci ve vzorku jako blanku. Z absorpčních křivek byly získány hodnoty absorbance při  $\lambda_{\text{max}}$ , které byly následně přepočítány pomocí Lambert-Beerova zákona na koncentrace solubilizovaného barviva v systému. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

### 5.3.5 Cytotoxicita

Testy cytotoxicity, prováděné ve spolupráci s kolegy z Univerzity Karlovy v rámci projektu COST (Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D., Ústav dědičných metabolických poruch), byly nejprve provedeny na buňkách různého typu (osteoblasty, fibroblasty a keranocyty), ke kterým byly přidány komplexy tvořené různou koncentrací tenzidů (Septonex nebo CTAB) a hyaluronanu. Vzorky byly aplikovány do buněčného média v poměru 1:9, což znamená, že docházelo k jejich zředění. Výsledné koncentrace všech testovaných vzorků byly tedy 10krát nižší než připravené komplexy. Další proměnnou v provedených testech byla přítomnost nebo nepřítomnost fetálního bovinního séra (FBS) v růstovém médiu během prvních 4 hodin inkubace (následných 20 hodin inkubace už probíhalo vždy s 15% FBS) a dále dva typy použitých rozpouštědel komplexů (demineralizovaná voda a fyziologický roztok). Po 24 hodinách inkubace (komplexy Septonex-HyA) nebo 2 hodinách inkubace (komplexy CTAB-HyA) byla charakterizována metabolická aktivita buněk pomocí MTS testu.

MTS test (CellTiter 96<sup>®</sup>) je cytotoxický test pro určení počtu živých buněk, který je založen na principu redukce tetrazoliové sloučeniny (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium označovanou jako MTS) životaschopnými buňkami do intenzivně zbarveného formazanu, který je rozpustný v médiu. Za běžných kultivačních podmínek je množství barevního formazanu přímo úměrné počtu životaschopných buněk. Ke kvantifikaci tohoto produktu slouží měření absorpance vzorku při vlnové délce 490 nm.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Indukované agregáty tenzidu s hyaluronanem

V návaznosti na předchozí studium týkající se tohoto tématu a požadavky projektu COST (LD12068) byly studovány interakce tenzidu Septonexu s hyaluronanem. Nejprve byl studován proces agregace samotného tenzidu v prostředí vody a prostředí 0,15M roztoku chloridu sodného. Následně byly studovány interakce tenzidu s hyaluronanem, přičemž vznik agregátů v systému probíhal tzv. indukovaným způsobem, neboli postupným přidáváním tenzidu k roztoku hyaluronanu.

Cílem této etapy bylo porovnání interakce hyaluronanu s tenzidem CTAB a Septonexem a následné posouzení vlivu drobných nuancí ve struktuře kationtové polární hlavy tenzidu na interakce s hyaluronanem. Na základě zjištěných výsledků pak byly vybrány vhodné kombinace koncentrací hyaluronanu a tenzidu pro studium stability těchto komplexů za různých podmínek zahrnujících změnu teploty systému či iontové síly prostředí, zředění systému nebo časovou stabilitu v průběhu skladování již připraveného systému. Stabilita zmíněných komplexů byla studována také z hlediska vlivu molekulové hmotnosti hyaluronanu.

#### 6.1.1 Fluorescenční mapování interakce Septonexu s hyaluronanem

##### 6.1.1.1 Agregáčnı chování Septonexu

Jako základ pro další práci bylo třeba charakterizovat chování samotného Septonexu ve vodě a v prostředí 0,15M roztoku chloridu sodného. Výsledky fluorescenčního měření jsou přehledně zobrazeny na Obr. 25.

Jak je na Obr. 25 jasně vidět, závislost  $EmPI$  na koncentraci tenzidu vykazuje charakteristický jednoduchý sigmoidní průběh. Ze závislosti byly vypočteny hodnoty kritických micelárních koncentrací pomocí parametrů Boltzmannova modelu. Stanovené hodnoty jsou přehledně uvedeny v Tab. 1, ve které jsou pro porovnání uvedeny také hodnoty získané vyhodnocením závislosti  $ExPI$  na koncentraci tenzidu.

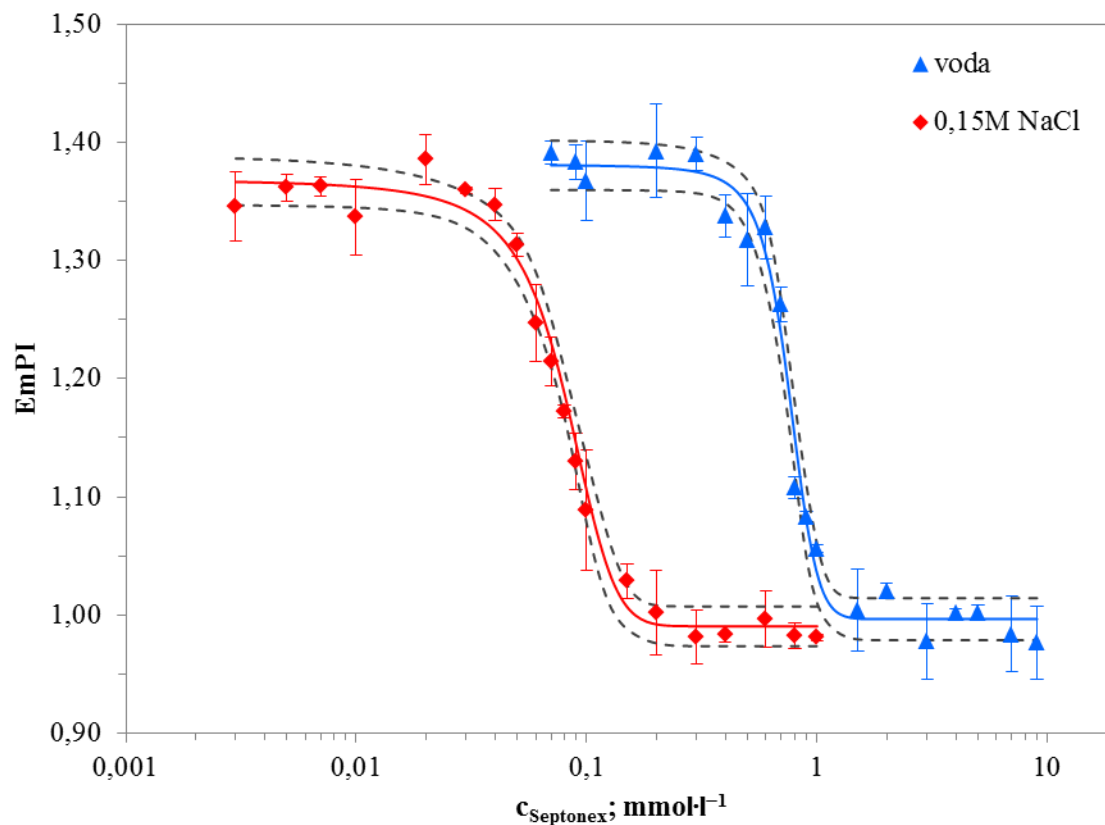
Tab. 1: Hodnoty CMC a parametrů Boltzmannova modelu Septonexu ve vodném prostředí a prostředí 0,15M NaCl

	voda			0,15M NaCl		
	EmPI	ExPI	literární hodnoty	EmPI	ExPI	literární hodnoty
CMC, $mmol \cdot l^{-1}$	0,754±0,018	0,736±0,006	0,78 [147]; 0,77 [148]	0,078±0,002	0,082±0,002	0,11 [148]*
R <sup>2</sup>	0,98	0,99		0,98	0,99	

\* 0,1M NaCl

Z hodnot uvedených v tabulce je patrné, že CMC v soli je snížena o jeden řád oproti vodě z důvodu stínění repulzí mezi kladně nabitými hlavami tenzidů v přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu. Toto chování je u ionogenních tenzidů známé. Dále je

z tabulky zřejmé, že hodnoty CMC získané vyhodnocením obou polaritních indexů se příliš neliší a lze tedy oba parametry využít k vyhodnocení fluorescenčního měření studovaných systémů.



Obr. 25: Závislost  $E_{mPI}$  na koncentraci Septonexu v prostředí vody a 0,15M NaCl. Hladkou barevnou čarou je zobrazeno proložení přímek a přerušovanými černými čarami je zobrazen interval spolehlivosti jednotlivých dat s 95% pravděpodobností

### 6.1.1.2 Interakce při nízkých koncentracích Septonexu

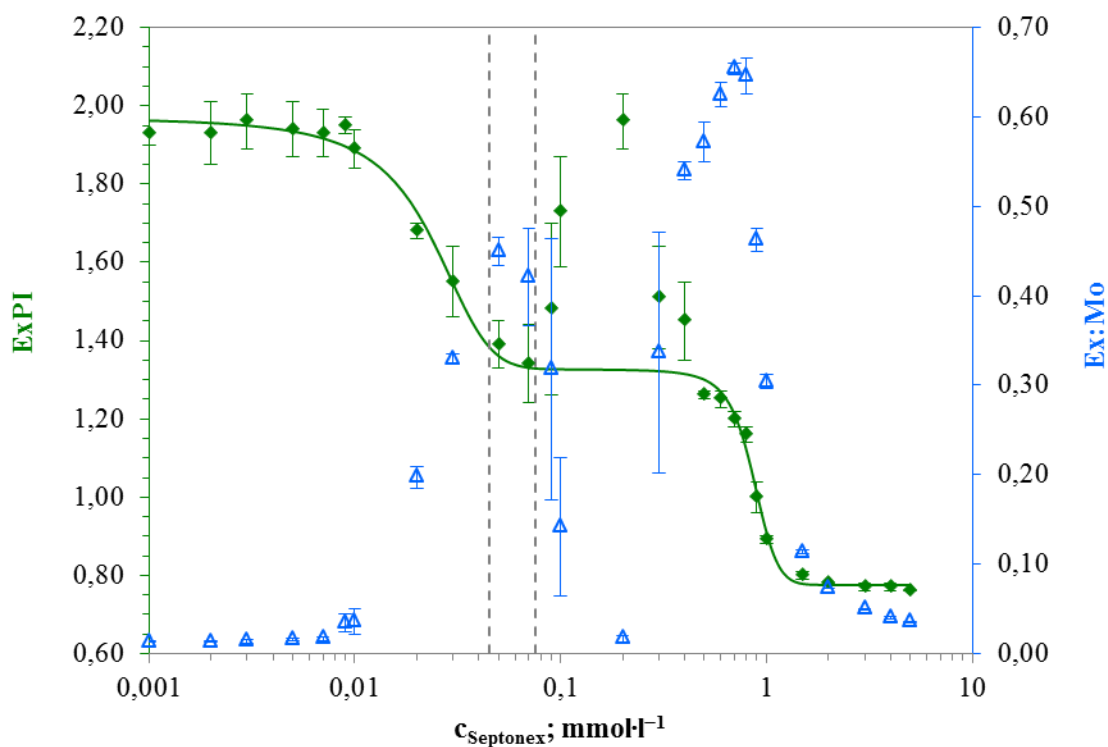
V návaznosti na předchozí práci *T. Halasové* [11] bylo provedeno studium agregace hyaluronanu (100 a 1 500 kDa) o koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  se Septonexem. Tento systém nebyl doposud studován pomocí pyrenové fluorescenční metody z důvodu zákalu při vyšších koncentracích hyaluronanu. Získané výsledky jsou souhrnně sepsány v rukopisu uvedeném v Příloze 3.

Průběh závislosti polaritních indexů na koncentraci Septonexu vykazuje tvar dvojité S-křivky, což naznačuje formaci indukovaných micel na řetězci hyaluronanu a micel volných. Poprvé byly naměřeny tyto křivky při koncentraci hyaluronanu v systému převyšující  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V porovnání s tenzidem CTAB, který byl studován již dříve, byla pozorována jen jedna fázová separace ve formě gelu (Obr. 26) oproti dvěma v případě CTAB. Tato fázová separace byla pozorována v koncentračním rozmezí  $0,07$  až  $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což je oproti CTAB širší interval. Zdá se, že dvě oblasti gelové fázové separace u CTAB se spojily v jednu širší oblast v případě Septonexu. Mimoto byla také oblast indukované agregace širší, respektive první pokles  $E_{mPI}$  byl méně prudký než u CTAB. CAC a CMC jsou pak pro Septonex mírně

vyšší než u CTAB (Tab. 2) pravděpodobně jako výsledek více komplexní struktury molekuly Septonexu, jejíž hlava je obsahuje ethoxykarbonylovou skupinu v blízkosti trimethylamoniové skupiny a ocas je tvořen hydrofobním řetězcem s patnácti uhlíkovými atomy. Principiální rozdíl oproti CTAB je tedy ve struktuře polární hlavy, která je v případě Septonexu objemnější.

Tab. 2: Hodnoty CAC, CMC a parametrů Boltzmannova modelu pro systém Septonex + hyaluronan o různé molekulové hmotnosti a koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

		voda	HyA 100 kDa	HyA 1 500 kDa
CAC; $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$		–	$0,022\pm 0,001$	$0,024\pm 0,001$
CMC; $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$		$0,736\pm 0,001$	$0,901\pm 0,030$	$0,882\pm 0,017$
agregace	$A_1$	–	$1,96\pm 0,01$	$2,34\pm 0,02$
	$A_2$	–	$1,34\pm 0,07$	$1,57\pm 0,02$
	$R^2$	–	0,98	0,99
micelizace	$A_1$	$1,98\pm 0,01$	$1,27\pm 0,03$	$1,48\pm 0,03$
	$A_2$	$0,77\pm 0,01$	$0,77\pm 0,01$	$0,94\pm 0,01$
	$R^2$	0,99	0,98	0,99



Obr. 26: Závislost ExPI a Ex:Mo na koncentraci Septonexu ve vodném roztoku hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa)

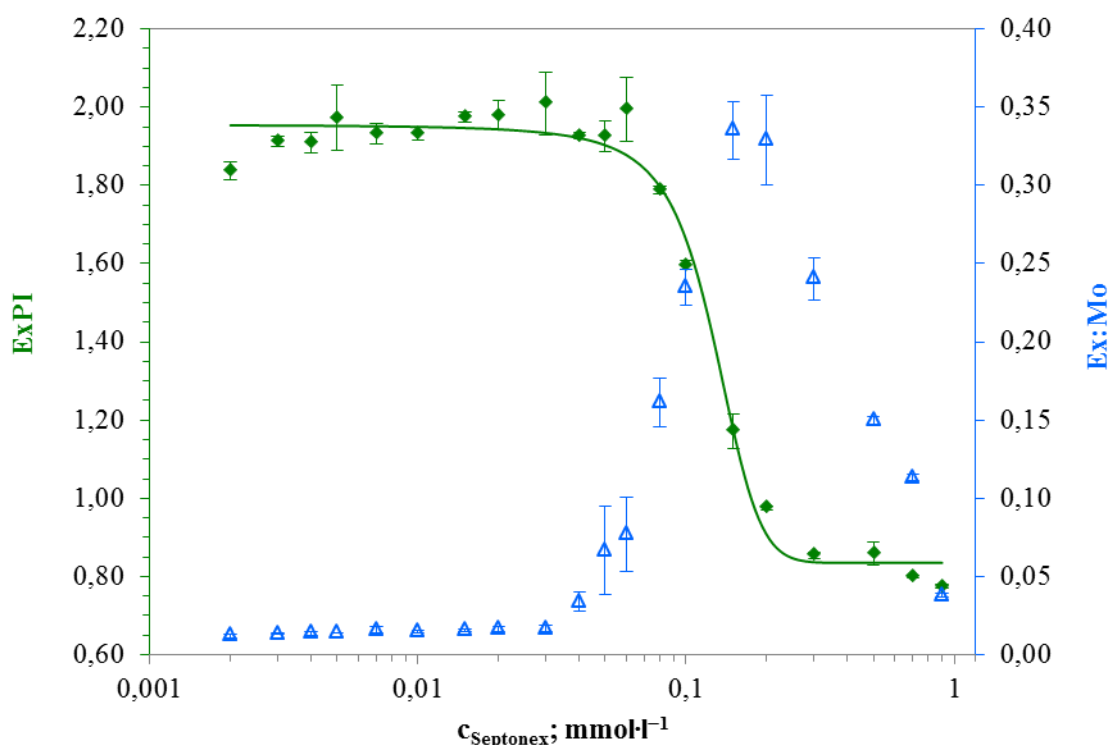
U systémů obsahujících hyaluronan o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebyl první zlom na esovité křivce zdaleka tolik výrazný v porovnání s koncentrací  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a to zejména v případě vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu. Dále byl v případě vysoké koncentrace hyaluronanu pozorován vznik zákalu po překročení koncentrace tenzidu v systému  $0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , po němž následovala fázová separace systému ve formě bílých sraženin, popřípadě gelové vrstvy na stěně vialky v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Se zvyšující se koncentrací tenzidu v systému docházelo k zesílení fázové separace, přičemž ani po překročení kritické micelární koncentrace nedošlo k rozpuštění sraženin či gelové fáze. Fázová separace měla velmi negativní vliv na průběh spektroskopického měření z důvodu rozptylu světelného paprsku na přítomných sraženinách a v důsledku zachycení fluorescenční sondy v agregátech vázaných v gelové fázi a tím pádem významného snížení její koncentrace v objemu vzorku. Fotografie koncentrační řady Septonexu s obsahem hyaluronanu o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a molekulové hmotnosti 100 kDa jsou uvedeny v Příloze 1.

Na Obr. 27 je znázorněna závislost excitačního polaritního indexu na koncentraci Septonexu s přidavkem hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa) v prostředí 0,15M roztoku chloridu sodného. Z grafu je zcela zřejmé, že přítomnost nízkomolekulárního elektrolytu v systému má významný vliv na interakce tenzidu a hyaluronanu v porovnání s prostředím vody (Obr. 25). Interakce těchto komponent jsou závislé zejména na hustotě povrchového náboje micel a náboje na řetězci hyaluronanu a mohou být tedy významně ovlivněny iontovou silou prostředí, ve kterém se nachází. Ve studovaných systémech nebyla zjištěna tvorba indukovaných micel na řetězci hyaluronanu doprovázená prvním zlomem na sigmoidní křivce. Byla detekována pouze tvorba volných micel po překročení kritické micelární koncentrace. Tato koncentrace byla stejně jako v případech bez přítomnosti hyaluronanu snížena přibližně o jeden řád v porovnání s prostředím vody. V přítomnosti hyaluronanu o koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla hodnota CMC Septonexu stanovena na  $0,137\pm 0,011 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco při koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  byla hodnota CMC  $0,082\pm 0,004 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a to nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Porovnáme-li systémy obsahující hyaluronan se systémy bez hyaluronanu, zdá se, že hyaluronan nepatrně potlačuje vliv NaCl na snížení kritické micelární koncentrace, což u CTAB nebylo pozorováno. V případě Septonexu by se tedy mohlo jednat o sterickou citlivost molekul tenzidu na současnou přítomnost soli a polymeru v systému. Tento vliv je výraznější při nízké koncentraci hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Zdá se, že vzájemně mnohem méně interagující řetězce hyaluronanu účinněji potlačují vliv soli na kritickou micelární koncentraci.

V systémech obsahujících nízkomolekulární elektrolyt opět docházelo k fázové separaci převážně ve formě čiré gelové fáze, a to nezávisle na molekulové hmotnosti či koncentraci hyaluronanu, po překročení koncentrace tenzidu v systému  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zmíněná koncentrace tenzidu se nachází v oblasti za kritickou micelární koncentrací. Přítomnost nízkomolekulárního elektrolytu má zřejmě vliv na fázovou rovnováhu v systému i nad kritickou micelární koncentrací.





Obr. 27: Závislost EmPI a Ex:Mo na koncentraci Septonexu s přidavkem hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa) v prostředí roztoku  $0,15\text{M NaCl}$

### 6.1.2 Stabilita indukovaných micel

Kvůli potenciální aplikaci agregátů hyaluronan-tenzid jako nosičových systémů byla provedena základní studie stability zmíněného systému v závislosti na době skladování a odolnosti vůči změnám teploty, přidavku elektrolytu nebo vůči zředění systému. Stabilita byla ověřena detekcí změn signálu fluorescenční sondy a distribuce velikosti částic v systému měřeném pomocí metody dynamického rozptylu světla.

Z průběhu závislosti emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci tenzidu (Obr. 26) byly pro studium stability vybrány koncentrace tenzidu  $0,05$  a  $0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (na Obr. 26 jsou tyto body v rozmezí šedých přerušovaných čar) v kombinaci s hyaluronanem o koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a dvou molekulových hmotnostech (100 a 1 500 kDa). Složení konkrétních studovaných systémů je uvedeno v Tab. 3. Vybrané koncentrace byly v koncentračních závislostech lokalizovány za kritickou agregační koncentrací v homogenní oblasti, tedy před gelovou fázovou separací.

Stabilita připravených komplexů byla studována za přítomnosti solubilizátu pomocí metody fluorescenční spektroskopie. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren, přičemž ze změny hodnoty emisního a excitačního polaritního indexu (EmPI, ExPI) a ze změny poměru intenzity fluorescence excimeru a monomeru (Ex:Mo) bylo usuzováno na změny ve struktuře a stabilitě komplexů. Stabilita systému byla studována z hlediska zředění systému, vlivu iontové síly, teploty a času skladování systému. Popis jednotlivých experimentů je uveden dále. Interakce komponent byla souběžně studována také pomocí metody dynamického

rozptylu světla, kdy byla měřena velikost částic v systému. Pro tato měření byly ovšem komplexy připraveny bez fluorescenční sondy, která by mohla mít negativní vliv na měření. Část výsledků byla prezentována na konferenci Nanocon 2014, článek ve sborníku.

Tab. 3: Složení komplexů pro experimenty ověřující stabilitu systému tenzid-HyA při nízkých koncentracích HyA

označení	koncentrace tenzidu	koncentrace a molekulová hmotnost hyaluronanu
A1	CTAB 0,05 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 100 kDa
A2	CTAB 0,05 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 1 500 kDa
A3	CTAB 0,07 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 100 kDa
A4	CTAB 0,07 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 1 500 kDa
B1	SPTX 0,05 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 100 kDa
B2	SPTX 0,05 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 1 500 kDa
B3	SPTX 0,07 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 100 kDa
B4	SPTX 0,07 mmol·l <sup>-1</sup>	HyA 15 mg·l <sup>-1</sup> ; 1 500 kDa

Obecně lze říci, že nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi tenzidem CTAB a Septonexem. Oba tenzidy se v komplexech s hyaluronanem chovají podobně. Distribuce velikosti částic před změnou teploty nebo před modifikací složení systému jsou většinou stejné nebo velmi podobné. Posun maxima distribuce velikosti částic neukázal žádný významný trend v závislosti na druhu tenzidu. Fluorescenční parametry EmPI a ExPI naznačují podobnou polaritu systémů za daných podmínek, zatímco Ex:Mo poměr je mírně nižší pro systémy obsahující Septonex v porovnání se systémy s CTAB pravděpodobně kvůli mírně odlišným hodnotám CAC a CMC obou tenzidů. Koncentrace tenzidů 0,05 a 0,07 mmol·l<sup>-1</sup> jsou v případě Septonexu blízko oblasti CAC, ačkoli v případě CTAB jsou tyto koncentrace v oblasti fázové separace mezi CAC a CMC.

### 6.1.2.1 Časová stabilita

Stabilita komplexů tenzid-hyaluronan byla studována v závislosti na čase skladování připravených systémů. Pyrenové polaritní indexy ukazují mírné změny během tří měsíců skladování při 4 °C. Na Obr. 28 je znázorněn příklad závislosti hodnot ExPI a pravděpodobnosti tvorby excimeru v systému na době skladování. Výsledky poukazují na stabilitu formovaných hydrofobních domén a jejich schopnost solubilizace. ExPI hodnoty okolo 1,3 odpovídají výskytu indukovaných micel v systému po kritické agregační koncentraci. Poměr Ex:Mo klesá v čase, zejména v průběhu prvního týdne skladování. To ukazuje na nerovnoměrnou distribuci solubilizovaných molekul pyrenu po přípravě vzorku. Během skladování je pyren v systému redistribuován více rovnoměrně a proto pravděpodobnost tvorby excimeru klesá. Lze na to pohlížet jako na „zrání“ systému obsahujícího solubilizovaný hydrofob. Všechny studované systémy vykazují obdobný trend fluorescenčních parametrů.

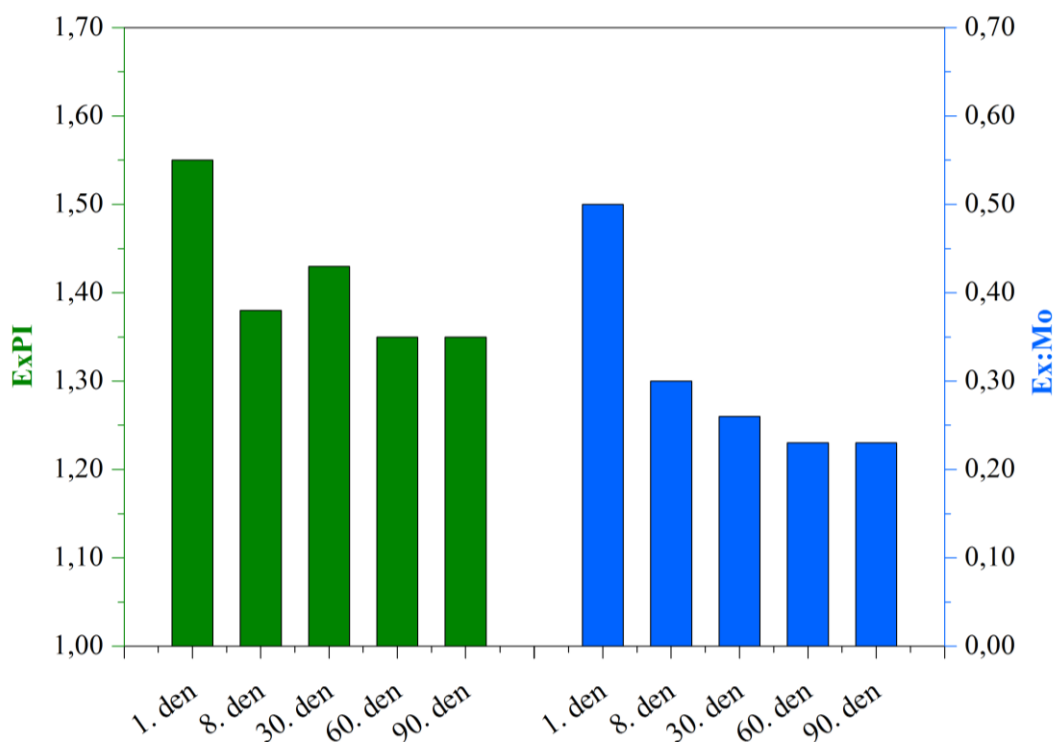
Z hlediska distribuce velikosti částic byly zjištěny jen zanedbatelné změny, přičemž systém zůstává v čase monodisperzní s částicemi o velikosti v rozmezí 200 až 400 nm.

Pro studium stability v čase byly vzorky proměřeny 1. den, 2. den, 8. den, 15. den, 22. den a 29. den po namíchání vzorku. Dále byly vzorky změřeny také po dvou a třech měsících po namíchání. Mezi jednotlivými měřeními byly vzorky skladovány v lednici při teplotě 4 °C. Vzorky byly před měřením vždy vytemperovány na laboratorní teplotu.

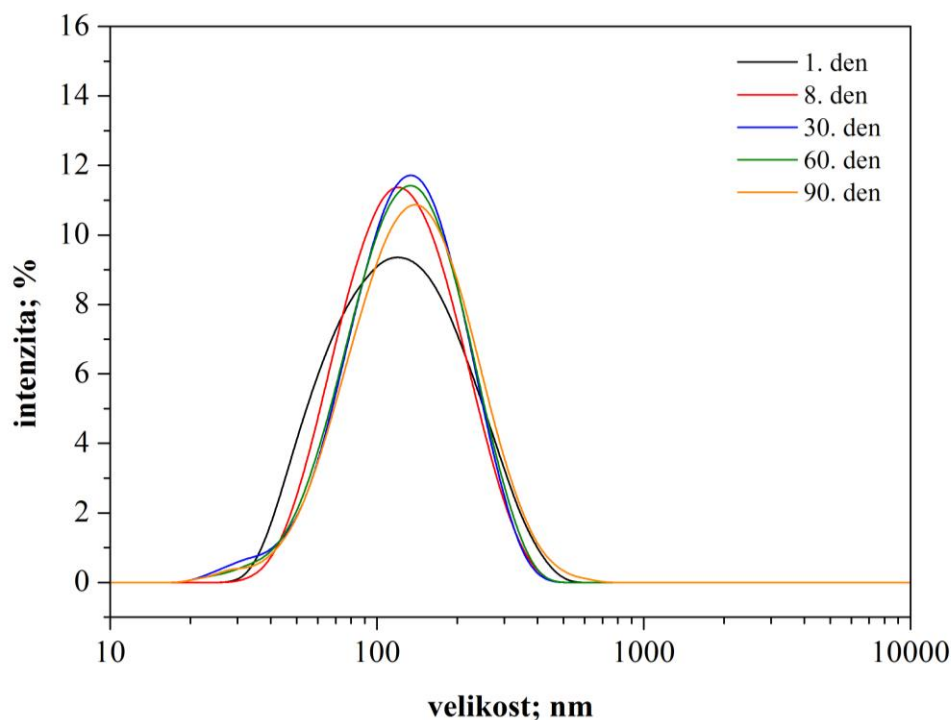
Bylo zjištěno, že kvalita hydrofobních domén v systému se z hlediska emisního polaritního indexu v čase nemění. Tento index zůstává v čase relativně stabilní, polarita v okolí fluorescenční sondy se tedy nijak významně nemění.

Z hlediska poměru Ex:Mo bylo pozorováno, že pravděpodobnost tvorby excimeru se s časem snižuje. S ohledem na neměnicí se hodnoty polaritního indexu by pokles tvorby excimeru mohl být způsoben přeorganizováním systému respektive molekul pyrenu v systému. První den po namíchání vzorku je systém ještě relativně nestabilní a přítomné agregáty ve vzorku, například micely, poskytují jistý hydrofobní prostor pro danou koncentraci molekul pyrenu. Tvorba excimeru je v těchto systémech relativně rychlá a její pravděpodobnost je vyšší. S postupem času dochází k rovnoměrnějšímu rozložení molekul pyrenu po přítomných agregátech a pravděpodobnost tvorby excimeru se tím snižuje. Systém se stává jak z hlediska struktury složek a uspořádání systému, tak z hlediska rozložení sondy v systému stabilnějším.

Z distribučních křivek měření velikosti částic bylo zjištěno, že se v daných systémech vyskytuje převážně jedna velikost částic (150 nm) a že se distribuce velikostí částic v čase téměř nemění.



Obr. 28: Závislost ExPI a Ex:Mo na čase skladování systému obsahujícím Septonex 0,05 mmol·l<sup>-1</sup> a hyaluronan 15 mg·l<sup>-1</sup>, 100 kDa



Obr. 29: Distribuce velikostí částic v systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa

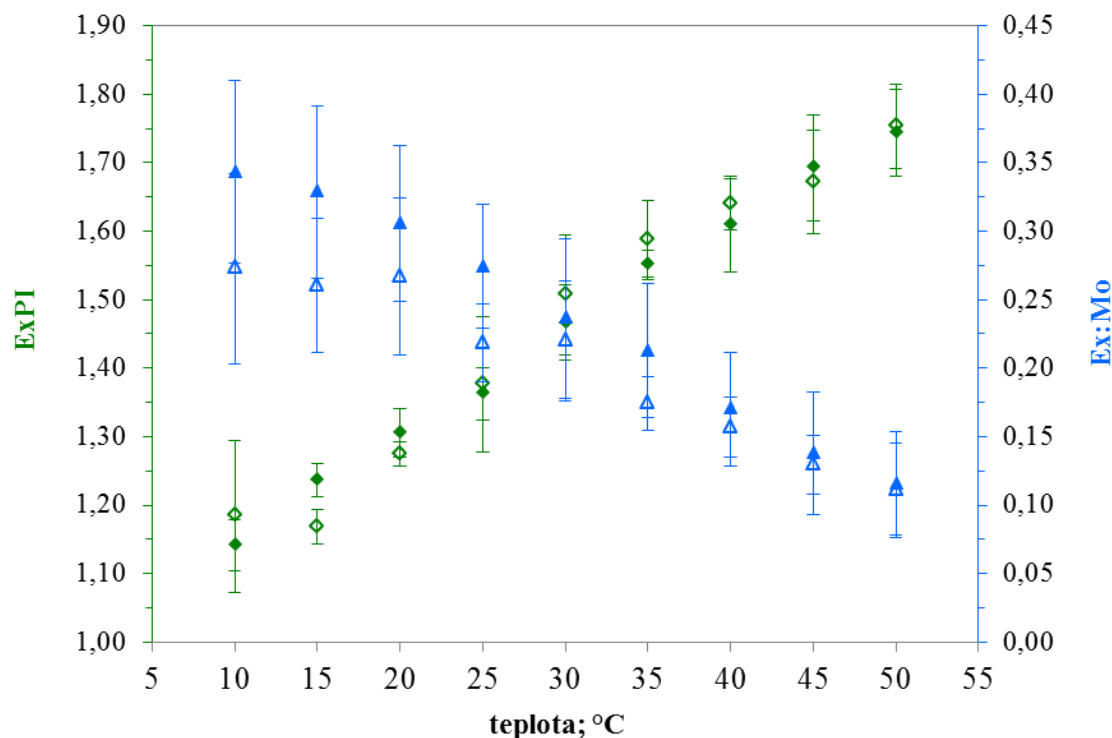
### 6.1.2.2 Teplotní stabilita

Dále byla stabilita komplexů tenzid-hyaluronan studována z hlediska teplotních změn systému. Polaritní indexy EmPI a ExPI se vzrůstající teplotou v rozmezí 10–50 °C mírně vzrůstají nebo zůstávají relativně konstantní. Nejvýznamnější změny polaritních indexů se projevily u systému s koncentrací tenzidu  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  v kombinaci s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 100 kDa (Obr. 30). Zjištěné změny v polaritě ukazují, že obal agregátů se s rostoucí teplotou stává méně kompaktní a umožňuje tedy penetraci vody hlouběji do hydrofobního jádra pravděpodobně kvůli zvýšení pohyblivosti tenzidových molekul s rostoucí teplotou. Při vyšších teplotách pak polaritní indexy odpovídají situaci, kdy jsou micelové agregáty dezintegrovány a pyrenové molekuly emitují z prostředí vody. Poměr Ex:Mo klesá s rostoucí teplotou, což odpovídá poklesu pravděpodobnosti tvorby excimeru. Opět jde o výsledek redistribuce pyrenu spojený se ztrátou struktury micelárních agregátů. Je však nutné poznamenat, že strukturální změny v systému byly reverzibilní, fluorescenční parametry se vrátily přibližně na původní hodnoty při snižování teploty z 50 na 10 °C.

Porovnáním obou tenzidů bylo zjištěno, že v případě systémů obsahujících tenzid Septonex jsou průběhy závislosti polaritních poměrů či pravděpodobnosti tvorby excimeru na teplotě obdobné jako v případě systémů s CTAB. Pouze konkrétní hodnoty poměrů jsou vyšší, což naznačuje vyšší polaritu v okolí sondy a menší těsnost stěn přítomných micel. V obou případech se hodnoty polaritních indexů EmPI či ExPI při ohřevu a chlazení víceméně překrývají, což značí, že je systém při změnách teploty relativně stabilní. Vzrůstající trend polaritního indexu při rostoucí teplotě systému je vždy výraznější u excitačního polaritního indexu. Emisní polaritní index se v rámci překryvu chybových úseček zdá být víceméně

konstantní nebo narůstá jen velice zlehka. Závislost pravděpodobnosti tvorby excimeru na teplotě má u obou tenzidů obdobný průběh – s rostoucí teplotou dochází k jejímu snížení. S ohledem na hodnoty EmPI je pravděpodobné, že s rostoucí teplotou dochází k rozpadu micel v systému, čímž se snižuje také pravděpodobnost tvorby excimeru.

Bylo zjištěno, že změna teploty systému má jen minimální vliv na velikost částic. Ve většině případů docházelo ke změnám v řádu jednotek nanometrů, což je zanedbatelná hodnota. Také nebyl sledován žádný významný trend ani v těchto malých rozdílech velikosti částic.



Obr. 30: Závislost ExPI a Ex:Mo na rostoucí (plné body) nebo klesající (prázdné body) teplotě během měření systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , 100 kDa

### 6.1.2.3 Vliv iontové síly

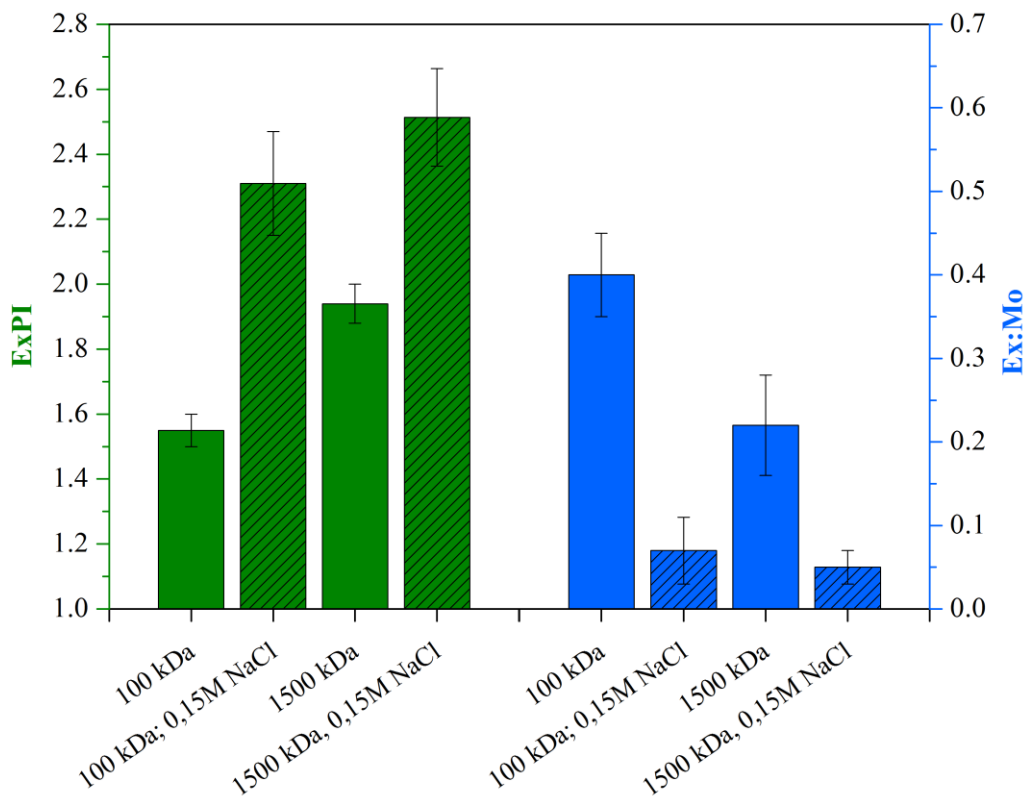
Jak už bylo zmíněno, přítomnost nízkomolekulárního elektrolytu v systému během směšování hyaluronanu a tenzidu má silný vliv na jejich vzájemné interakce. V našem případě byla testována stabilita agregátů hyaluronan-tenzid připravených v čisté vodě oproti přidavku NaCl ve fyziologické koncentraci. Polaritní indexy vykazují nárůst po přidavku NaCl indikující dezintegraci agregátů v systému. Ex:Mo poměr naopak vykazuje významný pokles, který odpovídá strukturální změně v systému, která nastává jako výsledek elektrostatických repulzí v systému po přidavku NaCl (Obr. 31).

Strukturální změny se projeví také změnou distribuce velikosti částic v systému. Ve vodném roztoku byl systém převážně monodisperzní a velikost částic se pohybovala v rozmezí 100–150 nm. Po přidavku NaCl se systém stal polydisperzní a velikost částic se pohybovala v rozmezí 30 až 5500 nm s různou distribucí (Obr. 32).

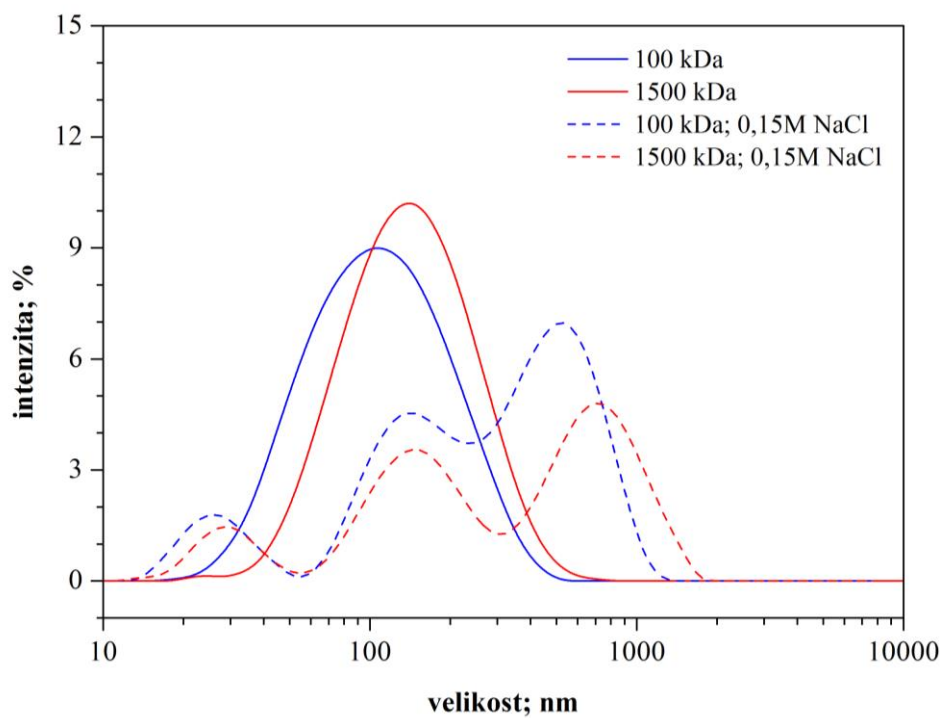
Vliv iontové síly na stabilitu systému byl studován tak, že byl systém připraven ve vodě, byly zjištěny hodnoty polaritních indexů a hodnoty pravděpodobnosti tvorby excimeru Ex:Mo. Poté bylo do roztoku přidáno malé množství nasyceného roztoku NaCl tak, aby výsledná koncentrace NaCl ve vzorku byla  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Systém byl proměřen po 5 minutách míchání a byl proměřen také po 24 hodinách míchání. Bylo zjištěno, že komplexy jsou ihned po přidání NaCl narušeny, zejména v případě systému se Septonexem. Po 24 hodinách míchání byla pozorována výrazná změna emisního polaritního indexu po přidání nízkomolekulárního elektrolytu. U systémů obsahujících CTAB o koncentraci  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dochází po zvýšení iontové síly roztoku k výraznějšímu nárůstu indexu EmPI než v případě koncentrace  $0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Obdobná situace nastává i u systémů obsahujících Septonex. Stejně tak lze pozorovat rozdíly v pravděpodobnosti tvorby excimeru. Systémy s nižší koncentrací tenzidu vykazují zprvu vysokou pravděpodobnost tvorby excimeru, kdežto po přidání soli do roztoku dochází k výraznému snížení poměru Ex:Mo, což značí rozpad přítomných agregátů. U systémů s koncentrací  $0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  tenzidu byl pozorován vznik lehkého gelového lemu na stěně vialky, který způsobil zachycení fluorescenční sondy v agregátech vázaných v této gelové fázi, čímž byly získány fluorescenční signál a pravděpodobnost tvorby excimeru sníženy. Toto snížení lze s ohledem na výsledky měření velikosti agregátů vysvětlit také zvýšením polydisperzity systému po přidavku NaCl a ustálení systému během 24 hodin, což souvisí s nižší pravděpodobností tvorby excimeru v micelách. V systému se mohly vytvořit také agregáty, které však nedovolují takovou solubilizaci molekul pyrenu nebo jsou tyto agregáty pro molekuly pyrenu méně přístupné z hlediska rychlosti difúze.

Dále je z těchto výsledků patrné, že systém jako takový není přítomností hydrofobního solutu nijak stabilizován a přidavek malého množství nízkomolekulárního elektrolytu způsobuje významné změny v systému.

U systémů obsahujících Septonex dochází ihned po přidání NaCl ke zvýšení emisního polaritního indexu, což ukazuje na rozpad micel v systému vlivem odstínění elektrostatických interakcí. Tato nestabilita je ovšem pouze dočasná, jelikož po 24 hodinách míchání bylo možné pozorovat návrat téměř k původním hodnotám. S ohledem na odpovídající pravděpodobnosti tvorby excimeru, kde po přidavku NaCl a po 24 hodinách míchání dochází k výraznému poklesu, můžeme tvrdit, že vlivem přítomnosti NaCl dochází k výraznému zvětšení agregátů v systému. Tento fakt je pak zejména u systémů se Septonexem potvrzen výsledky měření dynamického rozptylu světla.



Obr. 31: Závislost ExPI a Ex:Mo systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) ve vodě a v roztoku  $0,15 \text{ M NaCl}$  (šrafovaná výplň sloupců)



Obr. 32: Distribuce velikosti částic systému obsahujícím SPTX  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) ve vodě a v roztoku  $0,15 \text{ M NaCl}$

#### 6.1.2.4 Vliv zředění

Stabilita komplexů tenzid-hyaluronan byla studována také z hlediska zředění systému, které je velmi důležitým aspektem, budeme-li o studovaných systémech uvažovat jako o potenciálních nosičových systémech. Ředění bylo provedeno pomocí roztoku hyaluronanu v odpovídající koncentraci a molekulové hmotnosti, čímž bylo dosaženo snížení koncentrace tenzidu v systému. Opět byly sledovány změny hodnot polaritních parametrů a pravděpodobnosti tvorby excimeru v systému reagující na změnu složení systému.

Bylo zjištěno, že hodnota excitačního polaritního indexu vykazuje značný nárůst po naředění systému a to zejména pro koncentraci tenzidu před zředěním  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 33). V případě vyšší koncentrace tenzidu ( $0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) není zvýšení ExPI tak výrazné. Nárůst ExPI je pravděpodobně způsoben rozpadem hydrofobních domén v systému, což potvrzuje i výrazný pokles pravděpodobnosti tvorby excimeru.

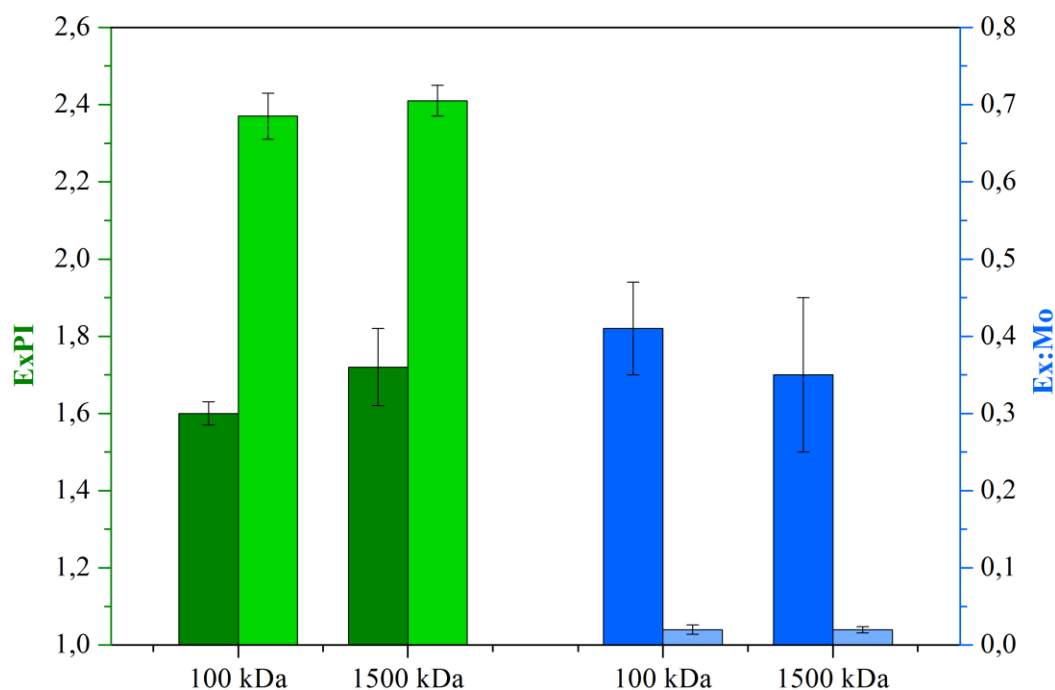
Rozpad micelárních agregátů v systému potvrzuje také výrazný pokles pravděpodobnosti tvorby excimeru v systému po jeho zředění. Před zředěním systému jsou hodnoty tohoto indexu ve všech případech relativně vysoké (0,4–0,6), což naznačuje, že jsou v roztoku přítomny první micely, či minimicely vázané na řetězec hyaluronanu s ohledem na koncentraci tenzidu v systému. Hydrofobní molekuly pyrenu se začínají lokálně koncentrovat v těchto prvních agregátech a pravděpodobnost tvorby excimeru je tedy vysoká. Po zředění systému hodnoty Ex:Mo padají téměř k nule, což naznačuje, že agregáty přítomné v systému se rozpadají.

Je potřeba zdůraznit, že naředěním systému pomocí hyaluronanu došlo k desetinásobnému snížení teoretického poměru vazných míst tenzidu a hyaluronanu (T/D). Před zředěním byla hodnota T/D rovna 1,34 resp. 1,87 v závislosti na koncentraci tenzidu v systému. Po zředění systému pravděpodobně došlo k přeuspořádání tenzidových molekul na řetězci hyaluronanu, které mělo za následek absenci hydrofobních domén v systému. Zaznamenaná intenzita pyrenu odpovídá spíše signálu z vodného prostředí. Během ředění došlo také k simultánnímu snížení koncentrace fluorescenční sondy v systému z  $2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na  $2\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Přestože je molekula pyrenu obecně považována za hydrofobní, je schopna se v nízkých koncentracích rozpustit i ve vodě (nasycený roztok pyrenu ve vodě má koncentraci  $6,8\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  [146]). Získaný fluorescenční signál byl tedy pouze signál pyrenu z vodného prostředí, čemuž odpovídá také vyšší hodnota polaritního indexu a nižší intenzita fluorescence.

V případě emisního polaritního indexu nejsou změny tak výrazné jako u ExPI, ale trend zůstává podobný, což naznačuje vyšší citlivost ExPI vůči signálu pyrenu z vodného prostředí.

Měření velikosti částic bylo zjištěno, že před zředěním je systém ve většině případů monodisperzní s velikostí částic v rozsahu 100 až 400 nm, zatímco zředění systému má za následek zvýšení polydisperzity a to zejména v případech systémů s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 500 kDa. Zvýšení polydisperzity a velikosti částic v systému je opět vysvětlováno rozpadem agregátů v systému, což potvrzují i získané hodnoty „derived count rate“. Ty se po zředění systému značně snížily, což poukazuje na snížení koncentrace částic v systému.





Obr. 33: Závislost ExPI a Ex:Mo systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) před (tmavší sloupce) a po zředění (světlejší sloupce) systému.

### 6.1.2.5 *Sumárně*

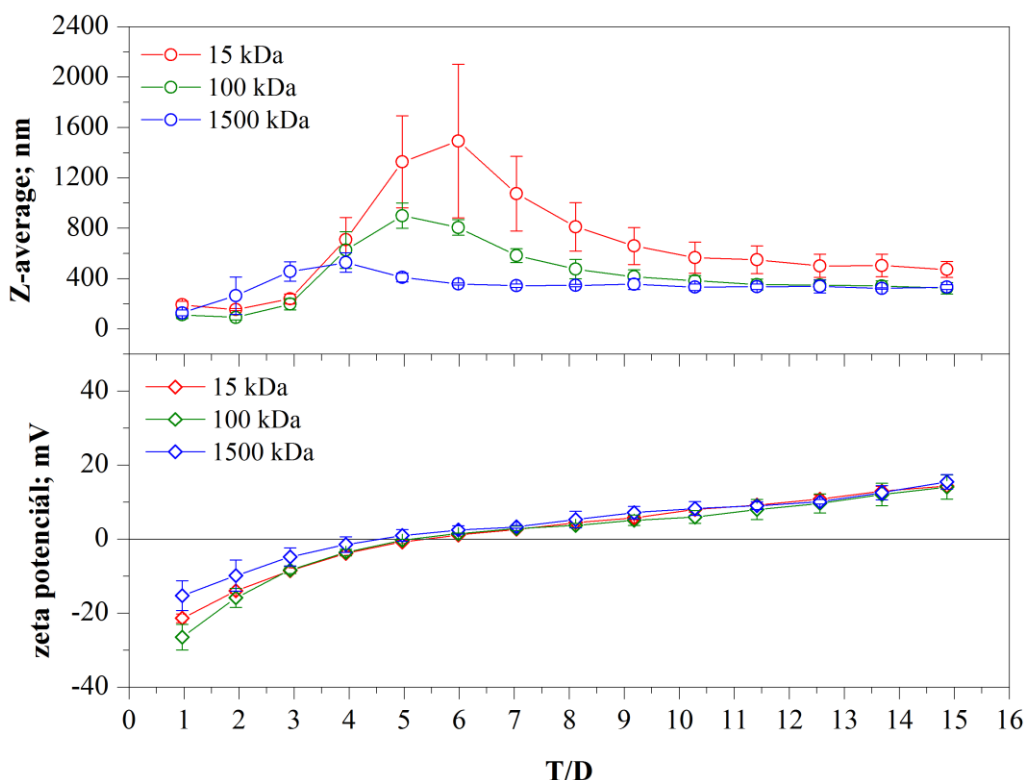
Fluorescenční spektroskopie a dynamický rozptyl světla poskytují mnoho informací o stabilitě systému hyaluronan-tenzid. Bylo zjištěno, že agregáty vytvořené v homogenních systémech představovaných hyaluronanovými řetězci s indukovanými micelami jsou ovlivňovány celou řadou aspektů, jako je iontová síla roztoku, teplota či doba skladování finálních systémů. Molekulová hmotnost hyaluronanu a malý rozdíl mezi koncentracemi komponent ovlivňuje stabilitu systému minimálně. Bylo zjištěno, že během skladování systémů po dobu tří měsíců byly agregáty stabilní, ale velmi citlivé na různé rušivé podněty. Nejmenší vliv na stabilitu systémů byl pozorován u teplotních experimentů, kdy topné a chladicí cykly způsobovaly reverzibilní změny struktury agregátů. Naopak při zředění systému nebo zvýšení iontové síly byly pozorovány významné změny, destabilizace agregátů a uvolňování solubilizované hydrofobní látky z agregátů. Jejich potenciální aplikace jako nosičové systémy pro dodávání hydrofobních aktivních látek je tedy sporná.

### 6.1.3 Studium interakce tenzidu a hyaluronanu pomocí DLS titrací

Agregace hyaluronanu s tenzidy byla studována také pomocí metody dynamického rozptylu světla a elektroforetického rozptylu světla, kdy byla zkoumána velikost částic v systému a zeta potenciál systému. Při studiu stability systému byla největší pozornost věnována oblasti vysycení nábojů v systému, resp. oblasti nulového zeta potenciálu. Tato oblast je zajímavá z hlediska fázové separace systému, ke které dochází buď vratně či nevratně a to zejména v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Interakce hyaluronanu s tenzidy byly studovány pomocí titračních experimentů, kdy byl roztok tenzidu titrován do definovaného objemu roztoku hyaluronanu ( $0,015$  nebo  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) o různých molekulových hmotnostech ( $15$ ,  $100$  a  $1\ 500 \text{ kDa}$ ).

Na Obr. 34 je znázorněn průběh titračního experimentu, resp. závislost průměrné velikosti částic a zeta potenciálu systému na poměru T/D, který vyjadřuje poměr počtu molekul tenzidu a vazných míst na polymeru vyjádřených koncentrací karboxylových skupin, resp. počtu dimerů na řetězci. Znázorněný příklad odpovídá titraci Septonexu o koncentraci  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do roztoku hyaluronanu o koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .



Obr. 34: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan-Septonex

Na obrázku je vidět, že postupným přidáváním kladně nabitých tenzidů do definovaného množství hyaluronanu dochází k postupnému zvyšování zeta potenciálu systému. Ten nám poskytuje informaci o vnějším náboji agregátů v systému. Na začátku titrace, kdy je hodnota zeta potenciálu okolo  $-20 \text{ mV}$ , jsou v systému přítomny relativně stabilní agregáty tenzidu a hyaluronanu. S rostoucí hodnotou zeta potenciálu dochází k postupnému oslabování nábojů mezi jednotlivými agregáty. V blízkosti izoelektrického bodu, tedy v okolí nulového zeta potenciálu, dochází ke ztrátě odpudivých sil mezi agregáty, což vede ke shlukování agregátů, fázové nestabilitě a nakonec i fázové separaci systému ve formě sraženin. Fázová separace je pak v grafu charakterizována nárůstem průměrné velikosti částic. Na Obr. 34 je znázorněna závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) na poměru T/D v systému hyaluronan-Septonex pro tři molekulové hmotnosti hyaluronanu. V okolí nulového zeta potenciálu dochází překvapivě k největšímu nárůstu ve velikosti agregátů u systému, který obsahuje hyaluronan o nejnižší molekulové hmotnosti ( $15 \text{ kDa}$ ). V rámci směrodatných odchylek jsou však hodnoty velmi

blízké hodnotám pro molekulovou hmotnost 100 kDa. V případě velmi krátkého řetězce hyaluronanu pravděpodobně dochází ke tvorbě agregátů, které mají mnohem lépe definovaný tvar a velikost než v případě vyšších molekulových hmotností hyaluronanu (hlavně 1 500 kDa). S nárůstem molekulové hmotnosti hyaluronanu dochází také k nárůstu velikosti polymerních klubek, resp. hydrodynamických domén. Zejména při nízké koncentraci hyaluronanu mají tyto větší klubka a potažmo také jejich agregáty s tenzidovými molekulami mnohem méně definovaný tvar a jsou tedy mnohem hůře měřitelné pomocí metody dynamického rozptylu světla. Bylo zjištěno, že roztok čistého hyaluronanu je velmi polydisperzní a obtížně měřitelný a již malý přídavek tenzidu do roztoku hyaluronanu způsobí snížení průměrné velikosti detekovaných částic a jejich polydisperzity. Tento trend je však potlačen s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu.

V Tab. 4 jsou uvedeny hodnoty poměrů T/D při nulovém zeta potenciálu systému hyaluronan-tenzid. Porovnáním těchto hodnot obou tenzidů je zřejmé, že v případě nízké koncentrace hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) dochází u Septonexu k vyrovnání nábojů v systému při nižším poměru T/D oproti CTAB, tedy při menším počtu molekul tenzidu připadající na disociovanou karboxylovou skupinu na řetězci hyaluronanu. Rozdílnost v hodnotách je tedy pravděpodobně výsledkem sterického bránění interakcí v důsledku více komplexní struktury ethoxykarbonylového kationtu Septonexu. Obdobné rozdíly v interakcích byly zjištěny také pomocí fluorescenčních měření. Jelikož je v případě vysoké koncentrace hyaluronanu  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  rozdíl obou tenzidů zanedbatelný, jedná se pravděpodobně také o vliv struktury hyaluronanu v roztoku na interakce molekul v systému.

Tab. 4: Izelektrické body pro titraci tenzidu (CTAB nebo SPTX) do hyaluronanu o koncentraci  $0,015$  nebo  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a molekulové hmotnosti 15, 100 nebo 1 500 kDa

c HyA	$M_w$ HyA	IEP (vyjádřeno v T/D)	
		CTAB	SPTX
$0,015 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	15 kDa	$7,11\pm 0,51$	$5,35\pm 0,19$
	100 kDa	$7,78\pm 0,49$	$5,04\pm 0,13$
	1 500 kDa	$8,26\pm 0,58$	$5,06\pm 0,26$
$1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	15 kDa	$1,24\pm 0,08$	$1,03\pm 0,15$
	100 kDa	$1,44\pm 0,18$	$1,23\pm 0,06$
	1 500 kDa	$1,26\pm 0,04$	$1,24\pm 0,01$

Porovnáním systémů s různou koncentrací hyaluronanu je jasně patrné, že koncentrace hyaluronanu v systému má významný vliv na interakce s molekulami tenzidů. Překvapivé jsou pak vysoké hodnoty T/D při nižší koncentraci hyaluronanu. Tyto vysoké hodnoty poukazují na dobře vyvinuté a nabitě agregáty, kde na jeden náboj hyaluronanu připadá více molekul tenzidu. Vliv koncentrace hyaluronanu na hodnotu T/D v izoelektrickém bodě lze vysvětlit na základě konformace hyaluronanu v roztoku. Při nízké koncentraci ( $0,015 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) jsou volné a relativně natažené řetězce hyaluronanu volně rozprostřené v celém objemu roztoku. Přikapáváním tenzidu dochází k postupnému obsazování vazných míst na hyaluronanu molekulami tenzidu a vzniku agregátů s tzv. bottle brush strukturou [149; 150].

Postupným přidavkem tenzidu dochází k vysycení vazných míst na hyaluronanu a tvorbě tzv. indukovaných micel. Vzniká struktura tzv. perlového náhrdelníku, kdy jsou na řetězci hyaluronanu vázané agregáty podobné micelám, ovšem o menší velikosti než jsou odpovídající volné micely [150]. Statisticky pak na jeden záporný náboj hyaluronanu může připadat větší počet kladných nábojů tenzidu.

Tato teorie byla ověřena porovnáním hodnot T/D s výsledky fluorescenčního měření (kapitola 6.1.1). Bylo zjištěno, že vysoké hodnoty T/D odpovídají situaci, kdy v systému dochází k fázové separaci v oblasti za kritickou agregační koncentrací. Pro Septonex odpovídají nejvyšší hodnoty EmPI (Obr. 26) během fázové separace poměru T/D=5,35.

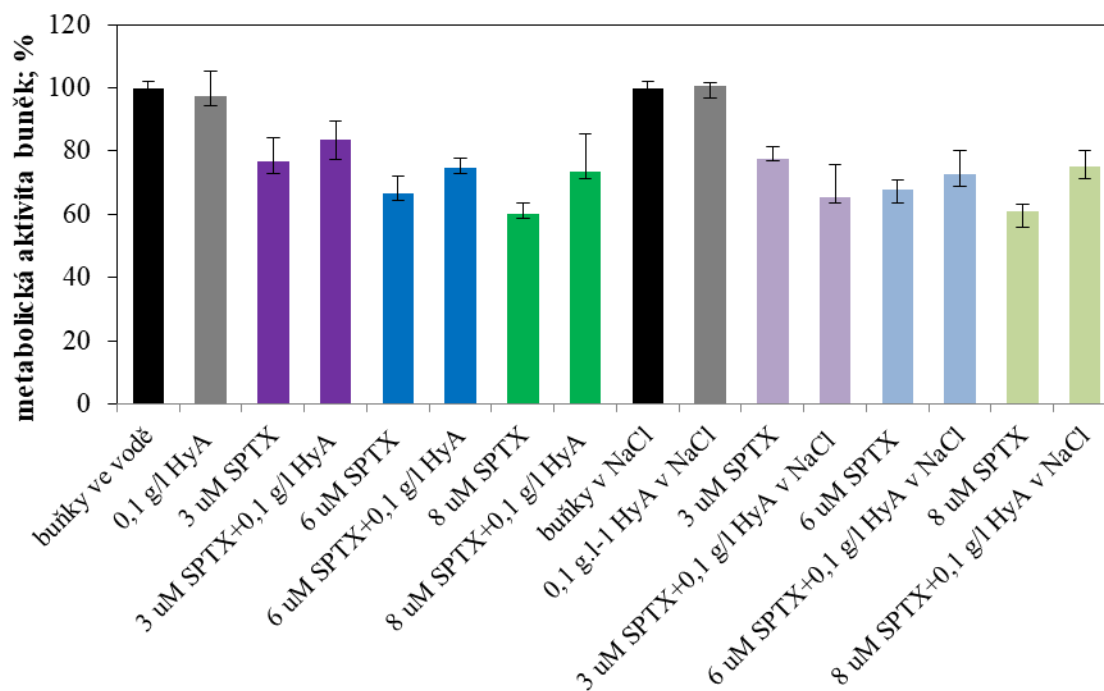
Naopak při vysoké koncentraci hyaluronanu zaujímají jeho řetězce strukturu klubka, čímž se některé náboje na řetězci sbalují do vnitřního prostoru klubka a stávají se tím méně přístupné pro interakce s molekulami tenzidu. Tenzid se proto váže zejména zvenku na polymerní klubka a k vysycení záporných nábojů tak stačí přibližně 6krát menší počet molekul tenzidu, než je tomu v případě nataženého řetězce při nízké koncentraci hyaluronanu. V systému tedy může docházet k postupnému obsazování nábojů na hyaluronanu jednotlivými molekulami tenzidu, aniž by vznikaly indukované micely. Pravděpodobněji však může jít o případ, kdy jedna micela interaguje s vícero řetězci hyaluronanu, čemuž by odpovídalo i mnohem intenzivnější srážení systému v oblasti nulového zeta potenciálu, který mnohdy způsobil značné komplikace při měření. V systému byly tvořeny sraženiny, které byly stabilní a nerozpustné i po přesycení systému tenzidem.

S dalším nárůstem zeta potenciálu a tedy i obsahu tenzidu v systému dochází ke znovuzískání stability systému a rozpuštění přítomných sraženin. To je však ovlivněno koncentrací i molekulovou hmotností hyaluronanu. Lze říci, že čím menší molekulová hmotnost, tím snadněji dochází k rozpuštění sraženin v systému a to i přesto, že menší molekulová hmotnost má za následek tvorbu větších sraženin. Tyto sraženiny jsou ale zřejmě mnohem méně stabilní a kompaktní než je tomu u vyšších molekulových hmotností hyaluronanu.

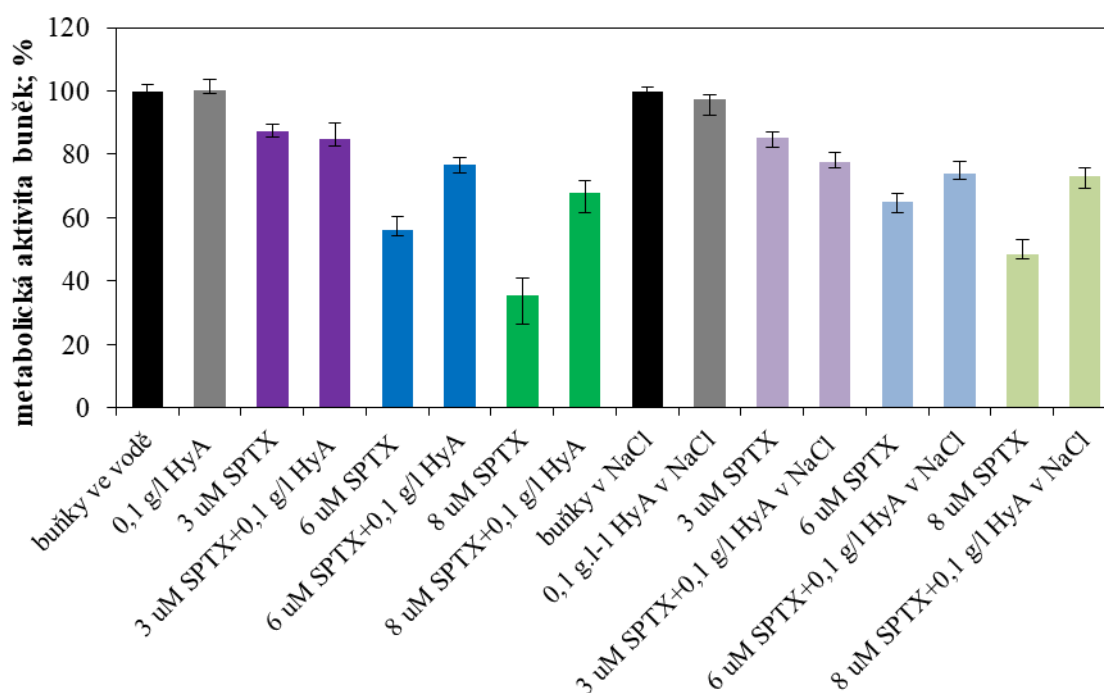
#### 6.1.4 Testy na buňkách

Byly provedeny pilotní testy cytotoxicity systémů obsahujících indukované agregáty hyaluronanu a Septonexu v prostředí vody a v roztoku 0,15M NaCl. Jako blank byly použity roztoky Septonexu o příslušné koncentraci, ale bez přidavku hyaluronanu. Jako kontrola byl použit samotný hyaluronan. Konečná koncentrace hyaluronanu ve vzorcích po zředění do testovacího média byla  $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrace Septonexu ve vzorcích byla 3, 6 a  $8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . K vyhodnocení viability buněk byl použit MTS test.

Bylo zjištěno, že metabolická aktivita buněk klesá s rostoucí koncentrací Septonexu. Tato snížená buněčná viabilita způsobená přítomností Septonexu je částečně obnovena v přítomnosti komplexů Septonex-hyaluronan a to tím víc, čím vyšší koncentrace Septonexu byla použita (Obr. 35 a Obr. 36).



Obr. 35: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). Celých 24 h kultivace probíhalo v přítomnosti zvířecího séra.



Obr. 36: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). V prvních 4 h probíhala kultivace v nepřítomnosti zvířecího séra, následujících 20 h probíhala kultivace již za přítomnosti zvířecího séra.

Co se týče přítomnosti (Obr. 35) či nepřítomnosti FBS (Obr. 36) během prvních 4 hodin kultivace, celkový trend zvyšování buněčné viability za přítomnosti komplexů ve srovnání s tenzidem samotným je v obou případech velmi podobný. Rozdíl je v míře toxicity způsobené samotným Septonexem, v prvotní nepřítomnosti FBS buňky více podléhají toxicitě tenzidu. Pozitivní vliv přítomnosti komplexů Septonex-hyaluronan je tedy výraznější v prvotní nepřítomnosti FBS. Zároveň lze říci, že FBS má ochranný účinek na lidské osteoblasty, pokud jsou vystaveny stresovým podmínkám (přítomnost tenzidu).

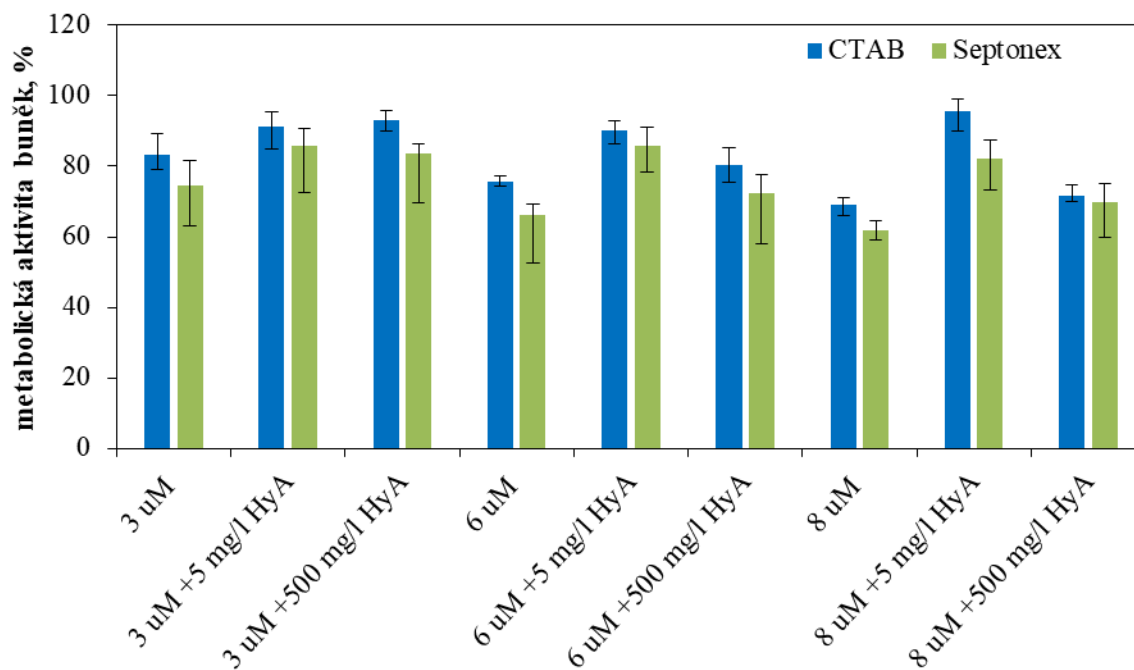
Poslední proměnnou bylo použití různých rozpouštědel pro přípravu komplexů – vody nebo 0,15M chloridu sodného. Z celkových 16 srovnání nebyl ve 12 případech prokázán žádný signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma rozpouštědly, ve dvou případech byla prokázána vyšší buněčná viabilita ve vodě ( $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonex + HyA v prvotní přítomnosti i nepřítomnosti FBS) a ve dvou případech byla detekována vyšší buněčná aktivita ve fyziologickém roztoku ( $6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Septonex v prvotní nepřítomnosti FBS). V souhrnu lze tedy říci, že vliv použitého rozpouštědla na buněčnou viabilitu není nijak zásadní. Tento výsledek je velmi pravděpodobně způsoben tím, že připravené komplexy jsou před přidáním k buňkám ředěny 1:9 do kultivačního média. Výše popsané výsledky jsou získány ze dvou nezávislých pokusů, přičemž každý byl proveden ve čtyřech biologických paralelách.

Lze tedy říci, že přítomnost hyaluronanu v komplexu s tenzidem zmírňuje cytotoxicitu vyvolanou tenzidem samotným a to tím víc, čím vyšší koncentrace tenzidu je použita. Ovšem toto platí pouze v případě, pokud není dosaženo kriticky vysoké koncentrace tenzidu, kdy přítomnost hyaluronanu již nedokáže zmírnit vyvolanou cytotoxicitu.

V další etapě byla studována cytotoxicita komplexů tenzid-hyaluronan v závislosti na koncentraci hyaluronanu v komplexech pro přesnější určení ochranného efektu hyaluronanu v komplexech. Konkrétně byly testovány koncentrace hyaluronanu v buněčném médiu 5 a  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Finální koncentrace tenzidu ve vzorcích byla opět 3, 6 a  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Získané výsledky (Obr. 37) naznačují, že ochranný účinek hyaluronanu v komplexech s tenzidy je limitován. Neplatí tedy, že čím vyšší koncentrace hyaluronanu v komplexu, tím vyšší bude jeho protektivní účinek. Ochranný efekt hyaluronanu byl zjištěn pouze při jeho nižší koncentraci  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco vyšší koncentrace hyaluronanu způsobila buď značně nižší míru ochrany, nebo neměla téměř žádný protektivní účinek v porovnání s cytotoxicitou samotných tenzidů. Současně bylo zjištěno, že toto snížení protektivního účinku je přímo spojené s přítomností tenzidu, resp. projevilo se pouze v případě komplexu hyaluronanu s tenzidy. Samotný hyaluronan, v obou studovaných koncentracích, vykazoval srovnatelný nebo dokonce pozitivní efekt na buněčnou viabilitu studovaných buněk.

Všechny získané výsledky byly publikovány ve spolupráci s kolegy z Univerzity Karlovy v rámci projektu COST (Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D., Ústav dědičných metabolických poruch), viz Příloha 4 a Příloha 5, přičemž rozsáhlejší diskuze výsledků je uvedena v publikacích [151; 152].



Obr. 37: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA) ve dvou různých koncentracích. V prvních 4 h probíhala kultivace v nepřítomnosti zvířecího séra, následujících 20 h probíhala kultivace již za přítomnosti zvířecího séra.

## 6.2 Komplexy micelárních agregátů s hyaluronanem

Další etapa práce byla zaměřena na studium komplexů micelárních agregátů a hyaluronanu vznikající metodou postupného přidávání hyaluronanu k micelárnímu roztoku tenzidu, kdy je předpokládán vznik tzv. ovrstvených či obalených micel<sup>1</sup>.

Interakce hyaluronanu s micelárními agregáty byly studovány pomocí metody turbidimetrické titrace. Při titračních experimentech byla prozkoumána široká škála poměrů T/D, tedy počtu molekul tenzidu ku počtu nábojů na řetězci hyaluronanu, a to od několika jednotek až po několik tisíc.

V návaznosti na turbidimetrické titrace byly komplexy studovány pomocí metody dynamického rozptylu světla. Interakce složek a vznik komplexů byly studovány v oblasti nejmenší koloidní stability systému, tedy v okolí nulového zeta potenciálu, jinak řečeno v oblasti vysycení nábojů v systému. Během titračních experimentů byly tedy sledovány hodnoty zeta potenciálu a velikosti částic v systému.

Následně bylo vybráno několik systémů lišících se poměrem T/D, u nichž byly micelární agregáty zkoumány pomocí metody fluorescenční spektroskopie, konkrétně pak studiem solubilizace hydrofobní sondy v systému. Zároveň byla u těchto systémů sledována velikost částic a zeta potenciál pomocí metody dynamického respektive elektroforetického rozptylu světla.

U všech studovaných systémů byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na vznik komplexů a jejich vlastnosti.

V neposlední řadě byly také provedeny pilotní testy cytotoxicity systémů obsahujících komplexy micelárních agregátů a hyaluronanu.

### 6.2.1 Mapování interakcí hyaluronanu a micelárních agregátů tenzidů pomocí turbidimetrických titrací

Vznik komplexů micelárních agregátů s hyaluronanem byl nejprve studován pomocí metody turbidimetrické titrace, jelikož lze tuto metodu využít pro objektivní posouzení vzniku zákalu při postupném přidávání roztoku hyaluronanu do definovaného množství roztoku opačně nabitého tenzidu (CTAB nebo Septonex). Bylo provedeno rozsáhlé mapování široké škály koncentrací hyaluronanu i tenzidů, přičemž poměr T/D se pohyboval v rozmezí od několika jednotek až po několik tisíc (viz Tab. P1 v Příloze 2). Přehled provedených turbidimetrických titrací je uveden v Tab. 5. Vznik agregátů v systému má za následek rozptyl světla procházející vzorkem, což se ve výsledku projevuje zvýšením absorbance. Získané absorbance byly vyneseny do grafů v závislosti na poměru T/D. Schematický souhrn veškerých provedených titrací včetně vizuálního pozorování je uveden v Příloze 2.

Tab. 5: Přehled provedených turbidimetrických titrací

<sup>1</sup> Snaha o vyjádření anglického výrazu „decorated micelles“



HyA		počáteční koncentrace CTAB/Septonex ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )				
$c$ ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$M_w$ (kDa)	3	5	7	10	20
0,05	100	✓	✓	✓	✓	✓
	1 500	✓	✓	✓	✓	✓
0,1	100	✓	✓	✓	✓	✓
	1 500	✓	✓	✓	✓	✓
0,3	15	✓	✓	✗	✗	✗
	100	✓	✓	✗	✓	✓
	1 500	✓	✓	✗	✓	✓
0,5	15	✓	✓	✗	✗	✗
	100	✓	✓	✗	✓	✓
	1 500	✓	✓	✗	✓	✓
1,0	15	✓	✓	✗	✗	✗
	100	✓	✓	✓	✓	✓
	1 500	✓	✓	✓	✓	✓

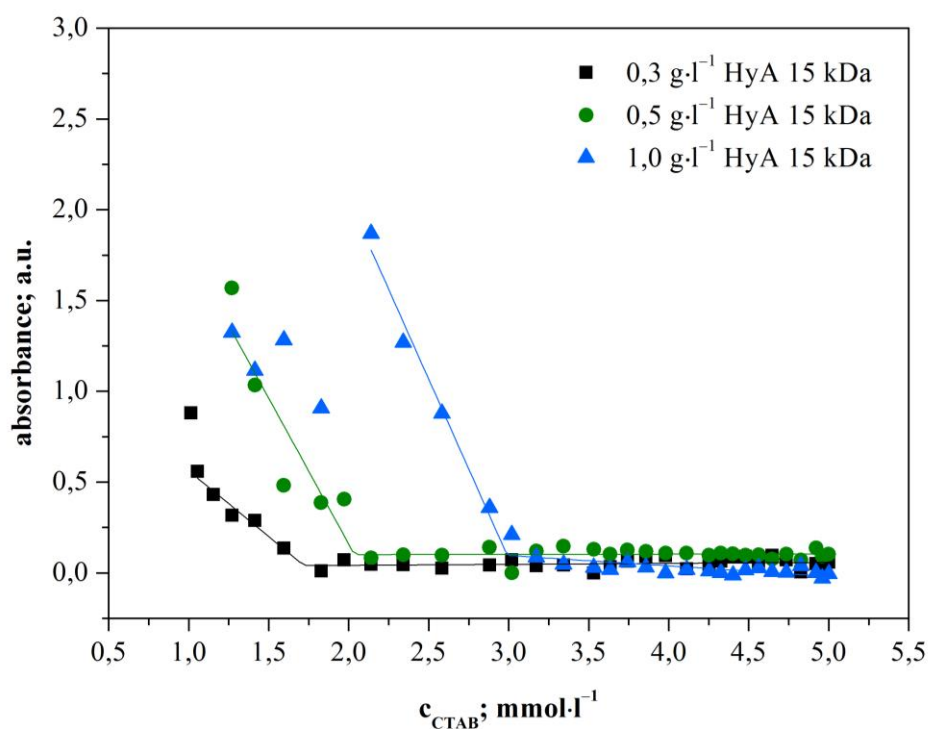
Nejprve byly provedeny titrace roztoku hyaluronanu o koncentraci 0,05 a 0,1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) do micelárních roztoků tenzidů (3, 5, 7, 10 a 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Ve většině experimentů nedošlo přidáním roztoku hyaluronanu k nařazení systému pod hodnotu kritické micelární koncentrace. Poměry T/D se pohybovaly v rozmezí 20 000 až 4,1. Ve všech případech kombinací koncentrací hyaluronanu a tenzidu nebyl pozorován nárůst absorbance nad hodnotu 0,1. Studované roztoky zůstávaly po celou dobu titrace čiré a to nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Lze tedy říci, že koncentrace hyaluronanu nebyla dostatečně vysoká ke vzniku větších agregátů a fázové separaci systému.

Na základě předchozích zkušeností byly tudíž pro další titrační experimenty vybrány vyšší koncentrace hyaluronanu (0,3, 0,5 a 1,0  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Také byl pro další experimenty přidán hyaluronan s velmi krátkým řetězcem a molekulovou hmotností 15 kDa. Naopak byla z dalších experimentů vynechána koncentrace tenzidu 7  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na Obr. 38 je znázorněn příklad titračních experimentů, konkrétně závislost absorbance na koncentraci CTAB (při výchozí koncentraci tenzidu 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), přičemž tenzid byl titrován hyaluronanem o různé koncentraci (0,3, 0,5 a 1,0  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a molekulové hmotnosti 15 kDa. Jednotlivé závislosti jsou v grafu proloženy přímkami pro lepší znázornění zlomového nárůstu absorbance při překročení hraničního poměru T/D. Obdobným způsobem byly vyhodnoceny všechny naměřené závislosti, které vykazovaly zlomový nárůst absorbance. Souřadnice na ose  $x$  odpovídající zlomu v závislosti byla následně přepočítána na poměr T/D. Hodnoty T/D odpovídající zlomům na turbidimetrických křivkách jsou uvedeny v Tab. P1 a Tab. P2 v Příloze 2. Z grafu je zřejmé, že počátek fázové separace, resp. nárůst absorbance je závislý na koncentraci obou komponent v systému. Dále je na obrázku vidět, že k zakalení systému a fázové separaci dochází nad kritickou micelární koncentrací CTAB, která je ve

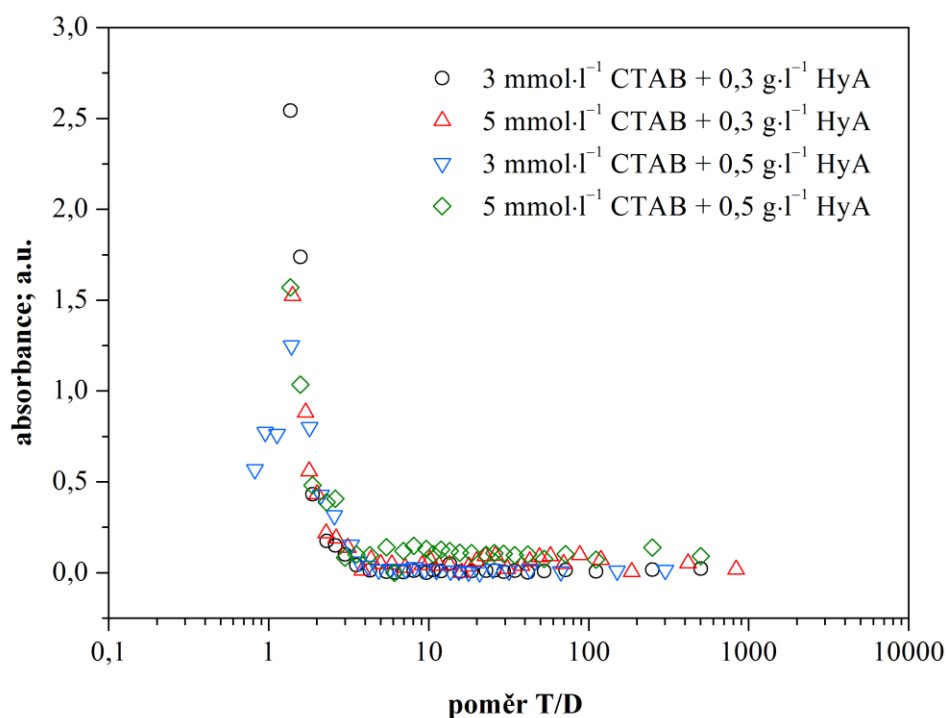
vodném prostředí přibližně  $0,94 \pm 0,01 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . V případě systému, do kterého byl titrován roztok hyaluronanu o koncentraci  $1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , lze pozorovat kolísání absorbance při překročení koncentrace tenzidu  $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Tyto výkyvy vždy vznikaly následkem dalšího přidávání roztoku hyaluronanu do již vysráženého systému, čímž docházelo pouze k ředění systému bez vzniku nových sraženin.

Některé zakalené a fázově separované (vysrážené) roztoky byly ponechány v klidu při laboratorní teplotě po dobu několika dnů. Bylo zjištěno, že připravené roztoky jsou stabilní v řádu jednoho týdne. V případě zakalených systémů, které jevíly zákal homogenní v celém objemu, separace samovolně nepokračovala až do stádia sraženiny.

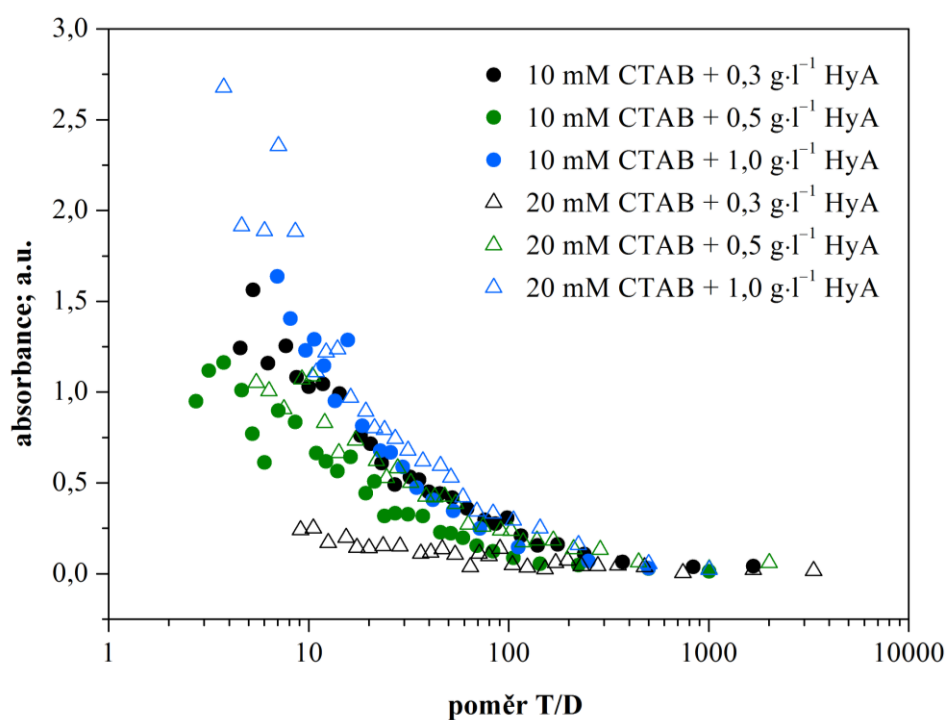


Obr. 38: Závislost absorbance na koncentraci CTAB odpovídající titraci hyaluronanu o různé koncentraci a molekulové hmotnosti 15 kDa do micelárního roztoku tenzidu

Naměřené hodnoty absorbancí byly také znázorněny v závislosti na poměru T/D. Příklad takového grafu je uveden na Obr. 39, kde jsou znázorněny titrační křivky odpovídající titracím hyaluronanu o koncentraci  $0,3$  a  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a molekulové hmotnosti 15 kDa do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $3$  a  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Na obrázku je jasně vidět, že vznik zákalu a fázová separace systému nastává při obdobném poměru T/D pro všechny znázorněné titrace a to přibližně při hodnotě  $3,1 \pm 0,3$ .



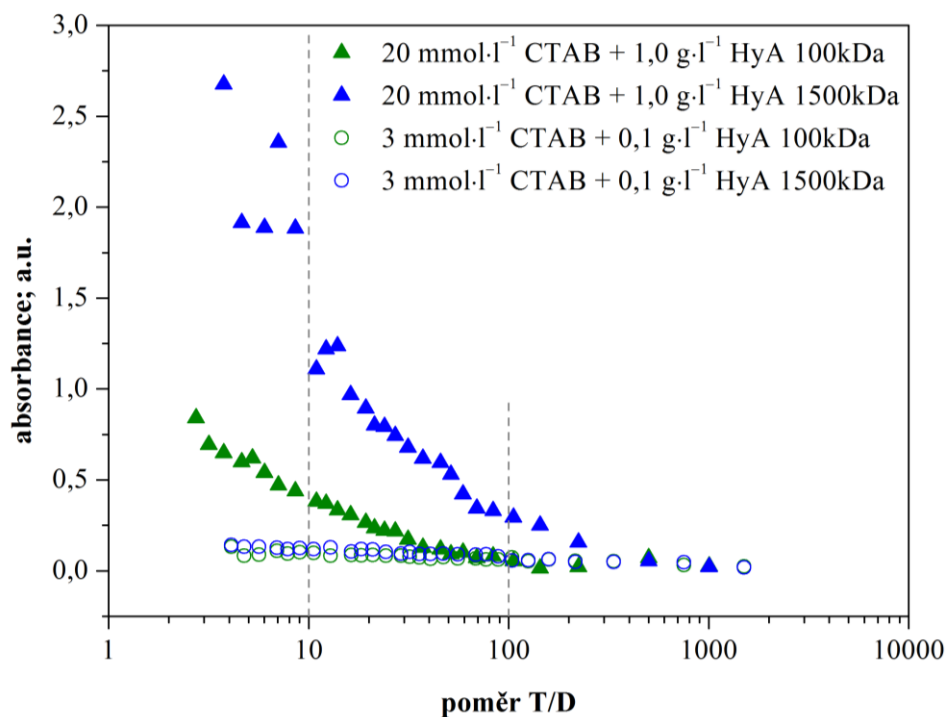
Obr. 39: Závislost absorbance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci 0,3 a 0,5 g·l<sup>-1</sup> (15 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci 3 a 5 mmol·l<sup>-1</sup>.



Obr. 40: Závislost absorbance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci 0,3, 0,5 a 1,0 g·l<sup>-1</sup> (1 500 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci 10 a 20 mmol·l<sup>-1</sup>.

V některých případech a to zejména při vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu (1 500 kDa) ovšem nedocházelo během titrace ke skokovému nárůstu absorpance, nýbrž docházelo k postupné změně již od prvních přídavek hyaluronanu do micelárního roztoku. V případech, kdy byl hyaluronan o vysoké koncentraci přidáván do roztoku tenzidu o vysoké koncentraci, byl tento nárůst turbidity a fázových změn v systému dokonce velmi prudký. Příklad takových titrací je uveden na Obr. 40.

Při porovnání všech provedených titrací bylo zjištěno, že poměr T/D není jediným řídicím parametrem fázové separace systému. U systémů se stejným poměrem nábojů, které však vznikaly kombinací různých koncentrací složek, byl pozorován rozdílný průběh agregace. Jako příklad je možno porovnat systém s hodnotou T/D=10 a T/D=100, které vznikaly buď titrací roztoku hyaluronanu o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  do roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  nebo titrací hyaluronanu o koncentraci  $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  do roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Uvedená situace je pro dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu graficky znázorněna na Obr. 41. V případě vyšších koncentrací složek dochází k zakalení systému a fázové separaci, zatímco při kombinaci nižších koncentrací složek zůstává systém po celou dobu titrace čirý. Významně se na agregaci projevuje také délka řetězce hyaluronanu. Rozdíly v agregacích pravděpodobně tkví ve výchozích koncentracích složek. Ze statistického hlediska je značný rozdíl v agregaci složek při přidávání hyaluronanu o vysoké koncentraci, který se v roztoku vyskytuje ve formě hydrodynamických klubek, do roztoku tenzidu, který obsahuje poměrně velké množství micelárních agregátů oproti přidávání volnějších řetězců hyaluronanu k roztoku tenzidu obsahujícího relativně málo micel (těsně nad CMC). Ve spojitosti s tím tedy nelze zanedbat vliv struktury vznikajících agregátů.

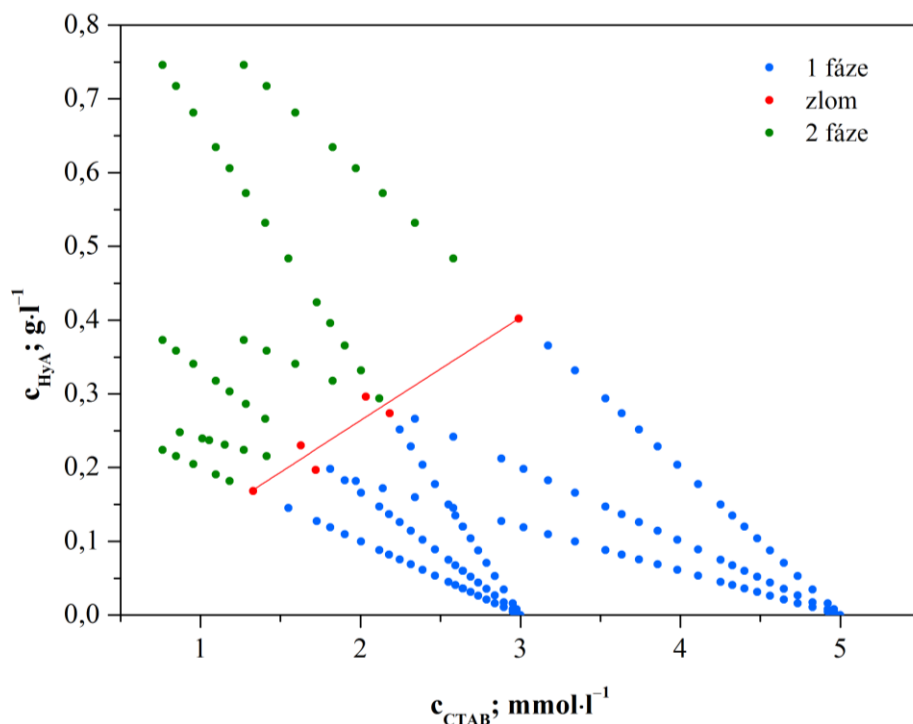


Obr. 41: Závislost absorpance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci  $0,1$  a  $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $3$  a  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

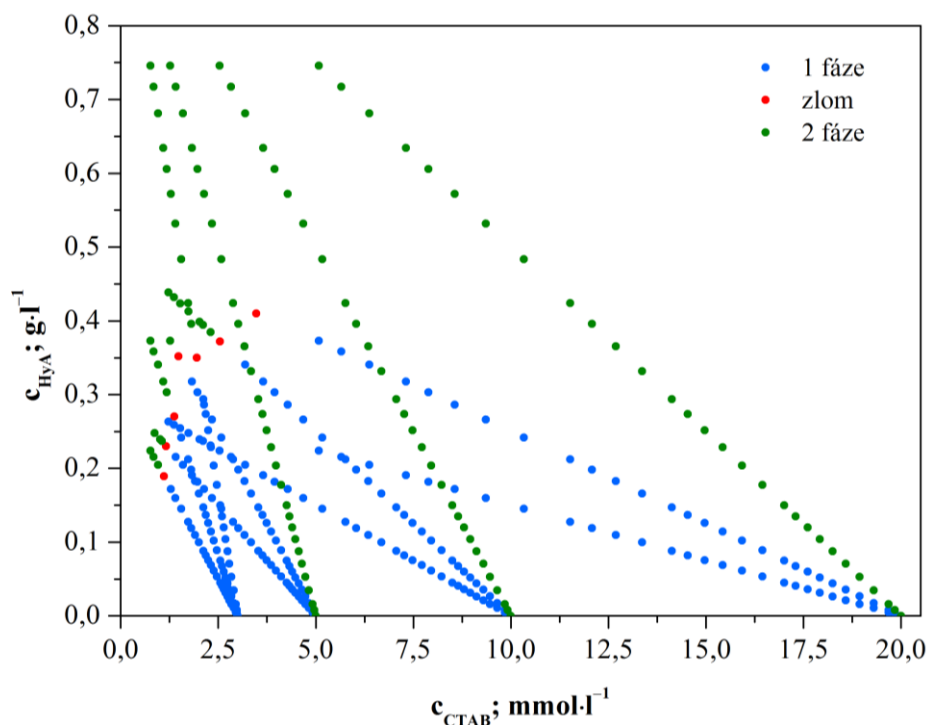
Všechny turbidimetrické titrace byly vyhodnoceny výše zmiňovaným způsobem. Každé kombinaci koncentrací složek byl přiřazen status dle složení systému, tzn. jednofázový nebo dvoufázový systém, popřípadě pak „zlom“, pokud bylo možné ho v grafu závislosti absorbance na koncentraci tenzidu identifikovat. V případech, kdy nebylo možné vyhodnotit jasný zlom, byla stanovena hranice jednofázového a dvoufázového systému na hodnotu absorbance 0,150, při které již bylo možné pozorovat lehkou opalescenci systému i vizuálně. Ze všech získaných dat byl následně sestaven výsek fázového diagramu a to vždy pro jednu molekulovou hmotnost hyaluronanu. Příklady takových fázových diagramů jsou znázorněny na Obr. 42 a Obr. 43 pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 15 kDa, respektive 100 kDa.

Z fázového diagramu pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 15 kDa (Obr. 42) je vidět jasný přechod mezi jedno- a dvoufázovým systémem. Ve všech případech titrací docházelo k náhlému nárůstu absorbance při určitém poměru složek v systému a bylo tedy možné vyhodnotit odpovídající poměry T/D.

S rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu však docházelo k postupnému vzniku zákalu, popř. fázové separaci. Při vyšších koncentracích dokonce docházelo hned po prvních přidávcích hyaluronanu k okamžité fázové separaci systému. Tento případ je pak na Obr. 43 znázorněn celou řadou zelených bodů, kdy je systém již od počátku titrace brán jako dvoufázový, neboť v těchto systémech již nebylo možné vyhodnotit zlomy na titračních křivkách. V případě molekulové hmotnosti 1 500 kDa nebylo možné zlomy vyhodnotit v žádném z měřených systémů, vždy docházelo téměř k okamžité fázové separaci.



Obr. 42: Výsek schematického fázového diagramu získaný z turbidimetrických měření systému CTAB-hyaluronan (15 kDa)



Obr. 43: Výšek schematického fázového diagramu získaný z turbidimetrických měření systému CTAB-hyaluronan (100 kDa)

Porovnáním získaných výsledků pro tenzid CTAB a Septonex lze říci, že oba tenzidy se při agregaci s hyaluronanem chovají velice podobně. Na základě získaných turbidimetrických výsledků nelze jednoznačně říci, zda některý z tenzidů agreguje s hyaluronanem snadněji, popřípadě hůře. V některých případech docházelo k pozvolnější agregaci Septonexu s hyaluronanem, v jiných tomu bylo naopak (viz Tab. P2 a P3 v Příloze 2).

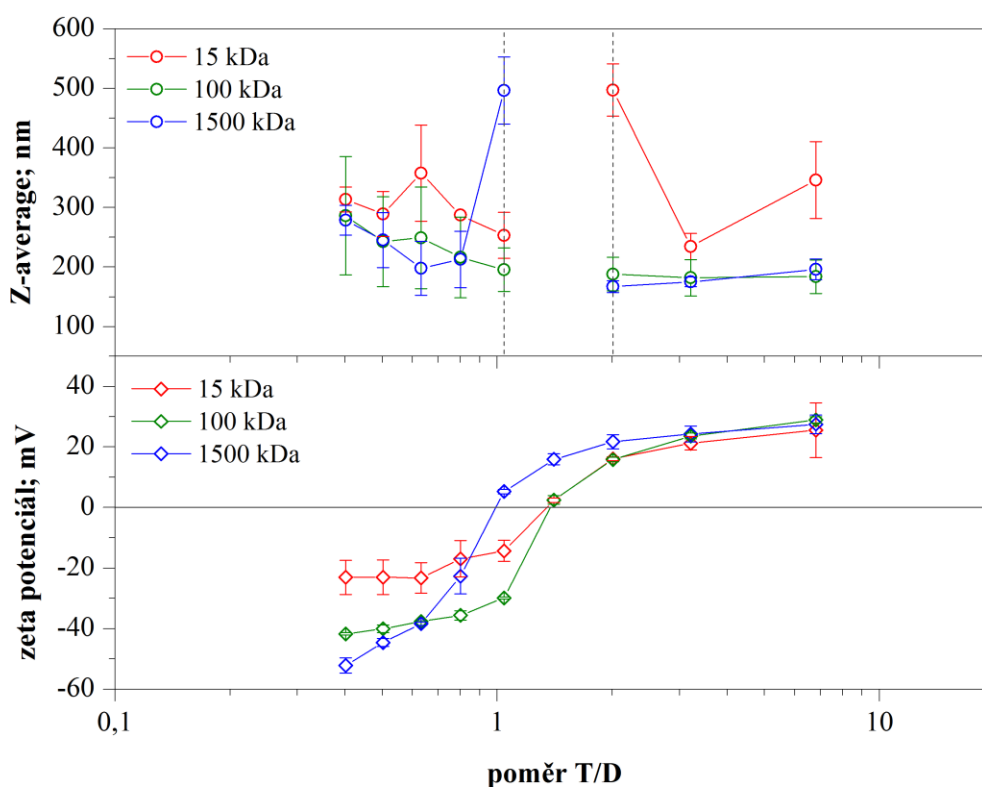
## 6.2.2 Studium komplexů micelárních agregátů tenzidů s hyaluronanem pomocí DLS titrací

Fázová separace v systémech hyaluronan-tenzid a tvorba komplexů micelárních agregátů s hyaluronanem byla opět studována pomocí metody dynamického a elektroforetické rozptylu světla. Studium bylo provedeno pomocí titračních experimentů, kdy byl roztok hyaluronanu titrován do definovaného množství micelárního roztoku tenzidu (CTAB nebo Septonex). V návaznosti na turbidimetrické titrace byl studován vliv výchozích koncentrací složek, neboť bylo zjištěno, že u systémů se stejným poměrem nábojů, které však vznikaly kombinací různých koncentrací složek, dochází k rozdílnému průběhu agregace. Pro studium byly tedy vybrány dvě koncentrace hyaluronanu 2 a 5 g·l<sup>-1</sup> a dvě odpovídající koncentrace tenzidu 2 a 5 mmol·l<sup>-1</sup>. V neposlední řadě byl zkoumán také vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu (15, 100 a 1 500 kDa). Zeta potenciál a velikost částic v systému byla studována při poměru T/D v rozmezí 6,8 až 0,4. V tomto rozsahu poměru nábojů docházelo k fázové separaci, jelikož bylo dosaženo vnějšího nulového zeta potenciálu agregátů v systému.

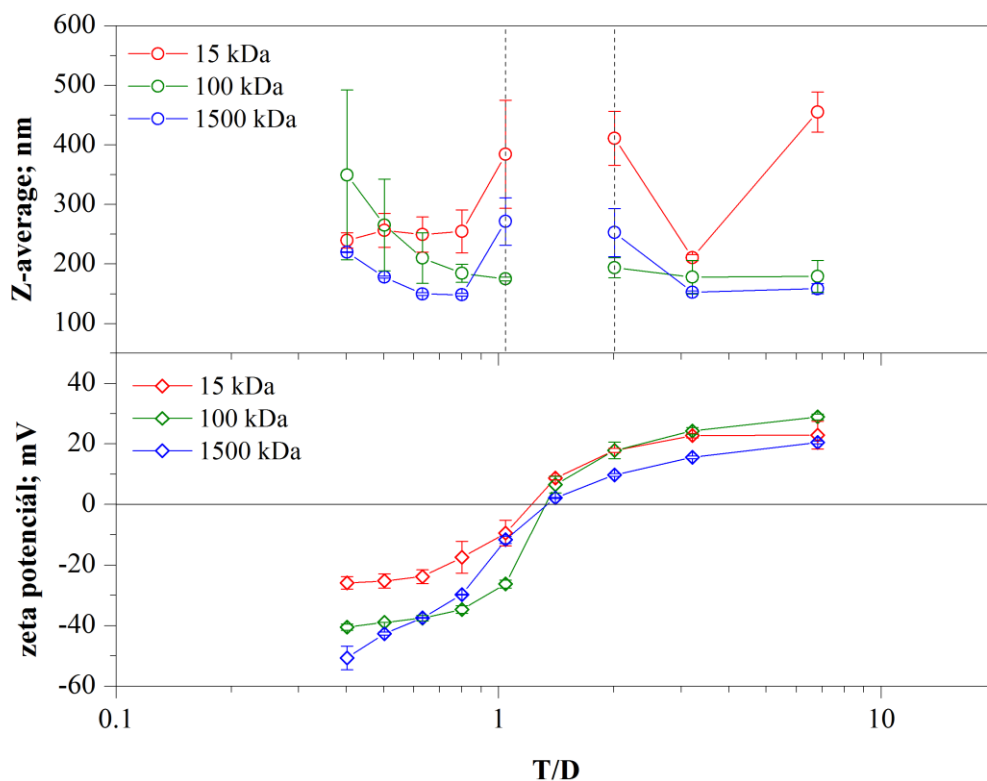
Na Obr. 44 a Obr. 45 jsou znázorněny průběhy titračních experimentů, resp. závislosti průměrné velikosti částic a zeta potenciálu systému na poměru T/D pro titraci hyaluronanu do

micelárního roztoku CTAB, resp. Septonexu. Bylo zjištěno, že vybrané výchozí koncentrace složek nemají při těchto experimentech žádný významný vliv na průběh agregace a tvorbu komplexů. V grafu jsou tedy znázorněny výsledné závislosti bez ohledu na koncentraci výchozích složek, jelikož v obou případech se jednalo o stejné poměry T/D.

Z grafů je zřejmé, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá u námi studovaných systémů významný vliv na průběh agregace. U všech molekulových hmotností docházelo v okolí nulového zeta potenciálu ke značné fázové separaci ve formě sraženin. Velikosti takových částic se pohybovaly až za hranicí měřitelnosti přístroje (tedy nad  $5,5 \mu\text{m}$ ), čímž byly získány irelevantní hodnoty velikostí částic. Proto byly tyto hodnoty v grafech vynechány (odpovídající oblast je vyznačena přerušovanými čarami).



Obr. 44: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan (15, 100 a 1 500 kDa) – micelární roztok CTAB.



Obr. 45: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan (15, 100 a 1 500 kDa) – micelární roztok Septonexu.

Jak již bylo zmíněno, vznik komplexů hyaluronanu a micelárních agregátů byl studován titrací hyaluronanu do roztoku tenzidu. V grafu tedy postupuje průběh titrace zprava doleva. Na počátku titrace, po prvním přidavku hyaluronanu (při  $T/D=6,8$ ) jsou hodnoty zeta potenciálů přibližně rovny +25 mV, což značí relativně stabilní koloidní systém. S postupem titrace a přibývání hyaluronanu v systému dochází ke snižování zeta potenciálu. V okolí nulového zeta potenciálu dochází ke zmíněné fázové separaci systému. S dalším nárůstem koncentrace hyaluronanu v systému, resp. se snižující se hodnotou T/D docházelo k postupnému ustálení systému. Na konci titrace byly systémy z hlediska hodnot zeta potenciálu koloidně stabilní, i když fázová separace systému nebyla reverzibilní. Velikost přítomných sraženin byla pouze zmenšena a to pravděpodobně v důsledku intenzivního míchání systému během titrace, rozpuštění sraženin však stejně jako v případě turbidimetrických titrací nenastalo.

V Tab. 6 jsou uvedeny hodnoty poměrů T/D odpovídající hodnotě nulového zeta potenciálu systému. Z tabulky je zřejmé, že oba tenzidy agregují s hyaluronanem obdobným způsobem a že k fázové separaci dochází při přibližně stejných poměrech nábojů v systému. V tabulce je dále vidět již zmíněný velice nepatrný vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na fázovou separaci studovaných systémů. Je však nutno podotknout, že systémy obsahující hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 500 kDa byly studovány pouze v nižších koncentracích hyaluronanu a tenzidů, jelikož při vyšších koncentracích docházelo k výraznějšímu srážení systému, které komplikovalo měření. Hodnoty IEP pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 1 500 kDa jsou tudíž průměrem polovičního počtu měření oproti ostatním molekulovým



hmotnostem hyaluronanu. Důsledkem je pak mírná odlehlost či vyšší hodnota odchylky těchto výsledků.

Tab. 6: Izelektrické body pro titraci hyaluronanu (15, 100 nebo 1 500 kDa) do micelárního roztoku tenzidu

$M_w$ HyA	IEP (vyjádřeno v T/D)	
	CTAB	SPTX
15 kDa	1,36±0,01	1,21±0,05
100 kDa	1,39±0,03	1,33±0,05
1 500 kDa	0,99±0,02	1,23±0,17

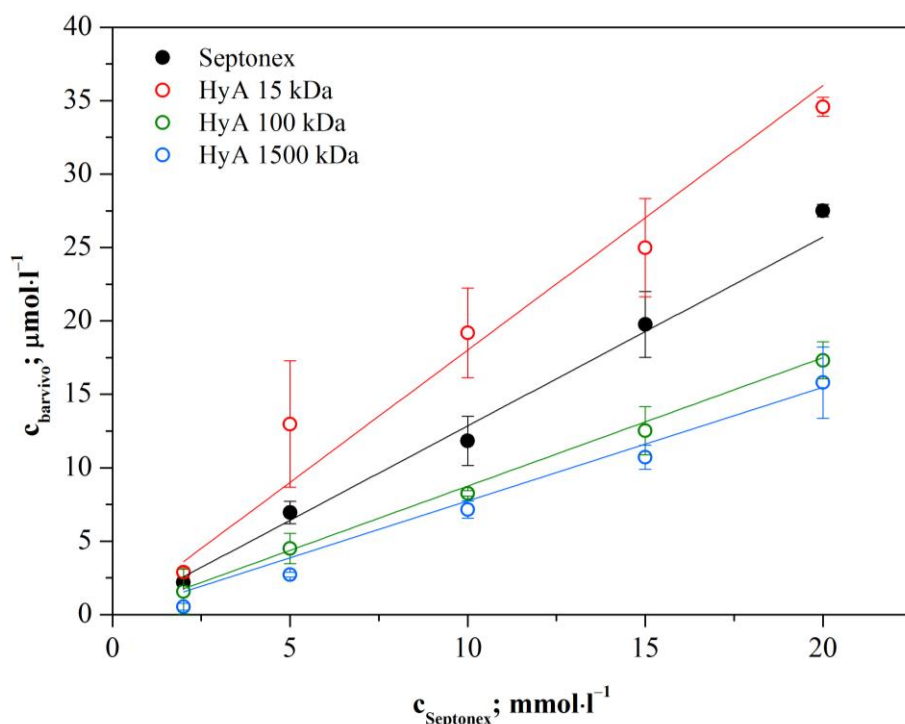
Na základě získaných výsledků uvedených v Tab. 6 je možno doplnit závěry vyplývající z turbidimetrických titrací. Pomocí DLS titrací bylo zjištěno, že k vyrovnání nábojů v systému dochází přibližně při  $T/D=1,3$ , ovšem většina provedených turbidimetrických titrací, byť dosažených pomocí jiných kombinací koncentrací složek, nedosáhla takto nízkých hodnot  $T/D$ , a přesto v systému docházelo ke vzniku zákalu či fázové separaci ve formě sraženin. Vezmeme-li v úvahu případ, kdy docházelo k postupnému zakalení systému, ať už zlomovému v průběhu titrace nebo postupnému od počátku titrace, ovšem bez vzniku sraženin, je možné u těchto systémů předpokládat jistou koloidní stabilitu. V systému dochází k interakci řetězců hyaluronanu s micelárními agregáty, přičemž na komplexech zůstává dost náboje na to, aby se vzájemně odpuzovaly a nesrážely, tedy dost náboje pro udržení fázové stability systému. Lze tedy předpokládat, že v systému interagují celé micely s řetězci hyaluronanu a nedochází k rozpadu přítomných micel a obsazování záporných nábojů na hyaluronanu jednotlivými molekulami tenzidu.

### 6.2.3 Studium solubilizace hydrofobního barviva v systému Septonex-hyaluronan

Jako základ pro další experimenty byl studován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na schopnost Septonexu solubilizovat hydrofobní složku, ať už hydrofobní barvivo či fluorescenční sondu, pomocí metody UV-VIS spektroskopie. Pro studium byly použity molekulové hmotnosti hyaluronanu 15, 100 a 1 500 kDa, přičemž jeho koncentrace v systému byla konstantní, a to  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Byla studována míra solubilizace hydrofobního barviva Sudanu Red G v závislosti na zvyšující se koncentraci Septonexu (koncentrační rozmezí 2 až  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Koncentrace Septonexu byly zvoleny nad kritickou micelární koncentrací. Hodnoty poměru  $T/D$  v systému byly tedy v rozsahu 8 až 80, což značí velký přebytek tenzidu v systému.

Na Obr. 46 je znázorněna koncentrace solubilizovaného hydrofobního barviva v závislosti na koncentraci Septonexu v systému. Z grafu je dle očekávání jasně patrné, že se zvyšující se koncentrací tenzidu dochází k lineárnímu nárůstu míry solubilizovaného barviva v systému. Jak je z grafu dále zřejmé, molekulová hmotnost hyaluronanu významně ovlivňuje míru solubilizovaného barviva. Bylo zjištěno, že v případě krátkého řetězce hyaluronanu dochází k mírnému nárůstu koncentrace solubilizovaného barviva v porovnání se systémem bez

obsahu hyaluronanu. Naopak v případě vyšších molekulových hmotností hyaluronanu a tedy delších polymerních řetězců je patrný významný pokles míry solubilizace.



Obr. 46: Koncentrace solubilizovaného barviva Sudan Red G v závislosti na koncentraci tenzidu v systému.

Získané výsledky naznačují jistý vliv délky řetězce hyaluronanu na jeho interakce s micelárními agregáty a schopnost ovrstvení micel řetězcem. Dlouhý řetězec hyaluronanu pravděpodobně interaguje s náboji na micelárních agregátech, a díky vysokému počtu nábojů na řetězci a jeho značné ohebnosti dochází k obalení micel polymerním řetězcem, čímž může být bráněno solubilizaci hydrofobního barviva v micelárním prostoru. Dalším důvodem může být menší velikost ovrstevných micel, která snižuje míru solubilizovaného barviva v systému. Naopak v případě nízké molekulové hmotnosti hyaluronanu, jehož řetězce jsou krátké a mnohem méně ohebné, dochází k odlišnému uspořádání a interakci hyaluronanu s micelárními agregáty. Je pravděpodobné, že dochází k přeuspořádání micel, které za pomoci hyaluronanu zvětšují svoje hydrofobní jádro a tím jsou schopny mírně podpořit solubilizaci hydrofobního barviva. V souvislosti s tím byla také studována schopnost solubilizace samotného hyaluronanu. Bylo zjištěno, že čistý hyaluronan bez příměsi tenzidu není schopen solubilizovat hydrofobní barvivo. Bylo tedy ověřeno, že podpora solubilizace není způsobena přítomností hyaluronanu o nízké molekulové hmotnosti, ale spíše jeho interakcí s micelárními agregáty a tvorbou komplexů v systému.

Dále byl zkoumán vliv přípravy systému na míru solubilizace hydrofobního barviva. Konkrétně byl zkoumán vliv okamžiku přidavku hyaluronanu do systému. Hyaluronan byl přidáván do systému buď před barvivem, nebo až po něm. Výsledky uvedené na Obr. 46 odpovídají případu, kdy byl hyaluronan přidán před barvivem. Nejprve byl tedy připraven

ustálený systém hyaluronan-Septonex, do kterého bylo přidáno hydrofobní barvivo. Pro zajištění maximální míry solubilizace byl systém ponechán 48 hodin třepat.

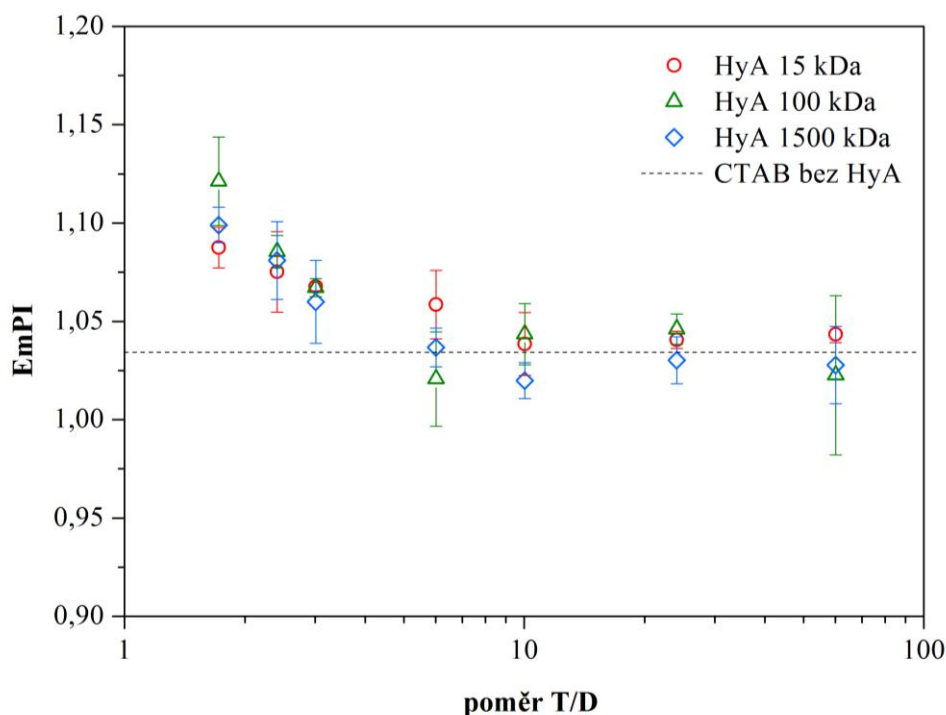
V případě, kdy byl hyaluronan do systému vpraven až po solubilizaci barviva v čistém tenzidu, bylo zjištěno, že u systému obsahujícího hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností nedocházelo k žádné významné změně. Naopak systém obsahující hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 500 kDa vykazoval menší negativní vliv na míru solubilizace. Tím bylo opět potvrzeno zmíněné ovrstvení micel řetězcem hyaluronanu bránící solubilizaci hydrofobní složky v systému. Získané výsledky posloužily jako základ pro další solubilizační experimenty.

#### **6.2.4 Studium micelárních agregátů během turbidimetrických titrací pomocí metody fluorescenční spektroskopie a dynamického rozptylu světla**

Pro potvrzení přítomnosti micelárních agregátů během turbidimetrických titrací bylo vybráno sedm systémů lišících se poměrem T/D, přičemž výběr byl proveden z turbidimetrických řad, u nichž docházelo při titraci ke zlomové závislosti absorbance na poměru T/D. Tyto systémy byly studovány pomocí metody fluorescenční spektroskopie, neboli studiem solubilizace hydrofobní sondy (pyrenu) do micelárních agregátů v systému. Dále byly systémy studovány z hlediska velikosti částic a zeta potenciálu pomocí metody dynamického, resp. elektroforetické rozptylu světla.

U vybraných systémů se poměr T/D pohyboval v rozsahu 60,2 až 1,7, přičemž se vycházelo z titrace hyaluronanu o koncentraci  $0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a různé molekulové hmotnosti (15, 100 a 1 500 kDa) do micelárního roztoku tenzidu o koncentraci  $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jednotlivé vzorky byly tedy připraveny titrací hyaluronanu do micelárního roztoku tenzidu, který již obsahoval solubilizovanou fluorescenční sondu, s tím rozdílem, že každý vzorek micelárního roztoku, obsahující stejnou koncentraci pyrenu, byl titrován hyaluronanem zvlášť až do dosažení požadovaného poměru T/D.

Výsledky fluorescenčního měření pro tenzid CTAB jsou graficky znázorněny na Obr. 47, přičemž v případě Septonexu byly výsledky velmi podobné. EmPI hodnoty naznačují, že studovaný systém obsahuje micelární agregáty při všech poměrech T/D, tedy v celém průběhu titračního experimentu. Hodnoty jsou charakteristické pro pyren, který je solubilizován v ne zcela hydrofobním prostředí, které poskytují micelární agregáty. Pro porovnání byly zjištěny také hodnoty EmPI pro pyren ve vodě, respektive pro koncentraci tenzidu  $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , tedy pod kritickou micelární koncentrací, kdy ještě v systému nejsou formovány micelární útvary. Pro CTAB byla hodnota EmPI  $1,43\pm 0,05$  a pro Septonex  $1,39\pm 0,02$ . Je třeba brát v úvahu, že není možné pomocí pyrenové metody zjistit, jak tyto micelární agregáty vypadají. Na tuto otázku lze zčásti odpovědět pomocí metody dynamického rozptylu světla, který poskytuje informace o velikosti agregátů v systému. Ovšem i tato metoda skýtá jistá omezení a to zejména v případech rozsáhlých agregátů s objemným hydratačním obalem.



Obr. 47: Závislost EmPI na poměru nábojů v systému hyaluronan-CTAB

Mírný nárůst hodnot EmPI po překročení poměru T/D=6,0 je důsledkem reorganizace agregátů a s tím spojené reorganizace fluorescenční sondy v systému. Na druhou stranu lze u těchto systémů pozorovat fázovou separaci, která s klesajícím poměrem T/D nabývala na intenzitě v řadě mírný zákal – zákal – vysrážení – tvorba gelového lemu na stěnách lahvičky a to zejména v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Mírný nárůst hodnot EmPI pak indikuje přesun pyrenu do více polárního prostředí. To může být způsobeno například rozpadem části agregátů a uvolněním sondy do rozpouštědla nebo rozvolněním struktury agregátů, které způsobí větší přístupnost polárního vodného prostředí do jádra micely.

Ze statistického hlediska se pak může jednat o vliv řetězců hyaluronanu na solubilizaci sondy v systému. Fluorescenční signál je sumou signálů pyrenových molekul v systému, tedy těch nacházejících se v micelách interagujících s řetězcem hyaluronanu, i těch, které jsou v samostatných micelách. Při vysokém poměru T/D a tedy nízkém obsahu hyaluronanu v systému dochází pravděpodobně k interakcím řetězců s malým počtem micel v systému. Naopak při nízkém poměru T/D, tedy na konci titračního experimentu, kdy se dostáváme k situaci, kdy by měla na jednu molekulu tenzidu připadat jedna karboxylová skupina řetězce hyaluronanu, je hyaluronanem ovlivněna většina micel, což se projeví na reorganizaci systému a tudíž zvýšení EmPI hodnot. Na základě těchto úvah se zdá, že micelární agregáty, které interagují s hyaluronanem, mají volnější strukturu a jsou přístupnější polárnímu prostředí rozpouštědla.

Dále je potřeba poznamenat, že s klesajícím poměrem T/D dochází ke snížení molární koncentrace pyrenu v systému, konkrétně z  $3,3 \cdot 10^{-6}$  na  $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což může mít nepatrný vliv na lokalizaci pyrenu v systému a hodnoty EmPI. Tento problém vyplývá ze způsobu přípravy vzorků, jelikož byly připravovány titračně, aby bylo dosaženo co největší

podobnosti s turbidimetrickými experimenty. Problém snížení koncentrace fluorescenční sondy v systému byl řešen vyhodnocením intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci sondy v systému. Bylo zjištěno, že při snížení koncentrace sondy docházelo přímo úměrně ke snížení intenzity fluorescence. Žádné výraznější snížení intenzity fluorescence odpovídající zvýšeným hodnotám EmPI nebylo pozorováno. Snížení koncentrace sondy v systému má tedy zanedbatelný vliv na jeho lokalizaci a fluorescenční signál.

Následně byly systémy studovány pomocí metody dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Byla studována velikost částic v systému a zeta potenciál systému. Tato měření poskytla nový náhled na studované systémy, který zčásti umožnil zpřesnit závěry získané na základě fluorescenčních experimentů.

Bylo zjištěno, že zeta potenciál všech studovaných systémů se pohybuje v kladných hodnotách, což značí, že se v systému vyskytuje vyšší podíl kladně nabitých molekul tenzidu než záporně nabitých skupin na řetězci hyaluronanu, což je patrné také z hodnot T/D. Hodnoty vnějšího zeta potenciálu systému se pohybovaly většinou v rozmezí 40 až 10 mV, přičemž během titrace hyaluronanu do systému docházelo k postupnému poklesu hodnot zeta potenciálu.

Pomocí měření velikosti částic v systému bylo zjištěno, že molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňuje tvorbu a velikost agregátů v systému a tudíž i měřitelnost vzorků metodou dynamického rozptylu světla. V případě systémů s obsahem CTAB byl vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu pozorován ve větší míře než tomu bylo u systémů obsahujících Septonex. Bylo zjištěno, že systémy obsahující hyaluronan o nejnižší studované molekulové hmotnosti 15 kDa byly při vyšších poměrech T/D, resp. nízkém obsahu hyaluronanu v systému, velice polydisperzní a nestabilní v kombinaci s oběma tenzidy. Snížení polydisperzity bylo zjištěno až při zvýšení obsahu hyaluronanu v systému a to nad hodnotu odpovídající poměru T/D=3 pro systémy s CTAB a T/D=6 pro systémy se Septonexem. Po překročení těchto hranic byly vzorky relativně monodisperzní a mnohem lépe měřitelné metodou dynamického rozptylu světla. V případě vyšších molekulových hmotností hyaluronanu a to zejména 1 500 kDa jsou v systému tvořeny stabilnější a lépe měřitelné agregáty, tedy agregáty s lépe definovaným tvarem již od prvního přídavku hyaluronanu do systému (T/D=60). Tento vliv molekulové hmotnosti lze vysvětlit sterickou interakcí micelárních agregátů tenzidů s řetězcem hyaluronanu. V případě velmi krátkého řetězce hyaluronanu s malým počtem nábojů a mnohem menší ohebností, který není schopen plně obalit přítomné micely v porovnání s vyššími molekulovými hmotnostmi, pravděpodobně dochází ke tvorbě jakýchsi „rozježených“ komplexů špatně definovatelného tvaru. Naopak v případě delších řetězců by mohlo docházet k částečnému ovrstvení micel hyaluronanem a tvorbě agregátů s mnohem lépe definovaným tvarem. Delší řetězce hyaluronanu interagují s micelárními agregáty jiným způsobem, kdy pravděpodobně vznikají větší, stabilnější a separovanější agregáty. Právě takové agregáty jsou všeobecně vhodnější pro měření dynamickým rozptylem světla v porovnání s příliš malými a nestabilními.

Přepočtem poměru nábojů na velikost modelové micely interagující s řetězcem hyaluronanu o různé délce byl získán další náhled na strukturu agregátů ve studovaných systémech. Například při T/D=3 připadají tři kladně nabitě molekuly tenzidu na jeden záporný náboj připadající disacharidové jednotce hyaluronanu. Při znalosti velikosti disacharidové jednotky ( $M_w=401,299 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) lze jednoduše zjistit, že jeden řetězec

hyaluronanu o molekulové hmotnosti 15 kDa se skládá z 37 disacharidových jednotek a obsahuje tedy za předpokladu 100% disociace 37 záporných nábojů.

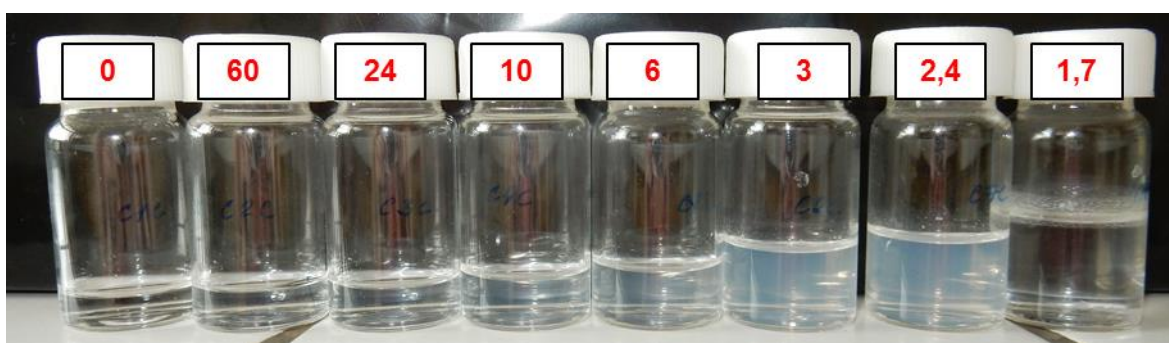
Micely kationtových tenzidů sestávají z 50 až 150 tenzidových molekul v závislosti na jejich struktuře, na koncentraci v systému či teplotě systému. Pro micelu tenzidu CTAB ve vodném prostředí se udávají hodnoty agregačního čísla v rozsahu 70–140 [153–155] v závislosti na koncentraci a metodě stanovení.

Pokud tedy uvažujeme modelovou micelu, která je složena ze 100 molekul tenzidu, zjistíme, že na jednu micelu připadá při  $T/D=3$  přibližně 33 záporných nábojů, tedy 1,1 řetězce hyaluronanu. Pro molekulovou hmotnost 100 kDa lze tento poměr vyjádřit jako 7,5 micel na jeden řetězec a pro molekulovou hmotnost 1 500 kDa 112 micel připadajících na jeden řetězec. Na základě těchto úvah nelze bohužel v systému předpokládat vznik separovaných ovrstvených micel, ale spíše nějakou dynamickou směs micel ovrstvených a volných.

Dále bylo zjištěno, že měřitelnost studovaných systémů metodou dynamického rozptylu světla odpovídala i vizuálnímu vzhledu vzorků. Na Obr. 48 a Obr. 49 jsou zobrazeny fotografie titračních řad, resp. vybraných vzorků studovaných pomocí metody fluorescenční spektroskopie a dynamického rozptylu světla systémů CTAB-hyaluronan o molekulové hmotnosti 15 a 1 500 kDa.



Obr. 48: Titrační řada systému hyaluronan (15 kDa) – CTAB. Červená čísla značí odpovídající poměr T/D.



Obr. 49: Titrační řada systému hyaluronan (1 500 kDa) – CTAB. Červená čísla značí odpovídající poměr T/D.

Na obrázcích je jasně vidět zmiňovaný vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakce s tenzidem. V případě molekulové hmotnosti 1 500 kDa je jasně patrný zákal

způsobený tvorbou větších agregátů a fázová separace systému. Systémy vykazující opalescenci či zákal různé intenzity se při měření překvapivě projeví jako monodisperzní, zatímco zcela čiré vzorky se jeví jako velice polydisperzní a velmi špatně měřitelné. Lze tedy říci, že vznik tzv. ovrstvených micelárních agregátů závisí z pohledu dynamického rozptylu světla a tedy velikosti částic na délce řetězce hyaluronanu a jeho obsahu v systému.

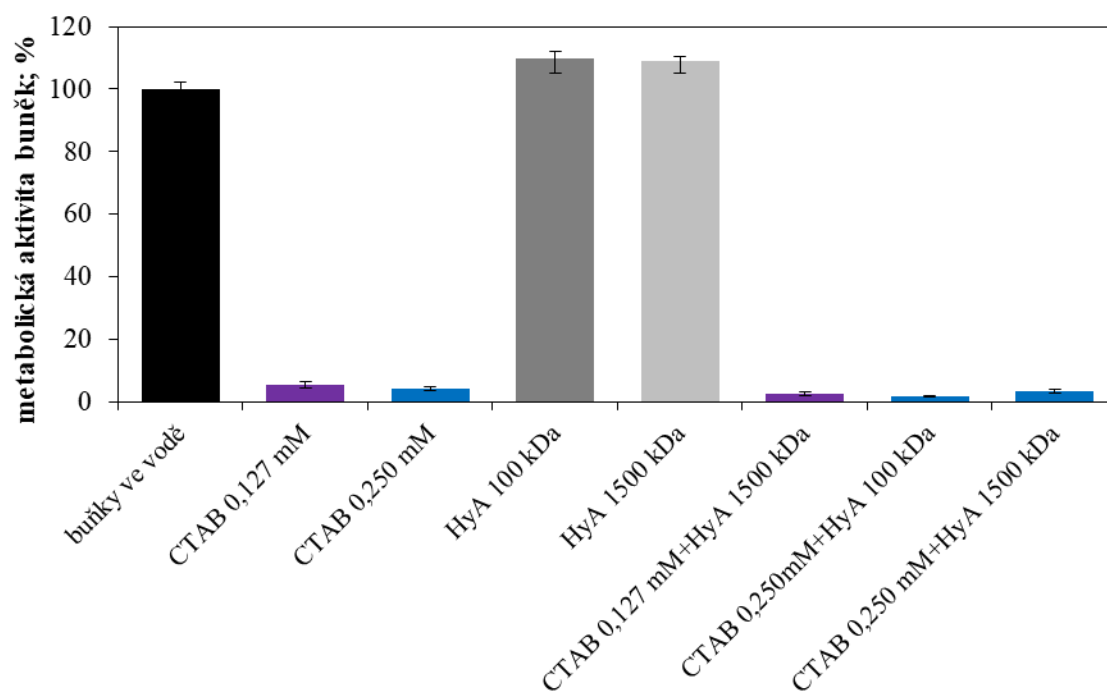
U systémů, které se jeví jako monodisperzní byla na druhou stranu zjištěna velikost částic v rozmezí 100 až 200 nm a to nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Tvorba agregátů byla tedy ovlivněna délkou řetězce hyaluronanu, jejich velikosti však už nikoli.

### 6.2.5 Testy na buňkách

V návaznosti na studium indukovaných komplexů tenzidu a hyaluronanu byly provedeny také pilotní testy cytotoxicity systémů obsahujících komplexy micelárních agregátů CTAB s hyaluronanem (100 a 1 500 kDa) v prostředí vody. Jako blank byly použity roztoky CTAB o příslušné koncentraci, ale bez přídavku hyaluronanu. Jako kontrola byl použit samotný hyaluronan. Konečná koncentrace hyaluronanu ve vzorcích po zředění do testovacího média byla  $7,46 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrace CTAB ve vzorcích byla  $0,127$  a  $0,250 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . K hodnocení viability buněk byl použit MTS test.

Bylo zjištěno, že všechny tři typy testovaných komplexů vykazovaly již po 2 h značnou cytotoxicitu, která byla pravděpodobně způsobena příliš vysokou koncentrací CTAB. Přítomnost hyaluronanu v tomto případě nijak nepomohla snížit cytotoxicitu vyvolanou vysokou koncentrací CTAB (Obr. 50).

Ze získaných výsledků je zřejmé, že studované komplexy pravděpodobně nemají předpokládanou tzv. ovrstvenou strukturu. Zdá se, že micelární agregáty tenzidu v těchto případech nejsou obaleny řetězcem hyaluronanu. S největší pravděpodobností lze negativní výsledky vysvětlit příliš vysokou koncentrací tenzidu v systému, resp. nevhodným poměrem T/D složek v systému či minoritně také nestabilní strukturou komplexů v kultivačním médiu.



Obr. 50: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 2 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací CTAB samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). Celá kultivace (2 h) probíhala v přítomnosti zvířecího séra. Koncentrace hyaluronanu byla ve všech případech  $7,46\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .



## 7 ZÁVĚR

Hlavním cílem předkládané dizertační práce byla příprava a charakterizace koloidních systémů typu koloidní roztok (sol) vznikajících na základě interakcí hyaluronanu s micelárními agregáty. Celou prací je provázána idea průmyslové partnera připravit biokompatibilní nosičový systém vhodný pro nanomedicínské aplikace, tedy systém obsahující micelární agregáty schopné solubilizovat hydrofobní aktivní látku biokompatibilizované pomocí hyaluronanu.

V návaznosti na předchozí studium komplexů hyaluronan-tenzid, probíhající na fakultě chemické i mimo ni, je část dizertační práce zaměřena na studium přípravy a vlastností komplexů hyaluronanu se Septonexem, českou specialitou, jejíž struktura je podobná tenzidu CTAB, a porovnání získaných výsledků s předchozím studiem. V souvislosti s tím byla studována stabilita těchto komplexů za různých podmínek, zahrnujících čas, iontovou sílu prostředí, teplotu či vliv zředění systému. Systémy byly nejprve připraveny již známým tzv. indukovaným způsobem, tedy postupným přidáváním kationtového tenzidu do roztoku hyaluronanu.

Ke studiu těchto systémů byla využita pyrenová fluorescenční metoda, pomocí které se podařilo charakterizovat proces agregace Septonexu s hyaluronanem o velmi nízké koncentraci. Průběh závislosti polaritních indexů na koncentraci Septonexu vykazuje typický tvar dvojité S-křivky, což naznačuje formaci indukovaných micel na řetězci hyaluronanu a micel volných. Proces tvorby indukovaných micel pod kritickou micelární koncentrací tenzidu byl potvrzen také pomocí metody dynamického rozptylu světla, resp. pomocí stanovení poměru nábojů při vnějším nulovém zeta potenciálu v systému.

Bylo zjištěno, že agregáty vytvořené v homogenních systémech představovaných hyaluronanovými řetězci s indukovanými micelami jsou ovlivňovány celou řadou aspektů, jako je iontová síla roztoku, teplota či doba skladování finálních systémů. Bylo zjištěno, že během skladování systémů po dobu tří měsíců byly agregáty stabilní, ale velmi citlivé na různé rušivé podněty. Nejmenší vliv na stabilitu systémů byl pozorován u teplotních experimentů, kdy topné a chladicí cykly způsobovaly reverzibilní změny struktury agregátů. Naopak při zředění systému nebo zvýšení iontové síly byly pozorovány významné změny, destabilizace agregátů a uvolňování solubilizované hydrofobní látky z agregátů. Jejich potenciální aplikace jako nosičové systémy pro dodávání hydrofobních aktivních látek je tedy sporná. Studované systémy však vykazují slibný potenciál například pro povrchové (kožní) aplikace.

U systémů připravených indukovaným způsobem byla otestována také jejich cytotoxicita a to zhodnocením viability buněk pomocí MTS testu. Bylo zjištěno, přítomnost hyaluronanu v komplexu s tenzidem zmírňuje cytotoxicitu vyvolanou tenzidem samotným a to tím víc, čím vyšší koncentrace tenzidu je použita. Ovšem platí to pouze v případě, pokud není dosaženo kriticky vysoké koncentrace tenzidu, kdy přítomnost hyaluronanu již nedokáže zmírnit vyvolanou cytotoxicitu. Současně bylo zjištěno, že ochranný účinek hyaluronanu v komplexech s tenzidy je limitován. Neplatí tedy, že čím vyšší koncentrace hyaluronanu v komplexu, tím vyšší bude jeho protektivní účinek.

Druhá část práce je zaměřena na možnosti přípravy komplexů hyaluronanu s micelárními agregáty inovativním neindukovaným způsobem, tj. interakcí hyaluronanu s již hotovým

micelárními agregáty za předpokladu vzniku tzv. ovrstvených micel. Příprava komplexů neindukovaným způsobem byla provedena metodou postupného přidávání hyaluronanu k micelárnímu roztoku vybraných tenzidů (CTAB nebo Septonexu). Proces tvorby komplexů a jejich vlastnosti (stabilita, solubilizační schopnosti, velikost částic) byly studovány zejména pomocí metody fluorescenční spektroskopie, dále také pomocí metody dynamického rozptylu světla či turbidimetrie.

Interakce hyaluronanu s micelárními agregáty byly studovány pomocí metody turbidimetrické titrace. Při titračních experimentech byla prozkoumána široká škála poměrů T/D. Při porovnání všech provedených titrací bylo zjištěno, že poměr T/D není jediným řídicím parametrem fázové separace systému. U systémů se stejným poměrem nábojů, které však vznikaly kombinací různých koncentrací složek, byl pozorován rozdílný průběh agregace. Ze všech získaných dat byly sestrojeny výseky fázových diagramů, které poskytují jednoduchý přehled o fázovém chování systému tenzid-hyaluronan při neindukovaném způsobu přípravy těchto systémů.

U vybraných systémů byla opět studována jejich cytotoxicita. Bylo zjištěno, že všechny studované typy testovaných komplexů vykazovaly již po 2 hodinách značnou cytotoxicitu, která byla pravděpodobně způsobena příliš vysokou koncentrací tenzidu v systému, přičemž přítomnost hyaluronanu nijak nepomohla snížit cytotoxicitu studovaného systému.

Na základě studia solubilizace hydrofobní sondy u vybraných systémů pomocí metody UV-VIS a fluorescenční spektroskopie, doplněné o studium velikosti částic v systému a ostatních získaných výsledků lze říci, že neindukovaný způsob přípravy systému hyaluronan-tenzid neměl požadovaný efekt s výslednou tvorbou tzv. ovrstvených micel. Námi připravené systémy nebyly zcela stabilní v požadovaném poměru složek. Při ideálním poměru micel a řetězců hyaluronanu docházelo k fázové separaci systému. Lze předpokládat, že tenzidové micelární agregáty nejsou dostatečně stabilní pro tvorbu takových komplexů. Je ovšem třeba poznamenat, že předkládaná práce ve svém rozsahu nevyčerpala celý potenciál této oblasti výzkumu.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HRUBÝ, Martin, Jan KUČKA, Ján KOZEMPEL a Ondřej LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2006, **100**(1), 10-16. ISSN 0009-2770.
- [2] KNĚŽKOVÁ, Barbora. *Moderní protinádorová léčiva*. Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecký fakulta. Vedoucí práce Jaroslav Turánek.
- [3] TRUNKÁTOVÁ, Andrea. *Polymerní nosiče léčiv*. Zlín, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Stanislav Kafka.
- [4] GAUCHER, Geneviève, Marie-Hélène DUFRESNE, Vinayak SANT, Ning KANG, Dusica MAYSINGER a Jean-Christophe LEROUX. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005, **109**(1-3), 169-188. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.09.034. ISSN 0168-3659.
- [5] CHO, K., X. WANG, S. NIE, Z. CHEN a D. SHIN. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008, **14**(5), 1310-1316. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1441>. ISSN 1557-3265.
- [6] SINHA, Rajni, Gloria KIM, Shuming NIE a Dong SHIN. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006, **5**(8), 1909-1917. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0141>. ISSN 1538-8514.
- [7] ORIVE, G., O.A. ALI, E. ANITUA, J.L. PEDRAZ a D.F. EMERICH. Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2010, **1806**(1), 96-107. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.04.001. ISSN 0304-419X.
- [8] TORCHILIN, Vladimir, Robert PETERSEN, Sung KIM, Robert PETERSEN, Jan FEIJEN, Eva ROBLEGG a reas ZIMMER. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001, **73**(2-3), 533-550. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00299-1. ISSN 0168-3659.
- [9] NIZRI, Gilat a Shlomo MAGDASSI. Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer-surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, **291**(1), 169-174. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.04.109. ISSN 0021-9797.
- [10] CHAVANPATIL, Mahesh, Ayman KHDAIR, Yogesh PATIL, Hitesh HANDA, Guangzhao MAO a Jayanth PANYAM. Polymer-surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, **96**(12), 3379-3389. DOI: 10.1002/jps.20961. ISSN 0022-3549.
- [11] HALASOVÁ, Tereza. *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul*. Brno, 2013. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

- [12] DROBNÍK, Jaroslav. Hyaluronan in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, **7**(2), 295-308. DOI: 10.1016/0169-409X(91)90008-Z. ISSN 0169-409x.
- [13] LARSEN, Nancy a Endre BALAZS. Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, **7**(2), 279-293. DOI: 10.1016/0169-409X(91)90007-Y. ISSN 0169-409x.
- [14] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2012. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [15] CHYTIL, Martin, Sabina STRAND, Bjørn CHRISTENSEN a Miloslav PEKAŘ. Calorimetric and light scattering study of interactions and macromolecular properties of native and hydrophobically modified hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2010, **81**(4), 855-863. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.03.059. ISSN 0144-8617.
- [16] CHOI, Ki, Hyunjin CHUNG, Kyung MIN, Hong YOON, Kwangmeyung KIM, Jae PARK, Ick KWON a Seo JEONG. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*. 2010, **31**(1), 106-114. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.030. ISSN 0142-9612.
- [17] HALEY, Barbara a Eugene FRENKEL. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008, **26**(1), 57-64. DOI: 10.1016/j.urolonc.2007.03.015. ISSN 1078-1439.
- [18] HUBER, P. a P. PFISTERER. In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Therapy*. 2000, **7**(17), 1516–1525. ISSN 0969-7128.
- [19] MUKHERJEE, D., J. WONG, B. GRIFFIN, S. ELLIS, T. PORTER, S. SEN a J. THOMAS. Ten-fold Augmentation of Endothelial Uptake of Vascular Endothelial Growth Factor With Ultrasound After Systemic Administration. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000, **35**(6), 1678–1686. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00575-1. ISSN 0735-1097.
- [20] GUZMÁN, H., D. NGUYEN, A. MCNAMARA a M. PRAUSNITZ. Equilibrium Loading of Cells with Macromolecules by Ultrasound: Effects of Molecular Size and Acoustic Energy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, **91**(7), 1693–1701. DOI: 10.1002/jps.10156. ISSN 0022-3549.
- [21] TINKOV, Steliyan, Raffi BEKEREDJIAN, Gerhard WINTER a Conrad COESTER. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, **98**(6), 1935-1961. DOI: 10.1002/jps.21571. ISSN 0022-3549.
- [22] UNGER, Evan, Terry MATSUNAGA, Thomas MCCREERY, Patricia SCHUMANN, Robert SWEITZER a Rachel QUIGLEY. Therapeutic applications of microbubbles. *European Journal of Radiology*. 2002, **42**(2), 160-168. DOI: 10.1016/S0720-048X(01)00455-7. ISSN 0720-048X.
- [23] DEELMAN, Leo, Anne-Emilie DECLÈVES, Joshua RYCHAK a Kumar SHARMA. Targeted renal therapies through microbubbles and ultrasound ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, **62**(14), 1369-1377. DOI: 10.1016/j.addr.2010.10.002. ISSN 0169-409X.

- [24] HASCALL, Vincent a Torvard LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [25] SCOTT, John. Secondary and Tertiary structures of Hyaluronan in Aqueous Solution: Some Biological Consequences. In: *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [26] LAURENT, Torvard, Ulla LAURENT, J. FRASER a J. FRASER. Functions of hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995, **54**(5), 429-432. ISSN 1468-2060.
- [27] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, **98**(8), 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. ISSN 0009-2665.
- [28] LAURENT, Torvard, LAURENT a J. FRASER. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology*. 1996, **74**(2), 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1996.32>. ISSN 0818-9641.
- [29] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, **19**(5), 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3. ISSN 1040-0400.
- [30] FRASER, J., T. LAURENT a U. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, (242), 27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x. ISSN 1365-2796.
- [31] SCOTT, J. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. In: *Ciba Foundation Symposium 143*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 1989, (143), s. 6-14. DOI: 10.1002/9780470513774.ch2. ISBN 9780470513774. ISSN 1935-4657.
- [32] NYKOPP, Timo, Kirsi RILLA, Markku TAMMI et al. Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2010, **10**(1), 1-9. DOI: 10.1186/1471-2407-10-512. ISSN 1471-2407.
- [33] NEČAS, J, L BARTOSIKOVA, P BRAUNER a J KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, **53**(8), 397-411. ISSN 1805-9392.
- [34] SVANOVSKÝ, E. Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a slovenská farmacie*. 2007, **56**(6), 264-268. ISSN 1805-4439.
- [35] CHEN, W. a Giovanni ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999, **7**(2), 79-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/b14004-7>. ISSN 1524-475X.
- [36] SLONKOVÁ, Veronika, Vladimír VAŠKŮ a Hana JEDLIČKOVÁ. Kyselina hyaluronová v léčbě akutních a chronických ran. *Hojení ran*. 2010, **4**(1), 4-8. ISSN 1802-6400.

- [37] FRENKEL, Joseph. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*. 2014, **11**(2), 159-163. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x. ISSN 1742-4801.
- [38] BAIER LEACH, Jennie, Kathryn BIVENS, Charles PATRICK JR. a Christine SCHMIDT. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, **82**(5), 578-589. DOI: 10.1002/bit.10605. ISSN 0006-3592.
- [39] ZHENG SHU, Xiao, Yanchun LIU, Fabio PALUMBO, Yi LUO a Glenn PRESTWICH. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004, **25**(7-8), 1339-1348. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.014. ISSN 0142-9612.
- [40] COLLINS, Maurice a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **92**(2), 1262-1279. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>. ISSN 0144-8617.
- [41] SHU, Xiao, Kaustabh GHOSH, Yanchun LIU, Fabio PALUMBO, Yi LUO, Richard CLARK a Glenn PRESTWICH. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004, **68**(2), 365-375. DOI: 10.1002/jbm.a.20002. ISSN 0021-9304.
- [42] VAZQUEZ, J.R., Brian SHORT, Andrew FINDLOW, Brent NIXON, Andrew BOULTON a David ARMSTRONG. Outcomes of hyaluronan therapy in diabetic foot wounds. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2003, **59**(2), 123-127. DOI: 10.1016/S0168-8227(02)00197-3. ISSN 0168-8227.
- [43] PUHL, W a P SCHARF. Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1997, **56**(7), 441-441. DOI: 10.1136/ard.56.7.441. ISSN 0003-4967.
- [44] PHAM, T. Evaluation of the symptomatic and structural efficacy of a new hyaluronic acid compound, NRD101, in comparison with diacerein and placebo in a 1 year randomised controlled study in symptomatic knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004, **63**(12), 1611-1617. DOI: 10.1136/ard.2003.019703. ISSN 0003-4967.
- [45] HARDINGHAM, Timothy. Cartilage: aggrecan - link protein - hyaluronan aggregates. In: *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 13.1.2014]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA05/HA05E.html>
- [46] Hylira gel. *Drugs.com* [online]. c2000-2016 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/cdi/hylira-gel.html>
- [47] BERGERET-GALLEY, Catherine, Xavier LATOUCHE a Yves-Gérard ILLOUZ. The Value of a New Filler Material in Corrective and Cosmetic Surgery: DermaLive and DermaDeep. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2001, **25**(4), 249-255. DOI: 10.1007/s002660010131. ISSN 0364-216x.
- [48] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *Praktická gynekologie*. 2009, **13**(3), 143-147. ISSN 1801-8750.

- [49] TOOLE, B., T. WIGHT a M. TAMMI. Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(7), 4593-4596. DOI: 10.1074/jbc.R100039200. ISSN 0021-9258.
- [50] WEEN, Miranda, Martin OEHLER a Carmela RICCIARDELLI. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, **12**(12), 1009-1029. DOI: 10.3390/ijms12021009. ISSN 1422-0067.
- [51] GÖTTE, M. a G. YIP. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. *Cancer Research*. 2006, **66**(21), 10233-10237. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1464. ISSN 0008-5472.
- [52] TOOLE, B. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clinical Cancer Research*. 2009, **15**(24), 7462-7468. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0479. ISSN 1078-0432.
- [53] MISRA, Suniti, Paraskevi HELDIN, Vincent HASCALL, Nikos KARAMANOS, Spyros SKANDALIS, Roger MARKWALD a Shibnath GHATAK. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*. 2011, **278**(9), 1429-1443. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x. ISSN 1742-464x.
- [54] KOBAYASHI, Hiroyuki, Kentaro HORIKOSHI, Atsuyuki YAMATAKA, Tamiki YAMATAKA, Tadaharu OKAZAKI, Geoffrey LANE a Takeshi MIYANO. Hyaluronic acid: A specific prognostic indicator of hepatic damage in biliary atresia. *Journal of Pediatric Surgery*. 1999, **34**(12), 1791-1794. DOI: 10.1016/S0022-3468(99)90314-7. ISSN 0022-3468.
- [55] KNUDSON, Warren, Geraldine CHOW a Cheryl KNUDSON. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*. 2002, **21**(1), 15-23. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00186-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00186-x). ISSN 0945-053X.
- [56] TAMMI, Raija, Anne KULTTI, Veli-Matti KOSMA, Risto PIRINEN, Päivi AUVINEN, Markku TAMMI a Naoki ITANO. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*. 2008, **18**(4), 127-144. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0659-0\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0659-0_7). ISSN 1044-579X.
- [57] SUGAHARA, K. Tumor Cells Enhance Their Own CD44 Cleavage and Motility by Generating Hyaluronan Fragments. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, **281**(9), 5861-5868. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506740200>. ISSN 1083-351x.
- [58] KULTTI, Anne, Xiaoming LI, Ping JIANG, Curtis THOMPSON, Gregory FROST a H. SHEPARD. Therapeutic Targeting of Hyaluronan in the Tumor Stroma. *Cancers*. 2012, **4**(4), 873-903. DOI: 10.3390/cancers4030873. ISSN 2072-6694.
- [59] MYTAR, Bożenna, Maciej SIEDLAR, Maria WOLOSZYN, Vittorio COLIZZI a Marek ZEMBALA. Cross-talk between human monocytes and cancer cells during reactive oxygen intermediates generation: The essential role of hyaluronan. *International Journal of Cancer*. 2001, **94**(5), 727-732. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.1530.abs>. ISSN 1097-0215.

- [60] TOOLE, Bryan a Mark SLOMIANY. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: Partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resistance Updates*. 2008, **11**(3), 110-121. DOI: 10.1016/j.drug.2008.04.002. ISSN 1368-7646.
- [61] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [62] HIEMENZ, Paul a RAJAGOPALAN. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. 3rd rev. and exp. Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, 650 s. ISBN 08-247-9397-8.
- [63] TEHRANI-BAGHA, Ali a Krister HOLMBERG. Solubilization of Hydrophobic Dyes in Surfactant Solutions. *Materials*. 2013, **6**(2), 580-608. DOI: 10.3390/ma6020580. ISSN 1996-1944.
- [64] RANGEL-YAGUI, Carlota Oliveira, Adalberto PESSOA a Leoberto Costa TAVARES. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2005, **8**(2), 147-163. ISSN 1520-6017.
- [65] RANGEL-YAGUI, Carlota O., Helen Wei Ling HSU, Adalberto PESSOA-JR a Leoberto Costa TAVARES. Micellar solubilization of ibuprofen: influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005, **41**(2), 237-246. DOI: 10.1590/S1516-93322005000200012. ISSN 1516-9332.
- [66] SEEDHER, Neelam a Mamta KANOJIA. Micellar Solubilization of Some Poorly Soluble Antidiabetic Drugs: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 2008, **9**(2), 431-436. DOI: 10.1208/s12249-008-9057-5. ISSN 1530-9932.
- [67] HUTTER, Tanya, Charles LINDER, Eliahu HELDMAN a Sarina GRINBERG. Interfacial and self-assembly properties of bolaamphiphilic compounds derived from a multifunctional oil. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, **365**(1), 53-62. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.08.057. ISSN 0021-9797.
- [68] Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. In: *Malvern.com* [online]. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Ltd., 2006 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <http://quimica.udea.edu.co/~coloides/Anexo1.pdf>
- [69] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [70] PABST, W. a E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2007.
- [71] VOLKA, Karel. *Analytická chemie I*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0245-6.
- [72] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 1st ed. Weinheim: Wiley-Vch, 2002. ISBN 35-272-9919-X.
- [73] LÁZNÍČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK. *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. 3. vyd. V Praze: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2791-5.



- [74] KLÁN, Petr. *Organická fotochemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-210-2526-3.
- [75] Basics of UV-Visible Spectroscopy. OLIVA-CHATELAIN, Brittany L. a Andrew R. BARRON. *OpenStax* [online]. Rice University: William & Flora Hewlett Foundation, 2010 [cit. 2016-08-10]. Dostupné z: <http://cnx.org/contents/Auez1s9H@1/Basics-of-UV-Visible-Spectrosc>
- [76] BUWALDA, Rixt, Jessica JONKER a Jan ENGBERTS. Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution. *Langmuir*. 1999, **15**(14), 1083-1089. DOI: 10.1021/la980824i. ISSN 0743-7463.
- [77] DUTTA, Robin a Subray BHAT. Interaction of phenazinium dyes and methyl orange with micelles of various charge types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996, **106**(2-3), 127-134. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03374-2. ISSN 0927-7757.
- [78] SOMMER, L. *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet the Principles*. 1st Edition. Burlington: Elsevier Science, 1989. ISBN 978-044-4597-458.
- [79] HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. 1 st. ed. Boston: McGraw-Hill, 2000. ISBN 00-711-6953-9.
- [80] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-708-0422-X.
- [81] JACKSON, Kevin. Dynamický rozptyl světla – Co, jak a proč. *CHEMagazín*. 2007, **17**(1), 12-14. ISSN 1210-7409.
- [82] ŠENKEŘÍKOVÁ, Jana. *Charakterizace emulzí fotonovou korelační spektroskopií*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Věra Kašpárková.
- [83] LIANOS, Panagiotis, Jacques LANG, Claude STRAZIELLE a Raoul ZANA. Fluorescence probe study of oil-in-water microemulsions. 1. Effect of pentanol and dodecane or toluene on some properties of sodium dodecyl sulfate micelles. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982, **86**(6), 1019-1025. DOI: 10.1021/j100395a037. ISSN 0022-3654.
- [84] KALYANASUNDARAM, K. a J. THOMAS. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society*. 1977, **99**(7), 2039-2044. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja00449a004>. ISSN 1520-5126.
- [85] MOHANAMBE, L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, **110**(29), 14345-14354. DOI: 10.1021/jp061695e. ISSN 1520-6106.

- [86] RAY, Gargi, Indranil CHAKRABORTY a Satya MOULIK. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, **294**(1), 248–254. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.07.006. ISSN 0021-9797.
- [87] JONES, Marie-Christine a Jean-Christophe LEROUX. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1999, **48**(2), 101-111. DOI: 10.1016/S0939-6411(99)00039-9. ISSN 0939-6411.
- [88] BALDI, Leonardo, Eduardo IMAZAKI a Teresa ATVARS. Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene. *Dyes and Pigments*. 2008, **76**(3), 669-676. DOI: 10.1016/j.dyepig.2007.01.011. ISSN 0143-7208.
- [89] WINNIK, Françoise a Sudarshi REGISMOND. Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1996, **118**(1-2), 1-39. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03733-8](http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757(96)03733-8). ISSN 0927-7757.
- [90] POWNALL, Henry a Louis SMITH. Viscosity of the hydrocarbon region of micelles.: Measurement by excimer fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*. 1973, **95**(10), 3136-3140. ISSN 0002-7863.
- [91] GALLA, Hans-Joachim a Erich SACKMANN. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: Use of pyrene excimer as optical probes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974, **339**(1), 103-115. ISSN 0006-3002.
- [92] MOGHIMI, S. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*. 2005, **19**(3), 311-330. DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>. ISSN 1530-6860.
- [93] SAHOO, Sanjeeb. Special Feature — Nanobiotechnology/Nanomedicine. *Asia-Pacific Biotech News*. 2005, **9**(20), 1048-1082. DOI: 10.1142/S0219030305000443. ISSN 0219-0303.
- [94] KRÁL, Vladimír, Jan ŠOTOLA, Petr NEUWIRTH, Zdeněk KEJÍK, Kamil ZÁRUBA a Pavel MARTÁSEK. Nanomedicína - současný stav a perspektivy: velký potenciál, nebo jen módní slogan?. *Chemické listy*. 2006, **100**(1), 4-9. ISSN 0009-2770.
- [95] KUMAR, Majeti. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *The Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2000, **3**(2), 234-258. ISSN 2042-7158.
- [96] MALMSTEN, Martin. Soft drug delivery systems. *Soft Matter*. 2006, **2**(9), 760-769. DOI: 10.1039/b608348j. ISSN 1744-683x.
- [97] KWON, Glen a Teruo OKANO. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996, **21**(2), 107-116. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00401-2. ISSN 0169-409x.

- [98] FOX, Megan, Francis SZOKA a Jean FRÉCHET. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Accounts of Chemical Research*. 2009, **42**(8), 1141-1151. DOI: 10.1021/ar900035f. ISSN 0001-4842.
- [99] JAIN, Rakesh. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, **46**(1-3), 353-365. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.011>. ISSN 0169-409X.
- [100] MALMSTEN, Martin. *Surfactants and polymers in drug delivery*. 1. vyd. New York: Marcel Dekker, 2002, 348 s. ISBN 08-247-0804-0.
- [101] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003, xvi, 545 s. ISBN 04-714-9883-1.
- [102] KOGEJ, Ksenija a Jože ŠKERJANC. Effect of polyelectrolyte on the aggregation of cationic surfactants in aqueous solutions. *Acta Chim. Slov.* 1998, **45**(4), 443-453. ISSN 1318-0207.
- [103] LANGEVIN, Dominique. Complexation of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants in aqueous solutions. A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009, **147-148**, 170-177. DOI: 10.1016/j.cis.2008.08.013. ISSN 0001-8686.
- [104] MONTEUX, Cécile, Marie-France LLAURO, Damien BAIGL, Claudine WILLIAMS, Olivier ANTHONY a Vance BERGERON. Interfacial Microgels Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants. 1. Influence of Polyelectrolyte Molecular Weight. *Langmuir*. 2004, **20**(13), 5358-5366. DOI: 10.1021/la0497853. ISSN 0743-7463.
- [105] MONTEUX, Cécile, Claudine WILLIAMS a Vance BERGERON. Interfacial Microgels Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants. Part 2. Influence of Surfactant Chain Length and Surfactant/Polymer Ratio. *Langmuir*. 2004, **20**(13), 5367-5374. DOI: 10.1021/la049784a. ISSN 0743-7463.
- [106] BAI, Guangyue, Marieta NICHIFOR, António LOPES a Margarida BASTOS. Thermodynamics of Self-Assembling of Hydrophobically Modified Cationic Polysaccharides and Their Mixtures with Oppositely Charged Surfactants in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, **109**(46), 21681-21689. DOI: 10.1021/jp054154i. ISSN 1520-6106.
- [107] HERSLOEF, Aasa, Lars SUNDELOEF a Katarina EDSMAN. Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, **96**(5), 2345-2348. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/j100184a061>. ISSN 1932-7455.
- [108] THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Karin. BERGFELDT. Phase behavior of systems of polyacrylate and cationic surfactants. *Langmuir*. 1991, **7**(12), 2893-2898. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/la00060a005>. ISSN 0743-7463.
- [109] ANSARI, Anis, M. KAMIL a Kabir-ud DIN. Interaction of Oppositely Charged Polymer– Surfactant System Based on Surface Tension Measurements. *Journal of Petroleum Science Research*. 2013, **2**(1), 35-40. ISSN 0920-4105.

- [110] ALMGREN, Mats, Per HANSSON, Emad MUKHTAR a Jan VAN STAM. Aggregation of alkyltrimethylammonium surfactants in aqueous poly(styrenesulfonate) solutions. *Langmuir*. 1992, **8**(10), 2405-2412. DOI: 10.1021/la00046a011. ISSN 0743-7463.
- [111] HANSSON, Per a Mats ALMGREN. Interaction of CnTAB with Sodium (Carboxymethyl)cellulose: Effect of Polyion Linear Charge Density on Binding Isotherms and Surfactant Aggregation Number. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, **100**(21), 9038-9046. DOI: 10.1021/jp953637r. ISSN 0022-3654.
- [112] HANSSON, Per a Mats ALMGREN. Interaction of Alkyltrimethylammonium Surfactants with Polyacrylate and Poly(styrenesulfonate) in Aqueous Solution: Phase Behavior and Surfactant Aggregation Numbers. *Langmuir*. 1994, **10**(7), 2115-2124. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/la00019a017>. ISSN 0743-7463.
- [113] HAYAKAWA, Katumitu, J. SANTERRE a Jan KWAK. Study of surfactant-polyelectrolyte interactions. Binding of dodecyl- and tetradecyltrimethylammonium bromide by some carboxylic polyelectrolytes. *Macromolecules*. 1983, **16**(10), 1642-1645. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ma00244a017>. ISSN 0024-9297.
- [114] HAYAKAWA, Katumitu a Jan KWAK. Surfactant-polyelectrolyte interactions. 1. Binding of dodecyltrimethylammonium ions by sodium dextran sulfate and sodium poly(styrenesulfonate) in aqueous solution in the presence of sodium chloride. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982, **86**(19), 3866-3870. DOI: 10.1021/j100216a032. ISSN 0022-3654.
- [115] KÖTZ, J, S KOSMELLA a T BEITZ. Self-assembled polyelectrolyte systems. *Progress in Polymer Science*. 2001, **26**(8), 1199-1232. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700\(01\)00016-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6700(01)00016-8). ISSN 0079-6700.
- [116] KOSMELLA, S., J. KÖTZ, K. SHIRAHAMA a J. LIU. Cooperative Nature of Complex Formation in Mixed Polyelectrolyte–Surfactant Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1998, **102**(34), 6459-6464. DOI: 10.1021/jp9806213. ISSN 1520-6106.
- [117] LIU, Jun, Noboru TAKISAWA, Keishiro SHIRAHAMA, Hiroshi ABE a Kazutami SAKAMOTO. Effect of Polymer Size on the Polyelectrolyte–Surfactant Interaction. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997, **101**(38), 7520-7523. DOI: 10.1021/jp971198l. ISSN 1520-6106.
- [118] MALOVIKOVA, Anna, Katumitu HAYAKAWA a Jan KWAK. Surfactant-polyelectrolyte interactions. 4. Surfactant chain length dependence of the binding of alkylpyridinium cations to dextran sulfate. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984, **88**(10), 1930-1933. DOI: 10.1021/j150654a002. ISSN 0022-3654.
- [119] WANG, Xiaoyong, Yajuan LI, Junxin LI, Jinben WANG, Yilin WANG, Zhixin GUO a Haike YAN. Salt Effect on the Complex Formation between Polyelectrolyte and Oppositely Charged Surfactant in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, **109**(21), 10807-10812. DOI: 10.1021/jp0450585. ISSN 1520-6106.

- [120] ANTHONY, Olivier a Raoul ZANA. Interactions between Water-Soluble Polymers and Surfactants: Effect of the Polymer Hydrophobicity. 1. Hydrophilic Polyelectrolytes. *Langmuir*. 1996, **12**(8), 1967-1975. DOI: 10.1021/la950817j. ISSN 0743-7463.
- [121] ANTHONY, Olivier a Raoul ZANA. Interactions between Water-Soluble Polymers and Surfactants: Effect of the Polymer Hydrophobicity. 2. Amphiphilic Polyelectrolytes (Polysoaps). *Langmuir*. 1996, **12**(15), 3590-3597. DOI: 10.1021/la960184o. ISSN 0743-7463.
- [122] JIN, Yu-Jin, Termsarasab UBONVAN a Dae-Duk KIM. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2010, **40**(), 33-43. DOI: 10.4333/KPS.2010.40.S.033. ISSN 2093-5552.
- [123] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, **93**(4), 1478-1483. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/j100341a058>. ISSN 0022-3654.
- [124] THALBERG, Kyrre., Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, **94**(10), 4289-4295. DOI: 10.1021/j100373a075. ISSN 0022-3654.
- [125] XU, Jing, Huiyu BAI, Chenglin YI, Jing LUO, Cheng YANG, Wenshui XIA a Xiaoya LIU. Self-assembly behavior between native hyaluronan and styrylpyridinium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2011, **86**(2), 678-683. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.006. ISSN 0144-8617.
- [126] TAO, Youhua, Jing XU, Mingqing CHEN, Huiyu BAI a Xiaoya LIU. Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*. 2012, **88**(1), 118-124. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.11.075. ISSN 0144-8617.
- [127] GRUNDĚLOVÁ, Lenka, Aleš MRÁČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Petr SMOLKA. The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **98**(1), 1039-1044. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057. ISSN 0144-8617.
- [128] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, **391**(1-3), 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 0927-7757.
- [129] BEHERA, G.B, B.K MISHRA, P.K BEHERA a M PANDA. Fluorescent probes for structural and distance effect studies in micelles, reversed micelles and microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1999, **82**(1-3), 1-42. DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00086-4. ISSN 0001-8686.
- [130] CAMPBELL, Adrian a P. SOMASUNDARAN. Use of Pyrene Spectroscopic Probes in the Study of Colloidal Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, **229**(1), 257-260. DOI: 10.1006/jcis.2000.7004. ISSN 0021-9797.

- [131] GLUSHKO, V., M.S.R. THALER a C.D. KARP. Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: Behavior in model solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1981, **210**(1), 33-42. DOI: 10.1016/0003-9861(81)90160-0. ISSN 0003-9861.
- [132] WILHELM, Manfred, Cheng ZHAO, Yongcai WANG, Renliang XU, Mitchell WINNIK, Jean MURA, Gerard RIESS a Melvin CROUCHER. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules*. 1991, **24**(5), 1033-1040. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ma00005a010>. ISSN 0024-9297.
- [133] ASTAFIEVA, Irina, Xing ZHONG a Adi EISENBERG. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*. 1993, **26**(26), 7339-7352. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ma00078a034>. ISSN 0024-9297.
- [134] YIN, Dian-shu, Wan-yun YANG, Zhi-qiang GE a Ying-jin YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(6), 1201-1206. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.017>. ISSN 0008-6215.
- [135] KALBÁČOVÁ, Marie, Martina VERDÁNOVÁ, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, **460**(1), 204–208. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.048. ISSN 0927-7757.
- [136] LAHLOU, A., B. BLANCHET, M. CARVALHO, M. PAUL a A. ASTIER. Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2009, **67**(5), 340-352. DOI: 10.1016/j.pharma.2009.05.008. ISSN 0003-4509.
- [137] PAUL, M., V. VIEILLARD, E. ROUMI, A. CAUVIN, M.C. DESPIAU, M. LAURENT a A. ASTIER. Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1mL polypropylene syringes for intravitreal administration. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2012, **70**(3), 139-154. DOI: 10.1016/j.pharma.2012.03.006. ISSN 0003-4509.
- [138] PAUL, Muriel, Victoire VIEILLARD, Emmanuel JACCOULET a Alain ASTIER. Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **436**(1-2), 282-290. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.063. ISSN 0378-5173.
- [139] SEITZ, W.Rudolf, Michael ROONEY, Eric MIELE et al. Derivatized, swellable polymer microspheres for chemical transduction. *Analytica Chimica Acta*. 1999, **400**(1-3), 55-64. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00608-X. ISSN 0003-2670.
- [140] WANG, Wei. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, **289**(1-2), 1-30. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.11.014. ISSN 0378-5173.

- [141] MAHLER, Hanns-Christian, Robert MÜLLER, Wolfgang FRIEß, Aurelie DELILLE a Susanne MATHEUS. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, **59**(3), 407-417. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.004. ISSN 0939-6411.
- [142] WANG, Lixiao a Hyuk YU. Chain conformation of linear polyelectrolyte in salt solutions: sodium poly(styrenesulfonate) in potassium chloride and sodium chloride. *Macromolecules*. 1988, **21**(12), 3498-3501. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ma00190a026>. ISSN 0024-9297.
- [143] LIU, Xikui a Ming JIANG. Optical Switching of Self-Assembly: Micellization and Micelle–Hollow-Sphere Transition of Hydrogen-Bonded Polymers. *Angewandte Chemie*. 2006, **118**(23), 3930-3934. DOI: 10.1002/ange.200504364. ISSN 0044-8249.
- [144] KAYITMAZER, A. B., E. SEYREK, P. L. DUBIN a B. A. STAGGEMEIER. Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins †. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, **107**(32), 8158-8165. DOI: 10.1021/jp034065a. ISSN 1520-6106.
- [145] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. CARNERO RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **258**(1), 116-122. DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00082-6. ISSN 0021-9797.
- [146] PEARLMAN, Robert, Samuel YALKOWSKY a Sujit BANERJEE. Water solubilities of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1984, **13**(2), 555-562. ISSN 1529-7845.
- [147] GREKSÁKOVÁ, O., J. OREMUSOVÁ, M. VOJTEKOVÁ a F. KOPECKÝ. Spectrophotometric Study of the Effect of Univalent Electrolytes on Critical Micelle Concentrations of [1-(Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium, 1-Hexadecylpyridinium, and Dimethylbenzyl dodecylammonium Bromides. *Chem. Papers*. 1994, **48**(5), 300-305. ISSN 0366-6352.
- [148] ČERMÁKOVÁ, Ludmila, Jitka ROSENDORFOVÁ a Miroslav MALÁT. Determination of critical micelle concentration of 1-carbethoxypentadecyltrimethylammonium bromide. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1980, **45**(1), 210-213. DOI: 10.1135/cccc19800210. ISSN 0010-0765.
- [149] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, **30**(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463.
- [150] LIU, Zhenhai, Yazhuo SHANG, Jian FENG, Changjun PENG, Honglai LIU a Ying HU. Effect of Hydrophilicity or Hydrophobicity of Polyelectrolyte on the Interaction between Polyelectrolyte and Surfactants: Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, **116**(18), 5516-5526. DOI: 10.1021/jp212089d. ISSN 1520-6106.

- [151] SAUEROVÁ, Pavla, Martina VERDÁNOVÁ, Filip MRAVEC, Tereza PILGROVÁ, Tereza VENEROVÁ, Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **483**, 155-161 [cit. 2016-08-12]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.058. ISSN 0927-7757. ISSN 0927-7757.
- [152] SAUEROVÁ, Pavla, Tereza PILGROVÁ, Miloslav PEKAŘ a Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ. 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, **103**(1), 1276-1284. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.173. ISSN 0141-8130.
- [153] MATA, Jitendra, Dharmesh VARADE a Prashant BAHADUR. Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochimica Acta*. 2005, **428**(1-2), 147-155. DOI: 10.1016/j.tca.2004.11.009. ISSN 0040-6031.
- [154] PISÁRČIK, Martin, Ferdinand DEVÍNSKY a Matúš PUPÁK. Determination of micelle aggregation numbers of alkyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate surfactants using time-resolved fluorescence quenching. *Open Chemistry*. 2015, **13**(1), 922-931. DOI: 10.1515/chem-2015-0103. ISSN 2391-5420.
- [155] ANACHKOV, Svetoslav E., Krassimir D. DANOV, Elka S. BASHEVA, Peter A. KRALCHEVSKY a Kavssery P. ANANTHAPADMANABHAN. Determination of the aggregation number and charge of ionic surfactant micelles from the stepwise thinning of foam films. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012, **183-184**(1), 55-67. DOI: 10.1016/j.cis.2012.08.003. ISSN 0001-8686.



## 9 PŘEHLED ZKRATEK

NMR	nukleární magnetická rezonance
HAS	hyaluronan syntázy
UV	ultrafialové („ultraviolet“) záření
CMC	kritická micelární koncentrace
SDS	dodecylsírán sodný
DLS	dynamický rozptyl světla
Rh	hydrodynamický poloměr
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
Ex:Mo	poměr excimer:monomer
CAC	kritická agregační koncentrace
NaCMC	karboxymethylcelulóza
NaPA	polyakrylát sodný
DTAB	dodecyltrimetyl-amonium bromid
BAC	benzalkonium-chlorid
NaCl	chlorid sodný
CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
SPTX	Septonex
DJ	disacharidová jednotka

**10 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ**

$\lambda$	vlnová délka světla
$I_0$	intenzita dopadajícího světla
$I$	intenzita světla
$x$	tloušťka vrstvy
$\tau$	turbidita
$t$	čas
$g(t)$	autokorelační funkce
$t_c$	relaxační čas
$D$	difúzní koeficient
$n$	index lomu
$\theta$	úhel, pod kterým je měřena intenzita světla
$k$	Boltzmannova konstanta
$T$	teplota
$\eta$	viskozita disperzního prostředí
$S_0$	základní stav atomu
$S_1$	singletový stav atomu
$T_1$	tripletový stav atomu
$I_F$	intenzita fluorescence
$c$	koncentrace

## 11 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Pasivní vs. aktivní cílení.
- Obr. 2: Typy nanonosičů pro řízenou dopravu léčiv
- Obr. 3: Schéma znázorňující lokální dopravu léčiv do ledviny při využití mikrobublin a ultrazvuku.
- Obr. 4: Základní chemická struktura hyaluronanu
- Obr. 5: Struktura hyaluronanu – vyobrazení prostorového uspořádání funkčních skupin
- Obr. 6: Tetrasacharid obsažený v řetězci hyaluronanu, který se skládá ze dvou opakujících se disacharidových jednotek vykazujících ve vodě preferovanou konfiguraci.
- Obr. 7: Zobrazení interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu.
- Obr. 8: Struktura molekuly tenzidu
- Obr. 9: Struktura kladně nabitě micely
- Obr. 10: Tři možná schematická zobrazení struktury micel
- Obr. 11: Jablonskiho diagram
- Obr. 12: Distribuce světla pro (a) Rayleighův rozptyl a (b) rozptyl na velkých částicích
- Obr. 13: Elektrická dvojvrstva koloidních částic
- Obr. 14: Schéma tvorby excimeru a odpovídající pásy v ukázkovém spektru
- Obr. 15: Absorpční a emisní spektrum pyrenu v závislosti na polaritě prostředí a struktura molekuly pyrenu
- Obr. 16: Schéma principu vzniku excimeru pyrenu
- Obr. 17: Modelové průběhy hodnotících pyrenových indexů
- Obr. 18: Schematická ilustrace (a) řetězce polyelektrolytu, (b) asociace tenzidu na polymer, (c) navázaných molekul tenzidu po CAC a (d) formace komplexu po CMC v systému opačně nabitého polymeru a tenzidu ve vodném roztoku
- Obr. 19: Polyelektrolyt-tenzid komplexy ve zředěném roztoku – model perlového náhrdelníku
- Obr. 20: Změny v emisním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí

- Obr. 21: Změny v excitačním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí
- Obr. 22: Boltzmannův model a jeho parametry
- Obr. 23: Ukázky korelačních funkcí v závislosti na kvalitě vzorku
- Obr. 24: Znázornění vztahu početní, objemové a intenzitní distribuce velikosti částic
- Obr. 25: Závislost EmPI na koncentraci Septonexu v prostředí vody a 0,15M NaCl.
- Obr. 26: Závislost ExPI a Ex:Mo na koncentraci Septonexu ve vodném roztoku hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa)
- Obr. 27: Závislost EmPI a Ex:Mo na koncentraci Septonexu s přidavkem hyaluronanu ( $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa) v prostředí roztoku 0,15M NaCl
- Obr. 28: Závislost ExPI a Ex:Mo na čase skladování systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa
- Obr. 29: Distribuce velikosti částic v systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa
- Obr. 30: Závislost ExPI a Ex:Mo na rostoucí (plné body) nebo klesající (prázdné body) teplotě během měření systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 100 kDa
- Obr. 31: Závislost ExPI a Ex:Mo systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) ve vodě a v roztoku 0,15M NaCl (šrafovaná výplň sloupců)
- Obr. 32: Distribuce velikosti částic systému obsahujícím SPTX  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) ve vodě a v roztoku 0,15M NaCl
- Obr. 33: Závislost ExPI a Ex:Mo systému obsahujícím Septonex  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a hyaluronan  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) před (tmavší sloupce) a po zředění (světlejší sloupce) systému.
- Obr. 34: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan -Septonex
- Obr. 35: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000 \text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). Celých 24 h kultivace probíhalo v přítomnosti zvířecího séra.

- Obr. 36: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). V prvních 4 h probíhala kultivace v nepřítomnosti zvířecího séra, následujících 20 h probíhala kultivace již za přítomnosti zvířecího séra.
- Obr. 37: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 24 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací Septonexu samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA) ve dvou různých koncentracích. V prvních 4 h probíhala kultivace v nepřítomnosti zvířecího séra, následujících 20 h probíhala kultivace již za přítomnosti zvířecího séra.
- Obr. 38: Závislost absorbance na koncentraci CTAB odpovídající titrací hyaluronanu o různé koncentraci a molekulové hmotnosti 15 kDa do micelárního roztoku tenzidu
- Obr. 39: Závislost absorbance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci  $0,3$  a  $0,5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (15 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $3$  a  $5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- Obr. 40: Závislost absorbance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci  $0,3$ ,  $0,5$  a  $1,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (1 500 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $10$  a  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- Obr. 41: Závislost absorbance na poměru T/D pro titrace hyaluronanu o koncentraci  $0,1$  a  $1,0\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (100 a 1 500 kDa) do micelárního roztoku CTAB o výchozí koncentraci  $3$  a  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- Obr. 42: Výsek schematického fázového diagramu získaný z turbidimetrických měření systému CTAB-hyaluronan (15 kDa)
- Obr. 43: Výsek schematického fázového diagramu získaný z turbidimetrických měření systému CTAB-hyaluronan (100 kDa)
- Obr. 44: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan (15, 100 a 1 500 kDa) – micelární roztok CTAB.
- Obr. 45: Závislost průměrné velikosti částic ( $Z-d_H$ ) a zeta potenciálu na poměru T/D v systému hyaluronan (15, 100 a 1 500 kDa) – micelární roztok Septonexu.
- Obr. 46: Koncentrace solubilizovaného barviva Sudan Red G v závislosti na koncentraci tenzidu v systému.
- Obr. 47: Závislost EmPI na poměru nábojů v systému hyaluronan-CTAB
- Obr. 48: Titrační řada systému hyaluronan (15 kDa) – CTAB. Červená čísla značí odpovídající poměr T/D.

- Obr. 49: Titrační řada systému hyaluronan (1 500 kDa) – CTAB. Červená čísla značí odpovídající poměr T/D.
- Obr. 50: Metabolická aktivita osteoblastů SAOS-2 při nasetí buněk o koncentraci  $20\,000\text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$  po 2 h kultivace v přítomnosti různých koncentrací CTAB samotného nebo v komplexu s kyselinou hyaluronovou (HyA). Celá kultivace (2 h) probíhala v přítomnosti zvířecího séra. Koncentrace hyaluronanu byla ve všech případech  $7,46\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 12 SEZNAM TABULEK

- Tab. 1: Hodnoty CMC a parametrů Boltzmannova modelu Septonexu ve vodném prostředí a prostředí 0,15M NaCl
- Tab. 2: Hodnoty CAC, CMC a parametrů Boltzmannova modelu pro systém Septonex + hyaluronan o různé molekulové hmotnosti a koncentraci  $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- Tab. 3: Složení komplexů pro experimenty ověřující stabilitu systému tenzid-HyA při nízkých koncentracích HyA
- Tab. 4: Izoelektrické body pro titraci tenzidu (CTAB nebo SPTX) do hyaluronanu o koncentraci 0,015 nebo  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a molekulové hmotnosti 100 nebo 1 500 kDa
- Tab. 5: Přehled provedených turbidimetrických titrací
- Tab. 6: Izoelektrické body pro titraci hyaluronanu (15, 100 nebo 1 500 kDa) do micelárního roztoku tenzidu

## 13 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### 13.1 Články v impaktovaném časopise

SAUEROVÁ, P.; VERDÁNOVÁ, M.; PILGROVÁ, T.; VENEROVÁ, T.; MRAVEC, F.; KALBÁČOVÁ, M.; PEKAŘ, M. Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2015, vol. 483, no. 1, p. 155-161. ISSN: 0927-7757.

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.

### 13.2 Konferenční příspěvky indexované v databázi Web of Science

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M.; HEJNÁ, J. Nanoparticles formed by self- assembly of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. *NANOCON 2013 Conference Proceedings*, 2013. s. 595-599. ISBN: 978-80-87294-47- 5.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of nanoparticles formed by cationic micelles and hyaluronan. *NANOCON 2015 Conference Proceedings*. 2015. s. 404-407. ISBN: 978-80-87294-63- 5.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Interaction between Cationic Micelles and Hyaluronan. *Materials Science Forum*, 2015, no. 851, p. 26-31. ISSN: 0255-5476.

### 13.3 Příspěvky na mezinárodních konferencích

KRUTIŠOVÁ, T.; MRAVEC, F. Influence of the Preparation of aBiopolymer- Surfactant Complex on Its Stability and Properties of Solubilization. *Studentská konference Chemie je život - Sborník příspěvků*. 2012, s. 340-345. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

KRUTIŠOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of Nanoparticles Formed by Negatively Charged Hyaluronan and Cationic Surfactant. *XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - sborník příspěvků*. 2014. s. 73-77. ISBN: 978-80-210-6842- 1.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Stability of the Complex Nanoparticles of Negatively Charged Hyaluronan and Cationic Surfactant. *NANOCON 2014 Conference Proceedings*. 2014. s. 1- 5. ISBN: 978-80-87294-55- 0.

PILGROVÁ, T.; ŘÍKOVSKÁ, K.; PEKAŘ, M. Characterization of the Colloidal Properties of a Microbubble Contrast Agent. *Studentská odborná konference Chemie je život 2015 - Sborník příspěvků*. 2015. s. 289-294. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of Effect of Hyaluronan Addition to Septonex Micellar Solution. *XVI. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. 2016. s. 187- 189. ISBN: 978-80-210-8267- 0.



PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Turbidimetry and fluorescence study of hyaluronan- surfactant nanoparticles formation. *NANOCON 2016 Conference Proceedings*. 2016. s. 439-443. ISBN: 978-80-87294-68- 0.

### 13.4 Abstrakty na mezinárodních konferencích

KRUTIŠOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Influence of the Preparation of a Polyelectrolyte- Surfactant Complex on Its Properties and Stability. Rome, Italy: Sapienza Universita di Roma, 2013. s. 226

PILGROVÁ, T.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M.; HAVLÍNOVÁ, J.; ORBAN, M. Colloid Properties of Ultrasound Contrast Agents. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*. 2013. p. 46-47. ISSN: 1364-5706.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Self- Assembly Behavior of Negatively Charged Hyaluronan and Oppositely Charged Surfactants. Limassol, Cyprus, *ECIS 2014*: 2014. s. 84.

PILGROVÁ, T.; MRAVEC, F.; GREGOROVÁ, Z.; ORBAN, M.; PEKAŘ, M. Colloid Properties of Phospholipids Aggregates. Shanghai, China: 2014. s. 116-117.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of Nanoparticles Formed by Negatively Charged Hyaluronan and Cationic Surfactants using Light Scattering Techniques. Faculty of Physics, University of Vienna, Austria: 2014. s. 48.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Biocompatibilization of micelles by hyaluronan. *1st European Conference on Pharmaceutics – Abstractbook*. Reims, France: 2015.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Enhancement of Biocompatibility of Cationic Micelles by Hyaluronan. *IACIS 2015*. Mainz, Německo: 2015. s. 87.

PILGROVÁ, T.; MRAVEC, F.; POSPÍŠILOVÁ, Z.; ORBAN, M.; PEKAŘ, M. A new approach to characterization of ultrasound contrast agents. *SMIT 2015 - Abstract Book*. Brno: 2015. S. 62.

PILGROVÁ, T.; MRAVEC, F.; ORBAN, M.; PEKAŘ, M. Study of the Colloidal Properties of Phospholipids Microbubbles. *The 21st European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, Abstract book*. Rotterdam, 2016. s. 110.

PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Turbidimetry and Fluorescence Study of Effect of Hyaluronan Addition to Cationic Micellar Solution. Book of Abstracts, *20th European Symposium on Polymer Spectroscopy (ESOPS)*. Dresden, Germany: Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V., 2016. s. 64. ISBN: 978-3-9816007-4- 2.

### 13.5 Přednášky na konferencích

27th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (Brno, Česká republika) 2014

Studentská odborná konference Chemie je život (Brno, Česká republika) 2012 a 2015

### 13.6 Postery na konferencích

International Soft Matter Conference (Roma, Italy) 2013

5th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2013

25th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (Baden-Baden, Německo) 2013

28th Conference of the European Colloid and Interface Society (Lemesos, Kypr) 2014

6th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2014

26th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (Shanghaj, Čína) 2014

XIV. Setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2014

6th International Conference on Polymer Behaviour (Vienna, Austria) 2014

1st European Conference on Pharmaceutics (Rheim, France) 2015

15th Conference of the International Association of Colloid and Interface Scientists (Mohuč, Německo) 2015

Chemistry & Life (Brno, Česká Republika) 2015

7th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2015

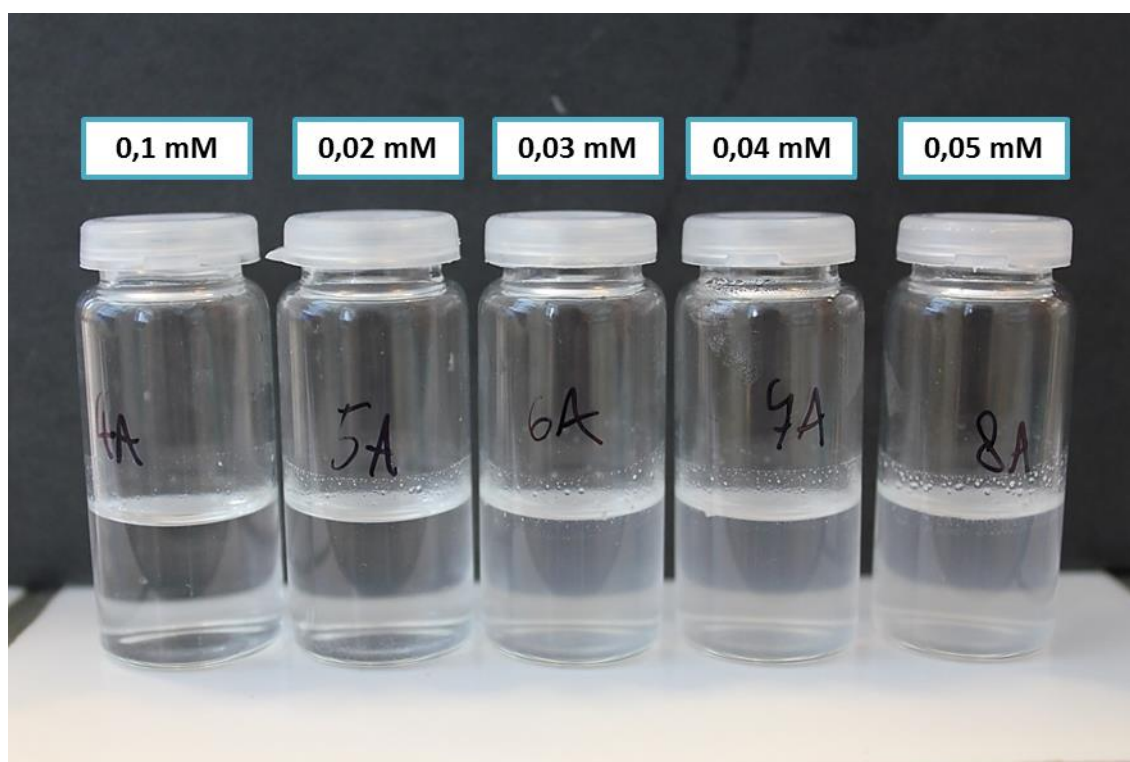
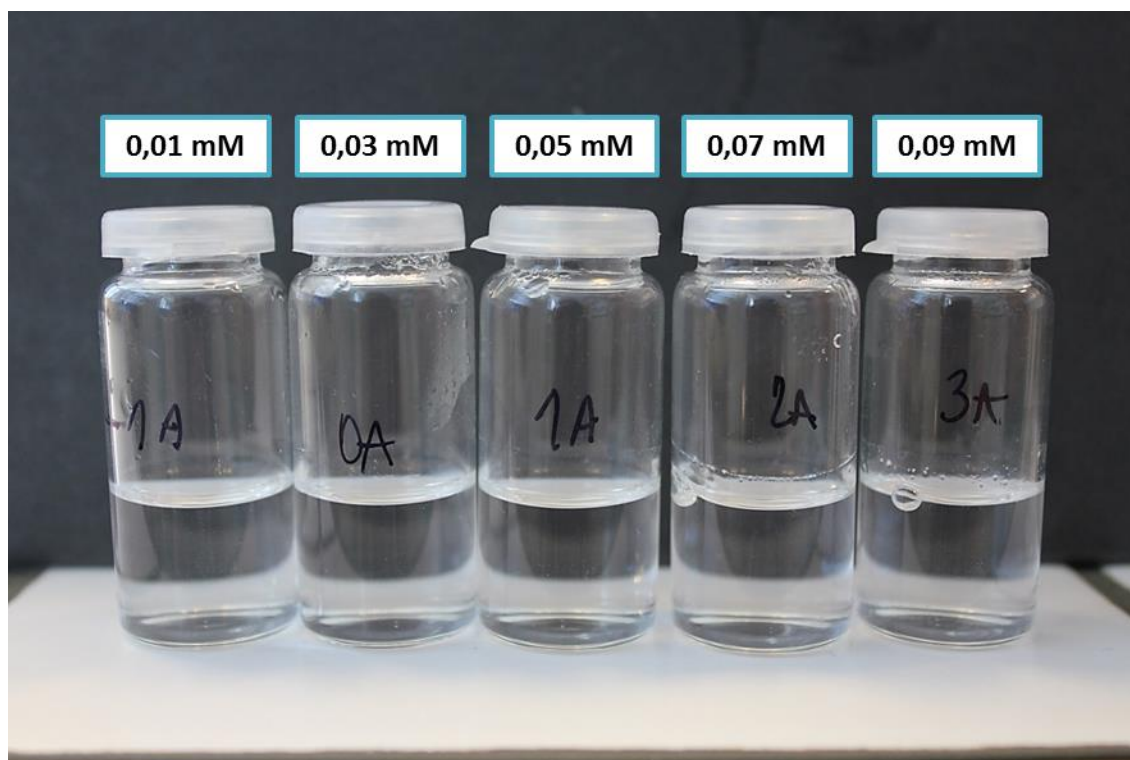
XVI. Setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2016

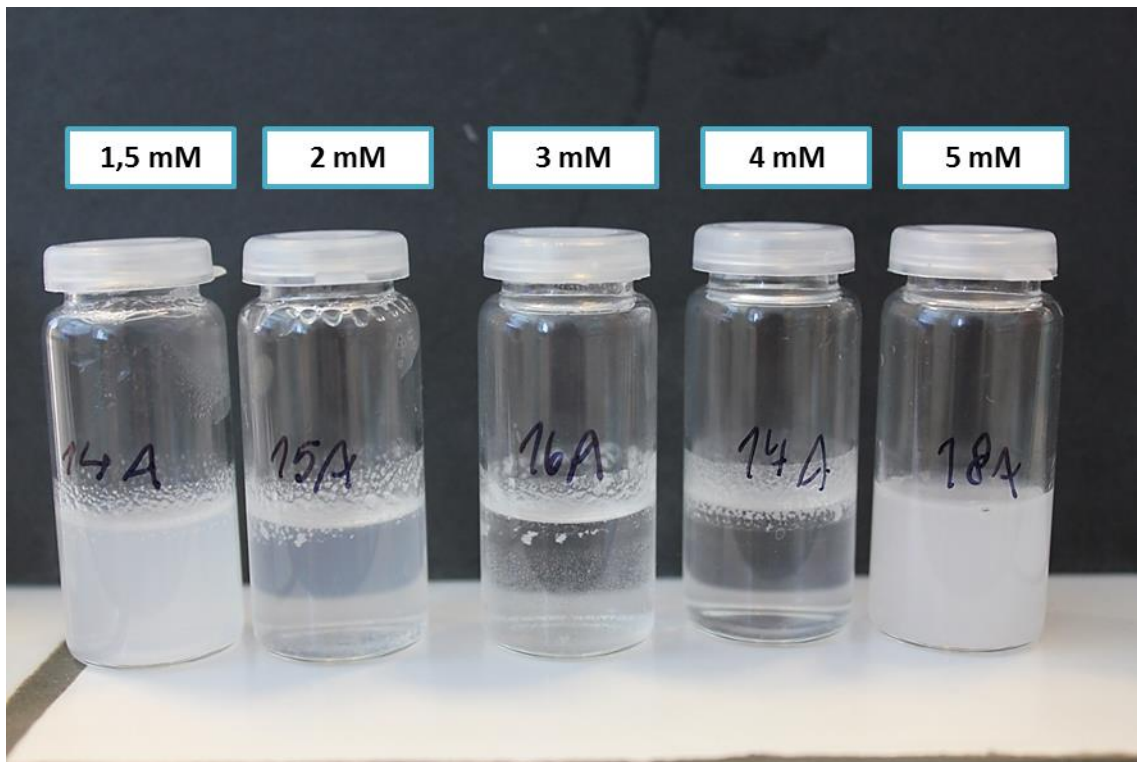
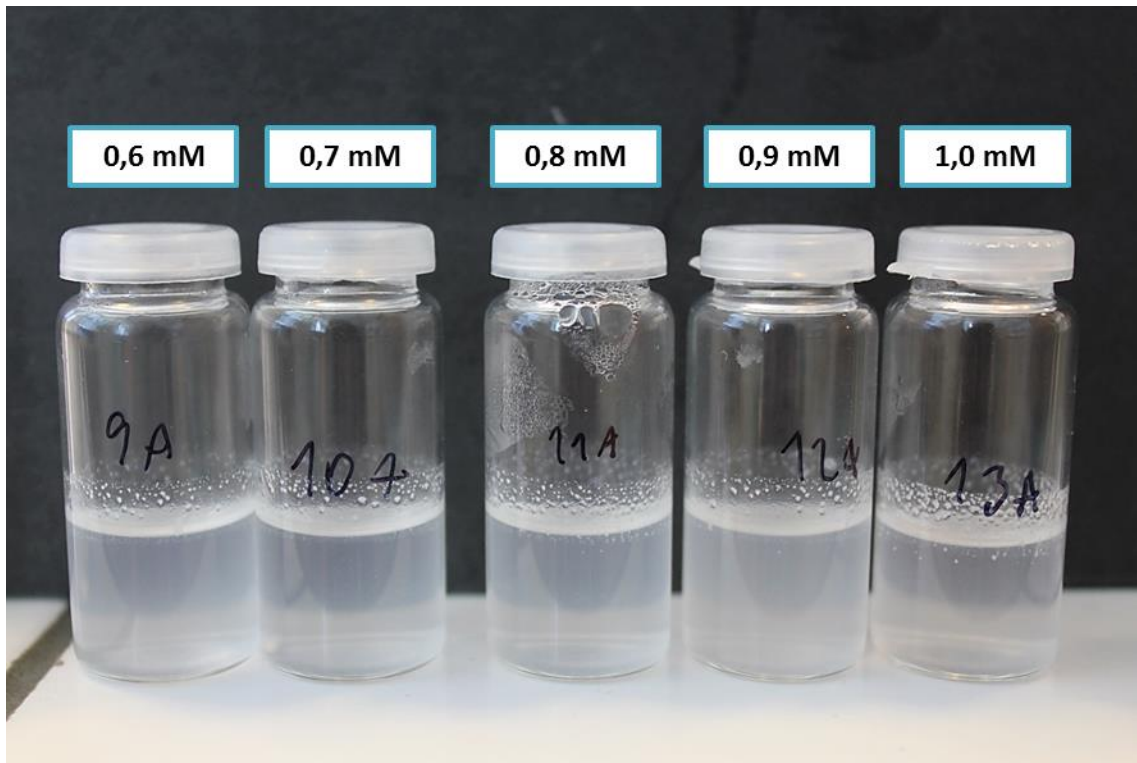
20th European Symposium on Polymer Spectroscopy (Drážďany, Německo) 2016

8th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2016

## 14 PŘÍLOHY

**Příloha č. 1: Fotografie koncentrační řady Septonexu obsahující hyaluronan ( $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , 100 kDa)**





## Příloha č. 2: Tabulky shrnující turbidimetrické experimenty

Tab. P1: Rozsah poměrů T/D během turbidimetrické titrace

HyA c (g·l <sup>-1</sup> )	počáteční c tenzidu (mmol·l <sup>-1</sup> )				
	3	5	7	10	20
<b>0,05</b>	3 000–8,2	5 000–13,7	7 000–19,0	10 000–27,0	20 000–55,0
<b>0,1</b>	1 500–4,1	2 500–6,8	3 500–9,6	5 000–13,7	10 000–27,0
<b>0,3</b>	500–1,4	840–2,3	1 170–3,2	1 670–4,6	3 340–9,1
<b>0,5</b>	300–0,8	500–1,4	702–1,9	1 000–2,7	2 000–5,5
<b>1,0</b>	150–0,4	250–0,7	350–1,0	500–1,4	1 000–2,7

Tab. P2: Shrnutí výsledků turbidimetrických titrací s vizuálním pozorováním systémů CTAB-hyaluronan. Hodnoty v závorkách vyjadřují poměr T/D, při kterém docházelo k výraznému nárůstu hodnot absorbance.

HyA		počáteční koncentrace CTAB ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )				
c ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$M_w$ (kDa)	3	5	7	10	20
0,05	100	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
	1 500	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
0,1	100	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
	1 500	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
0,3	15	zlom (3,2)	zlom (3,5)	×	×	×
	100	zlom (2,4)	zlom (2,0)	×	čiré	čiré
	1 500	zlom (2,0)	postupný zákal	×	prudký zákal	postupný zákal
0,5	15	zlom (2,8)	zlom (2,8)	×	×	×
	100	zlom (2,0)	zlom (1,7)	×	čiré	čiré
	1 500	postupný zákal	postupný zákal	×	prudký zákal	prudký zákal
1,0	15	zlom (3,2)	zlom (3,0)	×	×	×
	100	zlom (2,2)	postupný zákal	postupný zákal	postupný zákal	postupný zákal
	1 500	postupný zákal	postupný zákal	postupný zákal	prudký zákal	prudký zákal

Tab. P3: Shrnutí výsledků turbidimetrických titrací s vizuálním pozorováním systémů Septonex-hyaluronan. Hodnoty v závorkách vyjadřují poměr T/D, při kterém docházelo k výraznému nárůstu hodnot absorbance.

HyA		počáteční koncentrace Septonexu ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )				
$c$ ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$M_w$ (kDa)	3	5	7	10	20
0,05	100	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
	1 500	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
0,1	100	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
	1 500	čiré	čiré	čiré	čiré	čiré
0,3	15	zlom (1,8)	zlom (2,4)	×	×	×
	100	zlom (2,1)	zlom (2,0)	×	čiré	čiré
	1 500	postupný zákal	postupný zákal	×	postupný zákal	postupný zákal
0,5	15	zlom (2,3)	zlom (2,9)	×	×	×
	100	zlom (1,9)	zlom (2,5)	×	čiré	čiré
	1 500	postupný zákal	postupný zákal	×	postupný zákal	postupný zákal
1,0	15	zlom (3,6)	zlom (3,0)	×	×	×
	100	zlom (4,0)	zlom (2,5)	postupný zákal	postupný zákal	postupný zákal
	1 500	postupný zákal	postupný zákal	prudký zákal	prudký zákal	prudký zákal



**Příloha č. 3: Manuscript článku pro impaktovaný časopis (peer-review)**

# Interactions of Hyaluronan with Oppositely Charged Surfactants in Very Diluted Solutions in Water

*Tereza Pilgrová, Tereza Venerová, Filip Mravec, and Miloslav Pekař\**

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00, Brno, Czech Republic

\*Corresponding author. Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic. E-mail: [pekar@fch.vut.cz](mailto:pekar@fch.vut.cz).  
Phone: +420-54114 9330

## ABSTRACT

The phase behavior of aqueous systems containing hyaluronan, at concentrations between 2 to 100 mg/L, and an oppositely charged surfactant was investigated. A fluorescence probe technique revealed the formation of micellar structures on the hyaluronan in homogeneous systems well below the surfactant standard, critical, micellar concentration. Moreover, regions of gel-phase separation were revealed. A detailed phase diagram was, thus, constructed in the very diluted region and the hyaluronan concentration was found to be the main parameter controlling the phase behavior, in contrast to the charge ratio. The stability of hyaluronan-surfactant aggregates in the homogeneous systems while in storage at 4 °C (up to three months), against dilution, salt addition and on heating-cooling (between 10 and 50 °C) was also investigated. The aggregates

were stable while in storage or upon increasing and decreasing the temperature. The dilution of hyaluronan-surfactant complexes or the addition of 0.15 M NaCl led to their disintegration. Finally, systems prepared in a 0.15 M NaCl solution showed that interactions are suppressed and no aggregation below the standard critical micellar concentration was observed.

KEYWORDS: hyaluronan; interactions; surfactants

## 1. INTRODUCTION

Hyaluronan is a naturally occurring polysaccharide formed by repeating disaccharide units composed of D-glucuronate and N-acetyl-D-glucosamine residues linked by  $\beta(1\rightarrow4)$  and  $\beta(1\rightarrow3)$  bonds, which are connected to unbranched chains. The name hyaluronan commonly denotes a sodium salt of hyaluronic acid which is the form that occurs in various living organisms, including human bodies. Hyaluronan is a principal component of the extracellular matrix and plays important roles in lubrication, water sorption, water retention, and a number of cellular functions, such as attachment, migration, and proliferation. In the human body, hyaluronan is found mainly in connective tissues, such as the vitreous, the umbilical cord, joint fluid, etc. [1]. Hyaluronan is, therefore, an attractive building block for preparing new biocompatible and biodegradable materials that could find applications in drug delivery, tissue engineering, viscosupplementation or cosmetics [2-5].

In an aqueous solution, the carboxyl group on hyaluronan is in a dissociated form giving, theoretically, each repeating unit a negative charge, consequently, hyaluronan can be generally described as a negatively charged polyelectrolyte. Interactions between polyelectrolytes and an oppositely charged surfactant are an area of vital scientific research. This is due to the theoretical

significance of the understanding electrostatic and other (e.g., hydrophobic or excluded volume) interactions between charged polymers and low molecular counter-partners and also due to practical applications of polyelectrolyte-surfactant colloidal systems [6-9]. For instance, when prepared from biocompatible polymers, they can find applications in pharmaceutical and medical industries. They can stabilize encapsulated proteins or may be prepared as materials responsive to external stimuli [10]. Other application fields include detergency, the modification of rheological properties, or paints [11]. Also, their surface (interfacial) effects are important [12].

Hyaluronan-surfactant interactions were the subject of several previous studies. Perhaps the most detailed study was published in a series of papers by Swedish researchers [13-16] who investigated the phase behavior of systems containing water, hyaluronan, alkyl trimethylammonium bromides (a tetradecyl derivative was the most studied type) and salt (mostly NaBr). The binding of the surfactant to the hyaluronan was detected for surfactants with an alkyl chain consisting of at least ten carbon atoms. A ternary phase diagram of tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB)-hyaluronan (300 or 240 kDa)-water was constructed in the ref. [14]. It consisted of a droplet-shaped two-phase region emerging from the water apex of the triangular diagram and entirely enclosed by a one-phase area. The diagram shape demonstrated marked dissymmetry – for example, concentrated surfactant solutions almost immediately phase-separated upon the addition of hyaluronan in contrast to systems with high hyaluronan concentrations in which a rather large amount of surfactant could be added without phase separation. The effect of the surfactant alkyl chain length and the hyaluronan molecular weight was investigated in the ref. [17]. Hyaluronans of molecular weights of 250, 90, 60, and 23 kDa (weight average) were used. A decrease in the molecular weight resulted in a slight shift in position of the two-phase region while its size remained almost unaffected. This size was much more sensitive to the alkyl chain length of the surfactant – the longer the chain, the larger the

size. Due to the prevailing electrostatic nature of the hyaluronan-cationic surfactant interactions, the phase behavior is affected by the presence of salt also. The effect of sodium bromide on the TTAB-hyaluronan system was described in the paper by Thalberg et al. [18]. The addition of low concentrations of NaBr reduced the size of the two-phase region of the phase diagram and this region disappeared at 250 mM NaBr. Another type of phase separation was observed with high NaBr concentrations (at and above 500 mM). Generally, oppositely charged polyelectrolyte-surfactant systems are characterized by association without added electrolyte, miscibility at intermediate electrolyte concentration and segregative phase separation at high ionic strength [7].

Fukada et al. [19] investigated the interaction between hyaluronan and decyltrimethylammonium bromide by rheological methods. Also, they presented a part of the phase diagram in a hyaluronan concentration region below 10 g/L and a surfactant concentration below 1 mol/L. The phase separation region was indicated when the surfactant concentration was between 0.03 and 0.35 mol/L and the hyaluronan concentration was above ca 0.05 g/L. Eventually, the authors focused their study on the isotropic region with a large surfactant excess.

In the referred experiments, concentrated solutions of hyaluronan and surfactants were usually investigated. Our preliminary fluorescence probe study of similar systems prepared in water did not reveal dependencies of fluorescence indices on the surfactant concentration, which are typical for the formation of micellar aggregates on polyelectrolyte chains, prior to the phase separation. In other words, the fluorescence data did not indicate the formation of hyaluronan-micelle aggregates in isotropic, clear solutions, which would occur well below the critical micellar concentration of a pure surfactant. From the previous studies, only ref. [20] reports on the solubilization of the fluorescence probe (pyrene), but in a single system of a high surfactant excess. Actually, our work in this area was initiated by an attempt of a hyaluronan producer to get hyaluronan-decorated micelles and test their applicability as delivery systems for hydrophobic

substances. Therefore, we focused on interactions in a dilute (with respect to hyaluronan), and clear solutions that have not been directly investigated thus far. Some diluted solutions were mentioned by Fukada et al. [19] but they eventually studied rheological properties of concentrated systems only. Our main purpose was not to prepare delivery systems, but to investigate the diluted region for hyaluronan-surfactant interactions and for stability properties of the hyaluronan-micelle aggregates. In this study, we revealed that the phase behavior in diluted systems is not as simple as could be expected from previous studies.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. Materials

Hyaluronan (a sodium salt of hyaluronic acid; HyA) of several chain lengths were purchased from Contipro, Ltd., Czech Republic. Here they are denoted as low (LMW, 75-100 kDa), medium (MMW, 650-750 kDa) and high (HMW, 1400-2000 kDa) molecular weight hyaluronan (the values in parentheses give the range of the weight of the averaged molecular weights of the used batches, determined by the producer using the SEC-MALLS technique). Cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic and carbethopendecinium bromide (Septonex) was purchased from GBNchem, Czech Republic. The surfactants were of the best available quality and used as received without further purification.

Stock solutions of hyaluronan and surfactants were prepared in deionized water, in a phosphate buffer solution or in a model physiological solution (0.15 M NaCl).

The fluorescence probe pyrene (Fluka, purity  $\geq 99.0$  %; Sigma Aldrich, Czech Republic) was used for the fluorescence measurements. The stock solution of the fluorescence probe was prepared in a volatile solvent (acetone). An appropriate amount of the stock solution was added

to a glass vial and acetone was evaporated under reduced pressure to obtain the final concentration of pyrene in the samples equal to  $10^{-7}$  M. Subsequently, samples of the required composition and solvent were prepared in these vials by mixing corresponding volumes of hyaluronan and surfactant solutions. All samples were stirred for 24 hours, at least, at laboratory temperature before the acquisition of their fluorescence spectra. In this way, series of samples were prepared with constant hyaluronan and increasing surfactant concentrations.

Samples with varying surfactant concentration and no hyaluronan were prepared by simple dilution of the surfactant stock solution of the concentration about ten times higher than the critical micelle concentration.

## 2.2. Methods

The aggregation and solubilization properties were studied by means of pyrene as the fluorescence probe. The fluorescence emission spectra were recorded on a FLUOROLOG (Horiba Scientific, France) fluorescence spectrometer. For the emission spectra, recording the excitation wavelength was set at 336 nm and the emission scan was acquired in the range from 360 to 530 nm. In the excitation measurements, the emission wavelength was set at 392 nm and the excitation scan was acquired in the range from 310 to 340 nm.

Pyrene experiments were evaluated by plotting the fluorescence intensity ratio of the first and third vibronic peaks from the emission scan at 373 and 383 nm, respectively (EmPI – the pyrene emission polarity index), against the surfactant concentration. The pyrene polarity index is the reflection of the polarity in the vicinity of the pyrene environment and it is used to detect the localization of pyrene in the system. A typical sigmoidal curve was obtained indicating the formation of nonpolar domains (micelles with hydrophobic cores) solubilizing pyrene molecules. Ideally, a sharp decrease would be observed at the critical aggregation or micellar concentration.

Curves were fitted by the Boltzmann model and the concentration at the inflex point can be considered as the critical micelle (or critical aggregation) concentration.

The Boltzmann model equation is given by:

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

where the variable  $y$  corresponds to the EmPI value, the independent variable ( $x$ ) is the total concentration of the surfactant,  $A_1$  and  $A_2$  are the upper and lower limits of the sigmoid, respectively,  $x_0$  is the center of the sigmoid, and  $\Delta x$  is directly related to the independent variable range, where the abrupt change of the dependent variable occurs.

Thus, from the Boltzmann equation, the width of the concentration interval in which the sharp intensity decrease occurred can be obtained. This interval spreads from the onset up to the offset of the aggregates (micelles) formation, i.e., to the concentration range in which aggregates capable of pyrene solubilization are progressively formed.

The pyrene experiments were also evaluated by the ratio of fluorescence intensities at 470 nm, which corresponds to the excimer emission maximum, and the first vibronic peak (at 373 nm). This ratio is referred to as the Ex:Mo. It is an indicator of the probability of the excimer formation in the system and reflects the accumulation of pyrene molecules in hydrophobic domains.

In addition, the pyrene experiments were evaluated by the ratio of fluorescence intensities at 333 and 338 nm of the excitation spectra also. This ratio is called the pyrene excitation polarity index (ExPI) and it is the reflection of the polarity in the vicinity of the pyrene environment. The dependency of the ExPI on the surfactant concentration typically has a sigmoidal shape and can be fitted to the Boltzmann model also.



The stability of the hyaluronan-surfactant systems under various conditions like storage stability, response to temperature changes, addition of electrolyte and dilution effects were investigated using fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, standard measurement procedure). The hyaluronan-surfactant systems for the stability studies contained the final hyaluronan concentration of 15 mg/L and the final concentration of the surfactant of 0.05 or 0.07 mM, which correspond to the area of the formation of clear systems containing hyaluronan-micelle aggregates. The hyaluronan of two molecular weights (LMW and HMW) was used in this study. In the case of storage stability experiments, the tested system was measured every week over one month. All samples were stored at 4-6 °C and equilibrated to the laboratory temperature before the measurement. In the case of the study of the effect of increased ionic strength, 121 µl of the saturated solution of sodium chloride (6.2 mol/L) was added to the sample, so that the final concentration of sodium chloride was 0.15 mol/L and the sample volume remained almost unchanged (the dilution factor about 0.98). Temperature stability was studied in the temperature range of 10–50 °C. The dilution stability was realized by adding hyaluronan solution (15 mg/l) to the clear hyaluronan-surfactant system to obtain ten times lower surfactant concentration.

All measurements were performed in triplicate at least. The error bars in the figures represent the standard deviations.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 CMC of CTAB and Septonex

The critical micelle concentrations of CTAB and Septonex were first determined using the pyrene fluorescence spectroscopy method. The concentration dependency of the EmPI was fitted to the Boltzmann model and the concentration at the inflex point was considered as the critical micelle

concentration (CMC). The effect of ionic environments on the CMC was studied using a phosphate buffer (pH=7.0) and an NaCl solution (0.15 M). The results are shown in Table 1, which also shows good agreement with published data.

**Table 1.** Critical micelle concentrations determined from the pyrene emission polarity index (25 °C)

	CMC (mM)			
	CTAB		Septonex	
	this work	published value	this work	published value
water	0.94±0.01	0.89[21]; 0.91[22]; 0.92[23]; 0.96[24]	0.75±0.02	0.81[27]; 0.78[28]; 0.77[29]
phosphate buffer	0.086±0.004	–	–	–
0.15 M NaCl	0.062±0.002	0.062[25]; 0.07[26]	0.078±0.002	0.11[29]*

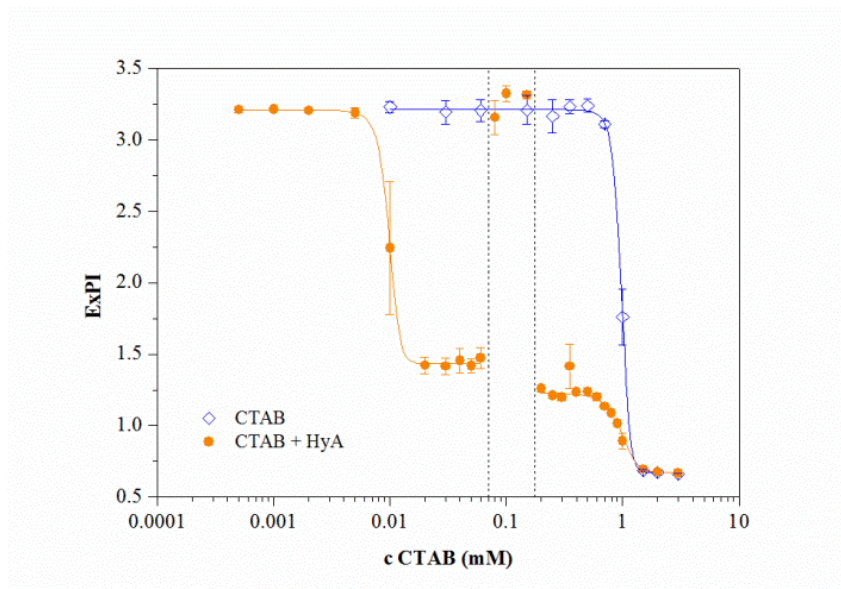
\*0.1 M NaCl

### 3.2 Interactions with CTAB in water – concentration effect of hyaluronan

Preliminary experiments were performed to find the reasonable (dilute) concentration region of hyaluronan, where the formation of surfactant aggregates could be detected at no phase separation (no formation of cloudiness or precipitates) upon its mixing with CTAB. The experiments showed that the suitable region lies in the range of micrograms or tens of micrograms per liter. For the first time in hyaluronan-containing systems, “double” S-curves (see below) could be measured with the pyrene method at the hyaluronan concentration above about 2 mg/L, in contrast to previous studies with higher hyaluronan concentrations. More detailed experiments in the selected concentration region (2–100 mg/L) followed and revealed a more complex behavior; their results are reported below.

The presence of hyaluronan at the constant concentration of 2 mg/L had an insignificant effect on the “aggregation curve” of CTAB, i.e., the dependence of ExPI or EmPI on the surfactant concentration. Only a very minor effect on the standard critical micellar concentration was observed – in the presence of hyaluronan, it was about 0.8 mM as detected from the inflex point of the ExPI-concentration dependence and the maximum on the Ex:Mo-concentration curve. Thus, only a similar effect to that of the salt addition was observed. In this case, the pyrene probe method did not reveal the formation of the CTAB micelles, below its standard critical micellar concentration, induced by the presence of hyaluronan. This can be caused by the long-range electrostatic interactions between the hyaluronan polyions and by the related hydrolysis of the hyaluronan carboxyl groups – these effects become important in dilute polyelectrolyte solutions with no added salt [30, 31] and lead to decreased charge density on the hyaluronan chain.

Increasing the hyaluronan concentration to 5 mg/L, the “double” S-curve, mentioned above, was observed, clearly indicating a surfactant aggregation well below its standard critical micellar concentration (Figure 1). At surfactant concentrations lower than about 0.005 mM and 0.05 mM, the curves measured for pure CTAB and for CTAB in the presence of hyaluronan, respectively, coincide, indicating the presence of no aggregates which could solubilize a hydrophobic fluorescence probe in their interior, in both cases. The first sharp decrease of ExPI in the presence of the hyaluronan and CTAB concentration of about 0.005-0.02 mM characterizes the polymer-induced aggregation of the surfactant and it is this interval where the critical aggregation concentration should be located (this is taken as the inflex point within this interval).



**Figure 1.** Effect of hyaluronan addition (MMW, 5 mg/L) on the aggregation behavior of CTAB in water; the region between the dashed lines represents the gel phase separation

When the surfactant concentration in the system increases, surfactant molecules are bound on the polymer chain. The local concentration of the surfactant on the polymer chains increases because of the electrostatic binding of the positively charged surfactant head on the negatively charged dissociated carboxylic group of hyaluronan. Hyaluronan reduces the mobility of the surfactant molecules in a solution, the surfactant molecules aggregate at a lower concentration than in a pure solution and induced micelle-like aggregates are created on the polymer chain. Pyrene molecules are solubilized in these aggregates and ExPI decreases.

The decrease of ExPI observed both in the pure surfactant solution and in the presence of hyaluronan around the CTAB concentration of 0.9 mM corresponds to the standard micellization of the free surfactant molecules at normal critical micellar concentration.

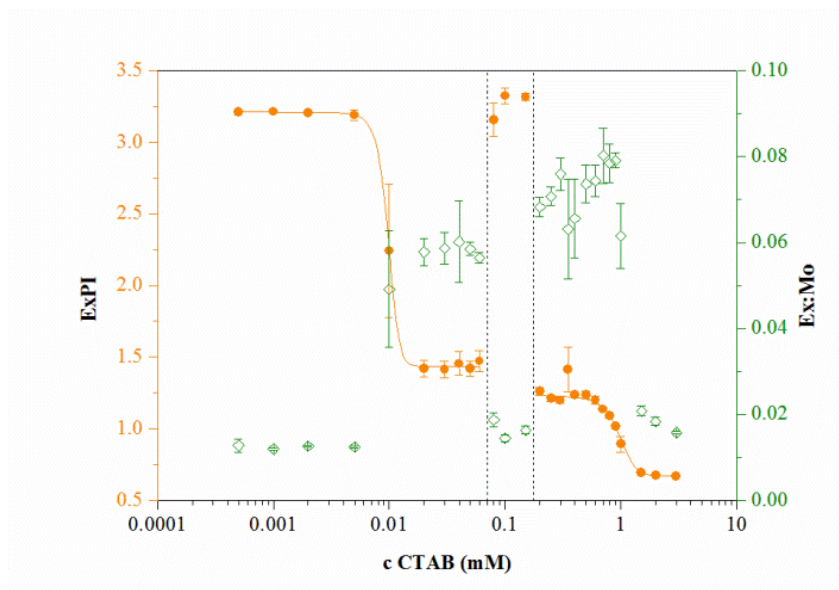
It should be noted that the pyrene fluorescence intensity (and the corresponding values of ExPI) measured in the aggregation regions is generally composed of signals coming from different

environments, basically from the pyrene molecules dissolved in water and from those solubilized in the aggregates.

Figure 1 also shows an unexpected finding – a rather strange increase of ExPI up to the values measured in pre-micellar regions, in a concentration interval centered around 0.1 mM. This means a sudden loss of solubilization abilities of the system. The cause was revealed only after a change from brown to clear vials and a careful inspection of their content. In the reported concentration region, a thin rim of gelled material was observed on the walls of the vials along the liquid surface. Using a UV lamp, intensive pyrene fluorescence was observed from the gel phase (see Figure SF1 in the Supplementary material). Thus, most of the pyrene molecules were collected in micelles participating in the formation of a tiny amount of the gel phase. Only the free pyrene molecules remained in the liquid phase which was actually transferred into fluorescence cuvettes and only their fluorescence from the aqueous environment was measured in that concentration interval. The gel-like phase separation can be viewed as a specific example of complex coacervation known for systems containing two oppositely charged macroions [9]. Complex coacervation should occur subsequent to the binding of macromolecular ions on micellar colloids which is consistent with our findings. The separated hyaluronan-surfactant complexes were not formed when an excess of the surfactant was present which also accords with previous findings [7, 9, 14, 18].

The conclusions made on the basis of the polarity index were further confirmed by the dependence of Ex:Mo ratio on the surfactant concentration (Figure 2). The ratio starts to increase as micelles are formed and the probability of the formation of the excited dimer between the pyrene molecules solubilized inside the micelles increases. Induced micelles, i.e., micelles bound on the polyelectrolyte chain, are reported to be smaller than free micelles [32], which contributes to the increased probability of excimer formation. In the region of gel-phase separation, a sharp

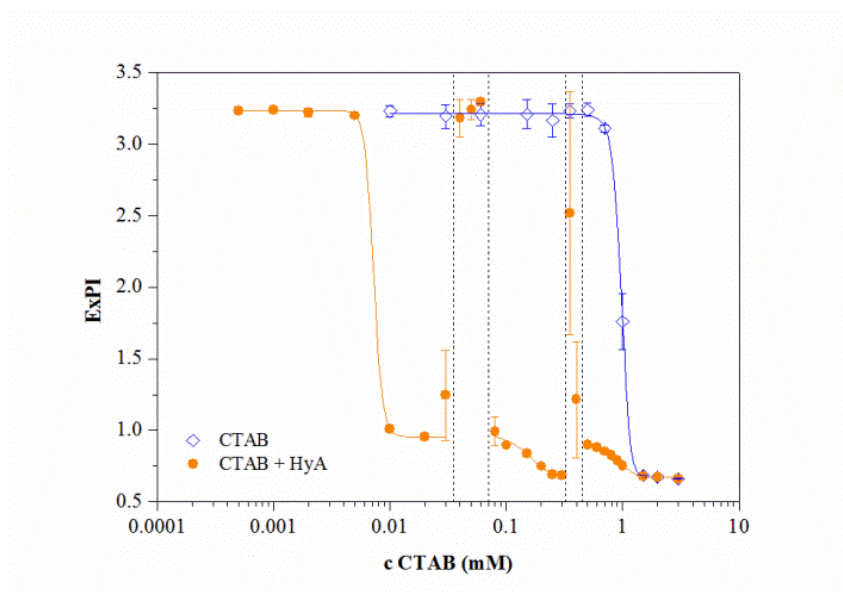
decrease of Ex:Mo indicates the presence of (only) free pyrene monomers in the measured solution – pyrene molecules remaining in the supernatant are not solubilized in the hydrophobic environment and the probability of excimer formation is very low there. When the gel phase disappears, the Ex:Mo ratio increases due to the presence of the induced micellar structures in the homogeneous colloidal solution. Another decrease of this ratio above the standard critical micellar concentration is attributed to the progressive distribution of pyrene molecules in the increasing number of (free) micelles, which decreases the probability of finding more than one pyrene molecule in a micelle.



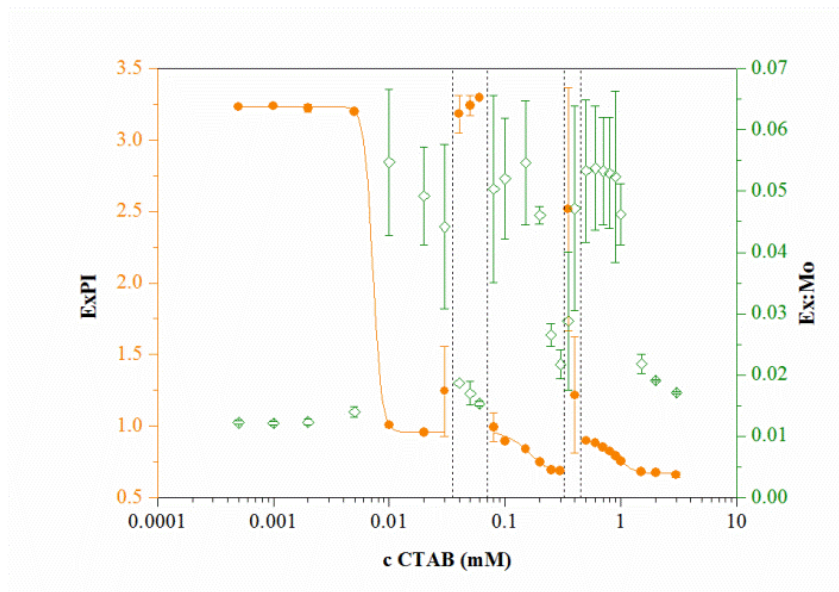
**Figure 2.** A comparison of ExPI and Ex:Mo dependencies for samples with CTAB and MMW hyaluronan at a concentration of 5 mg/L

Similar behavior was observed for systems with an increased hyaluronan concentration also, i.e., 15, 30, 50, and 100 mg/L, except that two concentration intervals of gel-phase separation were found. The second interval was found at surfactant concentrations higher than those of the first interval, but still lower than the standard critical micellar concentration of the pure

surfactant; an example can be seen in Figure 3. The second interval is narrower and its existence was, in fact, indicated in the system with hyaluronan concentration of 5 mg/L also, cf. the point of ExPI corresponding to the CTAB concentration of 0.35 mM in Figure 1. The values of both the ExPI and Ex:Mo ratio (Figure 4) in the second interval are more scattered upon replicated measurements than in any other part of measured dependencies. This probably indicates the formation of some metastable structures in the second interval in which the distribution of pyrene between the aqueous and hydrophobic environments is not easily exactly reproducible in the replicated measurements.



**Figure 3.** Effect of hyaluronan addition (MMW, 15 mg/L) on the aggregation behavior of CTAB in water; the regions between the dashed lines represent the gel phase separation



**Figure 4.** A comparison of ExPI and Ex:Mo dependencies for samples with CTAB and MMW hyaluronan at a concentration of 15 mg/L

The ExPI gradually decreases behind the second region of the gel-phase separation – here, the surfactant concentration becomes closer and closer to the normal critical micellar concentration and free micelles are supposed to be formed. The comparison of the two curves is shown in Figure 3, it is shown that in this region, in the presence of hyaluronan, the formation of free micelles proceeds in a broader interval of surfactant concentration than in the case of the pure surfactant. A similar broadening was observed in a previous study on hyaluronan interactions with surfactants of a different ionic type in the presence of NaCl at a physiological concentration [25].

Table 2 collects charge ratios of hyaluronan:surfactant and their changes for all studied systems where the gel-phase separation was observed. The charge ratio was calculated taking the determined hyaluronan molecular weight into account and supposing the existence of one charge



on each surfactant molecule and one charge per hyaluronan basic dimeric unit (sodium form) with a molecular weight of 401.299 g/mol. It is clearly seen that the charge ratio need not be the controlling parameter, either for the critical aggregation concentration or for the phase separation in contrast to the situation found in more concentrated systems [6,7]. The critical aggregation concentration is located between the charge ratio values from 1.3 to 50 depending on the hyaluronan concentration; the value of the charge ratio corresponding to the critical aggregation concentration seems to increase with the increasing hyaluronan concentration. On the other hand, regardless of the hyaluronan concentration, the value of the critical aggregation concentration is located approximately around the same surfactant concentration value of 0.01 mM (specific values of the critical aggregation concentration are shown in Table 3). Thus, the hyaluronan concentration seems to be a much more important parameter for the induced micellar aggregation in (very) diluted hyaluronan solutions.

**Table 2.** Charge ratios; the blue lines separate sample concentrations between which the critical aggregation concentrations were determined; the values in italics indicate the phase separating samples. System with CTAB and MMW hyaluronan

$c_{\text{CTAB}}$ (mM)	Charge ratio				
	hyaluronan concentration (mg/L)				
	5	15	30	50	100
0.0005	25	75	150	249	498
0.001	12	37	75	125	249
0.002	6	19	37	62	125
0.005	2	7.5	15	25	50
0.01	1.25	3.7	7.5	12	25
0.02	0.62	1.9	3.7	6	12
0.03	0.42	1.2	2.5	4	8
0.04	0.31	<i>0.9</i>	1.9	3	6
0.05	0.25	<i>0.7</i>	1.5	2.5	5
0.06	0.21	<i>0.6</i>	1.2	2.1	4
0.08	<i>0.16</i>	0.47	0.9	1.6	3
0.1	<i>0.12</i>	0.37	0.7	1.2	2.5
0.15	<i>0.08</i>	0.25	<i>0.5</i>	<i>0.8</i>	1.7
0.2	0.06	0.19	<i>0.4</i>	<i>0.6</i>	1.2
0.25	0.05	0.15	0.3	<i>0.5</i>	1.0
0.3	0.042	0.12	0.25	0.42	0.8
0.35	<i>0.036</i>	<i>0.11</i>	<i>0.21</i>	<i>0.36</i>	<i>0.7</i>
0.4	0.031	<i>0.09</i>	<i>0.19</i>	<i>0.31</i>	<i>0.6</i>
0.5	0.025	0.07	0.15	<i>0.25</i>	<i>0.5</i>
0.6	0.021	0.06	0.12	0.21	<i>0.42</i>
0.7	0.018	0.05	0.11	0.18	0.36
0.8	0.016	0.047	0.09	0.16	0.31
0.9	0.014	0.042	0.08	0.14	0.28
1	0.012	0.037	0.07	0.12	0.25
1.5	0.008	0.025	0.05	0.08	0.17
2	0.006	0.019	0.04	0.06	0.12
3	0.004	0.012	0.02	0.04	0.08

**Table 3.** Boltzmann model parameters for systems with CTAB and MMW hyaluronan at different concentrations

HyA conc.		aggregation	micellization
without HyA	$A_1$	-	3.21±0.01
	$A_2$	-	0.67±0.01
	$R^2$	-	0.999
5 mg/L	$A_1$	3.21±0.01	1.24±0.01
	$A_2$	1.44±0.01	0.67±0.01
	$R^2$	0.999	0.998
15 mg/L	$A_1$	3.23±0.01	1.00±0.03
	$A_2$	0.96±0.01	0.68±0.03
	$R^2$	1	0.942
30 mg/L	$A_1$	3.26±0.03	1.32±0.35
	$A_2$	0.92±0.01	0.66±0.01
	$R^2$	0.999	0.990
50 mg/L	$A_1$	3.34±0.08	0.79±0.03
	$A_2$	0.84±0.01	0.65±0.01
	$R^2$	0.998	0.989
100 mg/L	$A_1$	3.24±0.02	0.79±0.03
	$A_2$	0.82±0.01	0.65±0.02
	$R^2$	1	0.991

Except for the lowest and highest hyaluronan concentrations, the first gel-phase separation occurs when the charge ratio decreased somewhat below 1 (viz. 0.4-0.9), i.e., when the surfactant concentration slightly exceeded the point of the charge equilibration. In the case of the lowest hyaluronan concentration, this occurs at a higher surfactant concentration still (i.e., lower charge

ratio), whereas at the highest hyaluronan concentration, this occurs at a lower surfactant concentration (higher charge ratio) already. The gel-phase evidently contains micelles, which should be considered as crosslinking points of the formed gel. The destabilization caused by the charge equilibration around the charge ratio of one proceeds via attaching, on average, one micelle to at least two hyaluronan chains, thus forming a crosslink. When the hyaluronan concentration is too low, this type of “bridging” is more difficult due to the increased distance between the encountered chains and needs a higher concentration of surfactant (micelles). On the other hand, at a sufficiently high polymer concentration, such “bridging” is more likely to occur even at a lower surfactant concentration.

The second gel-phase separation is found for a relatively broad interval of charge ratio ranging from 0.036 to 0.7. The corresponding surfactant concentration region is much narrower – from 0.35 to 0.6 mM – and particularly, the concentration of the starting point of the second gel-phase separation was always the same (0.35 mM). Thus, as in the case of critical aggregation concentration, it seems that a specific surfactant concentration is more substantial for the occurrence of the second gel-phase separation. Upon an increased hyaluronan concentration, an increased amount of the gel phase was observed – more biopolymer chains are available for the gel formation.

The values of ExPI provide some information about the hydrophobicity-hydrophilicity of the environment of the fluorescing pyrene molecules. The two parameters of the Boltzmann model equation giving the (limiting) ExPI values at the maximum and minimum of the corresponding S-curve are shown in Table 3. The parameter  $A_1$  and  $A_2$  reflect the situation before aggregation (micellization) and after its completion, respectively. Regardless of the hyaluronan concentration,  $A_1$  is around 3.2-3.3 in the region of the induced aggregation. This ExPI value corresponds to the pyrene fluorescence from the aqueous environment and its independence from the hyaluronan

concentration indicates that pyrene does not interact with it or with surfactant monomers before the onset of the aggregation and that there are no aggregates with a hydrophobic core in the system. The lowered value of  $A_2$  in the region of the induced aggregation is due to the pyrene solubilization in the hydrophobic core of the formed micellar structures. Its value decreases somewhat with the increasing hyaluronan concentration which is probably the result of the formation of a higher number of solubilizing aggregates on the higher number of hyaluronan chains in the system.

A similar dependence on hyaluronan concentration is observed for the values of the parameter  $A_1$  in the micellization region which brings information on the system before the free micelle formation. Its values are comparable to those of  $A_2$  in the aggregation region as expected. The value of  $A_2$  evaluated for the micellization region is independent to the hyaluronan concentration and corresponds to the values found for free micelles of the pure surfactant solution in water. This is in agreement with the supposed formation of free micelles in this region.

The effect of the molecular weight of hyaluronan on the aggregation of CTAB in water was studied. The concentration series of the surfactant with hyaluronan at a concentration of 15 mg/L and different molecular weights were prepared. When hyaluronan of different molecular weights was used, no significant changes were observed during the aggregation process and the curves of all the measured parameters had very similar shapes. This was confirmed by the fact that Boltzmann fits to these curves also, which resulted in very similar parameter values for all investigated hyaluronan molecular weights.

Finally, Table 4 summarizes the critical aggregation and micelle concentration values for the different hyaluronan concentrations as well as for the different hyaluronan molecular weights. These values were calculated as averages of the values obtained from the Boltzmann model equations for EmPI and ExPI dependencies. It can be seen that the critical aggregation

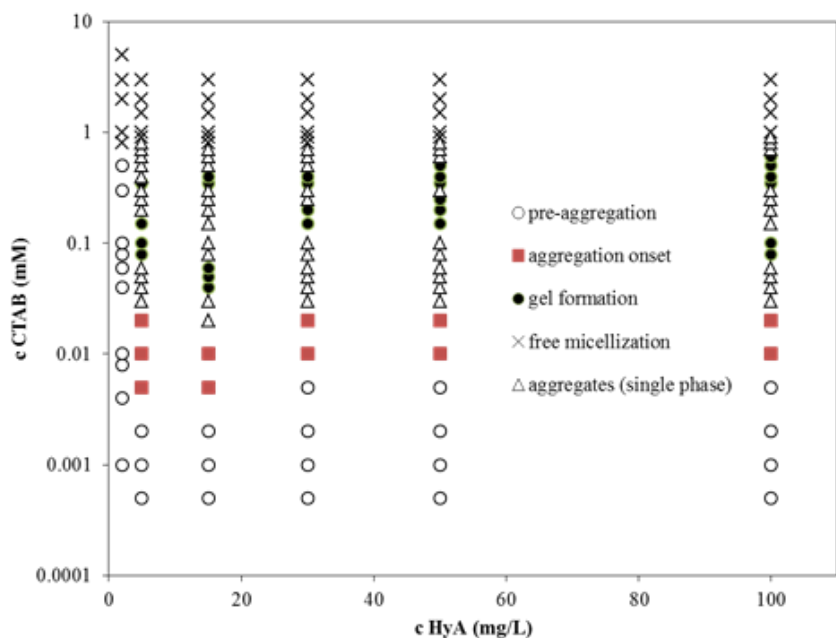
concentration values are about two orders of magnitude lower than the critical micelle concentration values. The hyaluronan molecular weight had no significant effect on the interactions in these systems.

**Table 4.** Critical aggregation (CAC) and micelle (CMC) concentration summary

$M_w$ HyA (kDa)	$c$ HyA (mg/L)	CAC (mM)	CMC (mM)
750	5	0.009±0.001	0.92±0.70
90	15	0.007±0.001	0.79±0.02
750	15	0.007±0.001	0.77±0.16
2000	15	0.008±0.001	0.74±0.13
750	30	0.014±0.001	0.74±0.08
750	50	0.014±0.001	0.81±0.15
750	100	0.009±0.001	0.97±0.01
water	-	-	0.98±0.01

Based on our results, the phase diagram of this system could be specified in the (very) diluted area. The diagrams published in refs. [14,17] are very crude in this domain and indicate a broad, single, two-phase region with a notice on the “larger uncertainty in this region”. Although the diagram published by Fukada et al. [19] gives more details (for decyltrimethylammonium bromide), it is still rather crude and does not report on the gel separation. An outline of the phase diagram constructed on the basis of our fluorescence measurements for the MMW hyaluronan system is shown in Figure 5 and includes, not only areas of macroscopic phase separations, but different states of aggregates formation also. The surfactant concentration is given in a logarithmic scale due to the broad range of the tested concentrations; a cut-out containing the low

surfactant concentrations in a linear scale can be seen in the Supplementary material (Figure SF2).

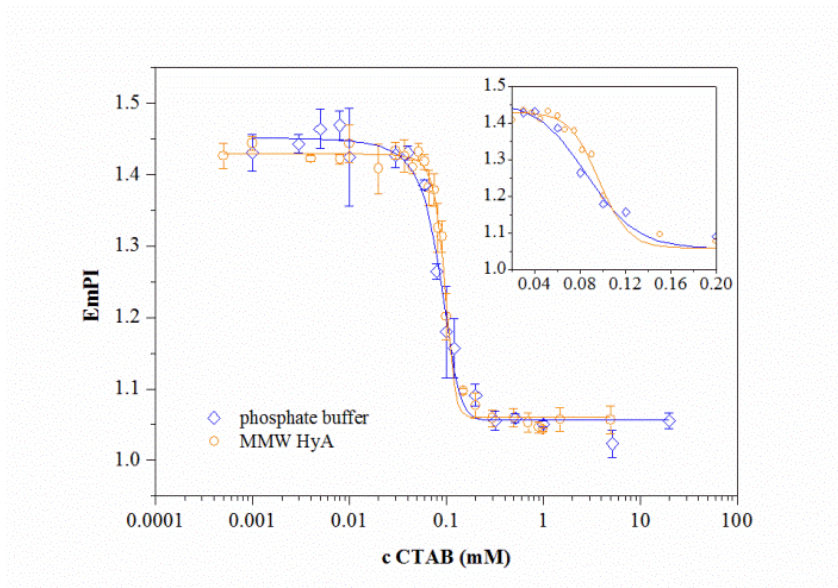


**Figure 5.** Outline of the phase diagram of the CTAB-hyaluronan (MMW) system in the diluted region

### 3.3. Salt effect on CTAB-hyaluronan interactions

The effect of ionic environment was studied with hyaluronan at all three different molecular weights and at the concentration of 5 mg/L. A phosphate buffer at  $\text{pH} = 7.0$  was used instead of water. In all cases, the dependencies of the ExPI or EmPI parameters on the surfactant concentration had a simple sigmoidal shape with the inflex point at around the same surfactant concentration. In other words, no formation of the induced micelles at concentrations below the critical micellar concentration of the pure surfactant was detected. Furthermore, no gel-phase separation was observed. An example of the experimental data is shown in Figure 6. The critical aggregation concentrations and the fitted parameters of the Boltzmann equation can be found in

the Supplementary material (Table ST1). Again, no significant effect of the hyaluronan molecular weight was found. The value of the  $A_2$  parameter of the fit with the Boltzmann equation was about 1.08 for all studied samples which indicates a similar polarity of the pyrene environment in all systems. A slightly more abrupt EmPI (or ExPI) decrease was observed in the presence of hyaluronan (see the inset in Figure 6) giving somewhat smaller values of the parameter  $\Delta x$ .



**Figure 6.** EmPI dependence on the surfactant concentration in the phosphate buffer without the addition of hyaluronan and with the addition of MMW hyaluronan at a concentration of 5 mg/L. The inset shows the aggregation region only, in a linear scale.

These observations can be explained in accordance with the published experience as a result of screening the electrostatic interactions between the surfactant and hyaluronan which are the main cause of the sub-micellar aggregation and the formation of the induced micelles, as well as the formation of the gel-phase. Increased ionic strength is known to lead to dissolution of complexes made by polyelectrolytes and oppositely charged colloids [9, 18].

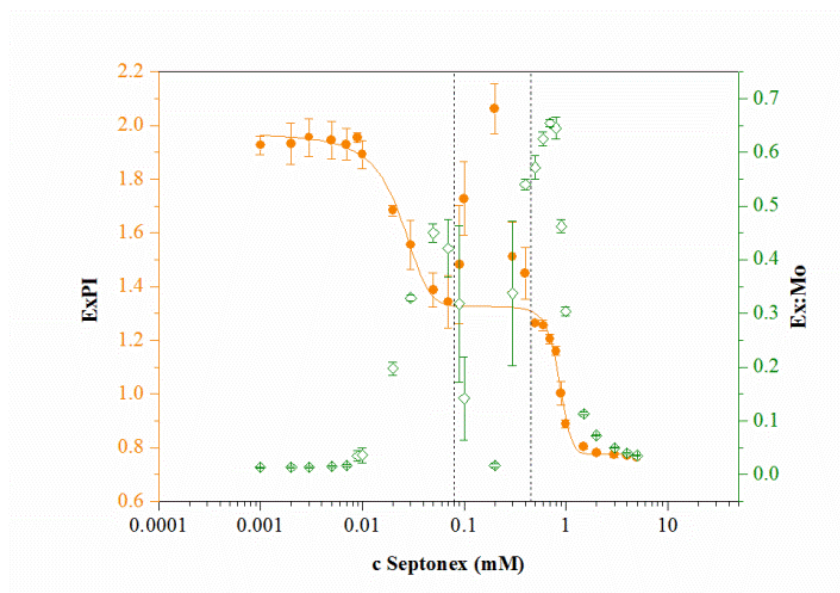


### 3.4. Septonex

In addition, the aggregation of hyaluronan with the Septonex surfactant was investigated. The purpose was to check the effect of small variations in the surfactant structure. Septonex differs from CTAB in the presence of an ethoxycarbonyl-group close to the trimethylammonium group and has a hydrophobic chain of fifteen carbon atoms. The principal difference is, thus, in the structure of the polar head. Hyaluronan of two molecular weights (LMW and HMW) at the concentration of 15 mg/L was selected for this study. Generally, no principal differences were found – “double” S-curves were also observed indicating the formation of the induced and free micelles. However, in contrast to CTAB, only one separation region of the gel-phase was observed, see Figure 7. This separation was observed in the surfactant concentration range from 0.07 to 0.6 mM, which is in a broader interval compared to CTAB. It seems that Septonex has a broader region in contrast to CTAB which had two narrower regions of the gel-phase separation in the approximate same concentration interval. At the same time, the region of the (induced) aggregation is broader and the first decrease of ExPI is less steep than in the case of CTAB. The critical aggregation and micelle concentration are slightly higher for Septonex (Table 5) compared to CTAB (Table 3), probably as a result of the more complex structure of the ethoxycarbonyl cation of Septonex.

**Table 5.** Critical aggregation (CAC) and micelle (CMC) concentrations and Boltzmann model parameters for Septonex-hyaluronan systems

		water	HyA LMW 15 mg/L	HyA HMW 15 mg/L
CAC; mM		-	0.022±0.001	0.024±0.001
CMC; mM		0.736±0.001	0.901±0.030	0.882±0.017
aggregation	$A_1$	-	1.96±0.01	2.34±0.02
	$A_2$	-	1.34±0.07	1.57±0.02
	$R^2$	-	0.98	0,99
micellization	$A_1$	1.98±0.01	1.27±0.03	1.48±0.03
	$A_2$	0.77±0.01	0.77±0.01	0.94±0.01
	$R^2$	0.99	0.98	0.99



**Figure 7.** The dependence of the ExPI and Ex:Mo parameters on the Septonex concentration in systems with LMW hyaluronan at a concentration of 15 mg/L

### 3.5. Stability of CTAB/Septonex–hyaluronan system

Due to the potential applications of hyaluronan-surfactant aggregates as delivery systems, a basic stability study was performed testing their storage stability and resistance to temperature changes, with the addition of an electrolyte and against dilution. The stability was checked by detecting changes in fluorescence probe characteristics and in particle sizes measured by dynamic light scattering.

The stability experiments were realized with a single hyaluronan concentration of 15 mg/L and two surfactant concentrations located behind the critical aggregation concentration in the homogeneous region, just before the gel-phase separation (0.02 and 0.03 mM in the case of CTAB, 0.05 and 0.07 mM in the case of Septonex). Hyaluronans of two molecular weights (LMW and HMW) were tested.

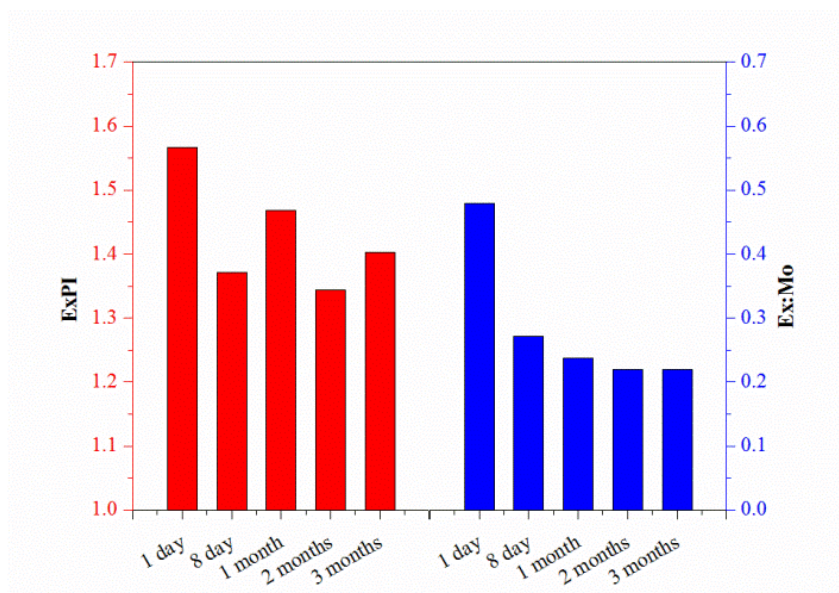
Generally, no significant differences in the stability between the CTAB and Septonex systems were found. The size distributions of both types of the systems before any temperature changes or composition modifications, were almost the same or very similar. Shifts of maximum of size distribution showed no significant trends which would depend on the surfactant. The fluorescence indices EmPI and ExPI indicated a similar polarity in both systems under the given conditions, whereas the Ex:Mo parameters were slightly lower for systems containing Septonex compared to the system with CTAB, probably due to various critical aggregation and critical micelle concentrations in the systems with CTAB and Septonex. Only the results obtained for the Septonex systems are discussed.

#### 3.5.1. Time stability

The pyrene polarity indices did not show changes pointing to disaggregation during the three months of storage at 4 °C; for example, see Figure 8. ExPI values of about 1.3 correspond to the

occurrence of the induced micelles in the systems after the critical aggregation concentration. This indicates the stability of the formed hydrophobic domains and their solubilization abilities. The excimer to monomer ratio decreased in time, especially after about one month of storage. This points to an uneven distribution of the solubilized pyrene molecules just after the preparation of the samples. During storage, pyrene is redistributed more evenly and, thereby, the probability of excimer formation is reduced. This can be viewed like some “ripening” of the system containing solubilized hydrophobes. All of the studied systems showed similar trends in the fluorescence parameters.

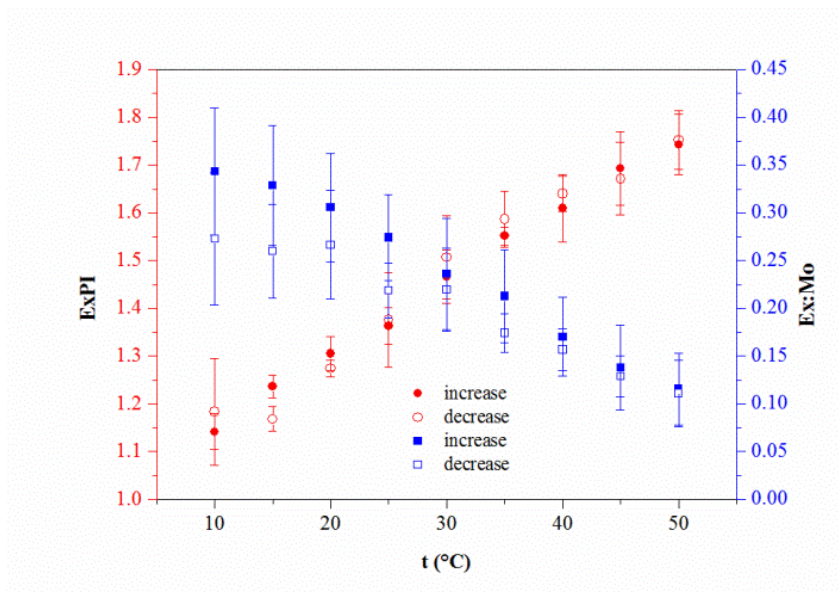
From the point of view of the particle size distribution, it was found that distributions changed only negligibly and systems remained monodisperse. Particle sizes were mostly in the range of 100–400 nm (see Figure SF3 in the Supplementary material).



**Figure 8.** Dependency of the ExPI and Ex:Mo parameters on the storage time for systems containing 0.05 mM of Septonex and 15 mg/L of HMW hyaluronan

### 3.5.2. Temperature stability

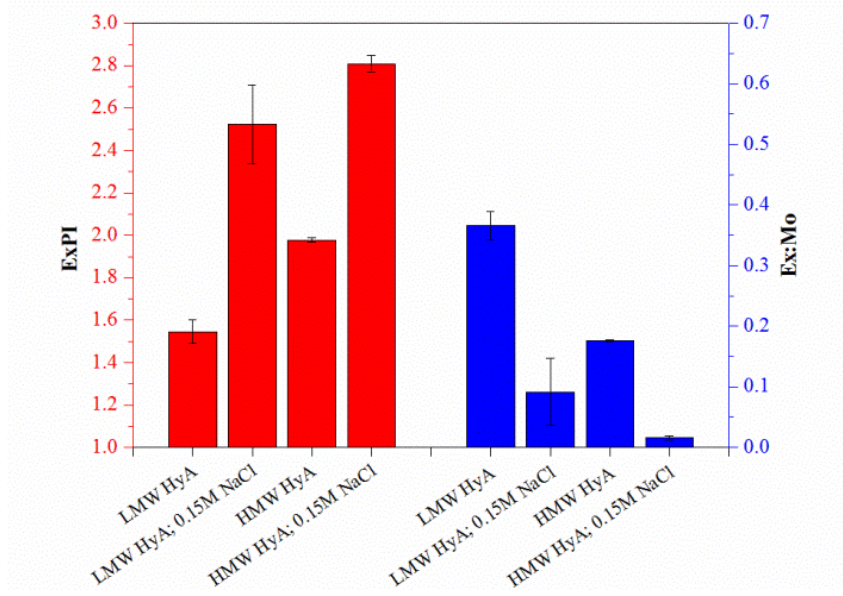
The polarity indices EmPI and ExPI slightly increased or were around constant values with the increasing temperature in the investigated range of 10–50 °C. The most significant change of polarity indices showed the system with the surfactant concentration of 0.05 mM in combination with LMW hyaluronan (Figure 9). The recorded polarity changes showed that the aggregate shell becomes less compact at a higher temperature, probably due to the increased mobility of the surfactant molecules, and enables water penetration closer to the hydrophobic inner core. The polarity indices values at high temperatures were not far from the situation where micelle aggregates are disintegrated and pyrene molecules emit from the aqueous environment. The Ex:Mo ratio decreased with the increased temperature corresponding to the decreased probability of excimer formation. This is, again, a result of pyrene redistribution also connected to the loosened aggregates structure. It should be noted that structural changes in the system are reversible, the fluorescence parameters approximately return to the original values after returning the temperature from 50 °C to 10 °C. The aggregates can be viewed as stable in a heating-cooling cycle.



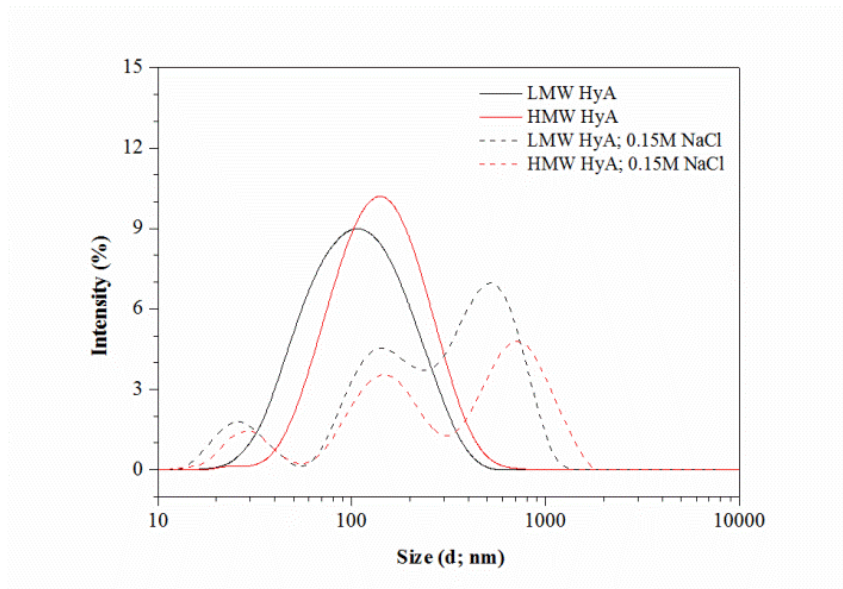
**Figure 9.** Dependency of the ExPI and Ex:Mo parameters on an increasing (full symbols) or decreasing (empty symbols) temperature for systems containing 0.05 mM of Septonex and 15 mg/L of LMW hyaluronan

### 3.5.3. Effect of ionic strength

As stated in section 3.3 above, the presence of a low molecular weight electrolyte in the system during the mixing of the hyaluronan and surfactant solutions had a profound effect on their mutual interactions. Here, the stability of the hyaluronan-surfactant aggregates prepared in pure water against the addition of NaCl at a physiological concentration was tested. The polarity indices showed significant increases after the addition of NaCl (remember the negligible volume change, i.e. dilution) indicating the disintegration of the aggregates in the system which corresponds to the EmPI and ExPI values of about 1.5 and 2.6, respectively. The Ex:Mo parameter decreased which corresponds to the structural changes in the system, which occurs as a result of the screening of the electrostatic attraction in the system after the NaCl addition (Figure 10). Structural changes showed up in the size distribution of the system too. In the case of an aqueous solution, the system was monodisperse and the particle sizes were in the range of 100–150 nm. After the NaCl addition (in the physiological solution), the system became polydisperse and the particle sizes were in the range from 30 nm to 2200 nm with three maxima (Figure 11).



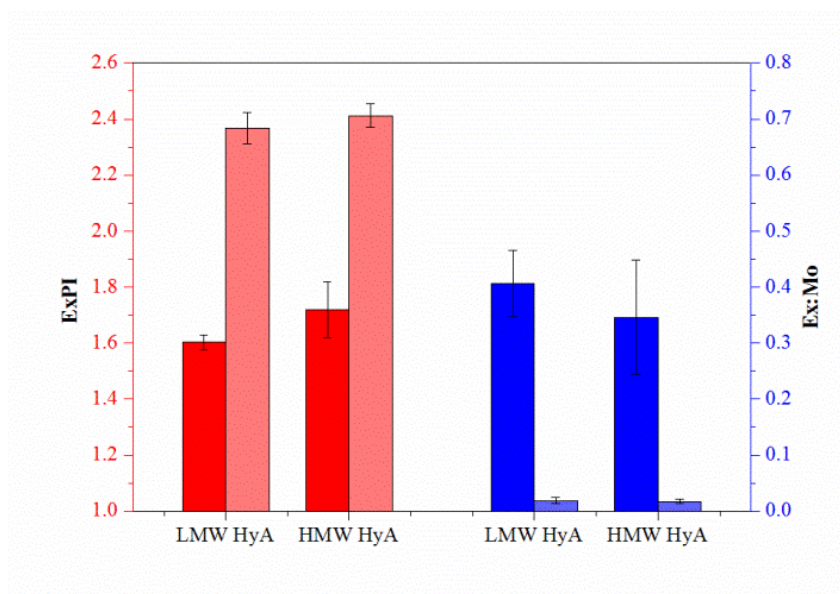
**Figure 10.** Polarity index of the ExPI and Ex:Mo ratio changes after the NaCl addition to the Septonex (0.05 mM)-hyaluronan (15 mg/L) system



**Figure 11.** Particle size distribution of the Septonex (0.05 mM)-hyaluronan (15 mg/L) system in water (solid line) and after the NaCl addition (dashed line)

### 3.5.4. Effect of dilution

After dilution by hyaluronan solution, the polarity indices increased and the probability of excimer formation (the Ex:Mo ratio) decreased significantly (Figure 12); the values of all fluorescence ratios roughly corresponded to the values found before the induced aggregates formation during the experiments discussed in section 3.4 above. These changes should be attributed to the disintegration of the aggregates in the system and demonstrate the reversibility of the aggregates formation. Consequently, the aggregates are not sufficiently stable to maintain a hydrophobic solute in their interior upon dilution. In comparison to the gel phase, which could not be dissolved in pure water, the electrostatic and hydrophobic [26] interactions holding the aggregates in non-separated, clear systems are weaker.



**Figure 12.** The polarity index ExPI and the Ex:Mo ratio in the Septonex (0.05 mM)-hyaluronan (15 mg/L; two different molecular weights) system before (darker columns) and after dilution (lighter columns).



#### 4. CONCLUSIONS

The phase behavior of aqueous systems containing hyaluronan and an oppositely charged surfactant was investigated in a very diluted region, i.e., at hyaluronan concentrations between 2 and 100 mg/L. The fluorescence probe technique with pyrene showed a typical double-S dependency of pyrene polarity indices on the surfactant concentrations in non-phase separating systems for the first time in hyaluronan-containing systems, no previous worked reported this. This confirmed the formation of micellar structures induced by the presence of the oppositely charged hyaluronan well below the standard critical micellar concentration. Moreover, regions of the gel-phase separation were also revealed. The gels incorporated the majority of the micellar structures, which are supposed to form the crosslinks in the gel network. The phase diagram could be specified in the very diluted region. The hyaluronan concentration, not the polyelectrolyte:surfactant charge ratio was found to be the main parameter controlling the phase behavior.

Aggregates formed in the homogeneous systems, represented by hyaluronan chains with induced micelles attached, were stable during storage for three months, but were sensitive to various disturbances. The smallest effect was found for the heating and cooling cycle, which caused reversible changes in the aggregates structure. Significant changes, the destabilization of the aggregates and the release of a solubilized hydrophobic substance, were observed upon dilution or the increase of the ionic strength. Their potential application as delivery systems of hydrophobes is, thus, questionable.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 16-12477S); the Materials Research Centre is supported by the Ministry of Education, Czech Republic (project No. LO1211).

## REFERENCES

- [1] P. Prehm, Hyaluronan, in A. Steinbüchel, R.H. Marchessault (Eds.), *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, pp. 617–644.
- [2] A. Fakhari, C. Berkland, Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7081–7092.
- [3] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol. Lett.* 29 (2006) 17–25.
- [4] K. Dicker, L. Gurski, S. Pradhan-Bhatt, R. Witt, M. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1558–1570.
- [5] M. Hemshekhar, R. Thushara, S. Chandranayaka, L. Sherman, K. Kemparaju, K. Girish, Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 917–928.
- [6] I. Hoffmann, P. Heunemann, S. Prévost, R. Schweins, N. Wagner, M. Gradzielski, Self-Aggregation of Mixtures of Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants Studied by Rheology, Dynamic Light Scattering and Small-Angle Neutron Scattering, *Langmuir* 27 (2011) 4386–4396.

- [7] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and polymers in aqueous solution*, second ed., John Wiley, Hoboken, 2003.
- [8] H. Bao, L. Li, L. Gan, H. Zhang, *Interactions between Ionic Surfactants and Polysaccharides in Aqueous Solutions*, *Macromolecules* 41 (2008) 9406–9412.
- [9] E. Kizilay, A.B. Kayitmazer, P.L. Dubin, *Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids*, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 24-37.
- [10] Y. Lapitsky, *Ionic crosslinked polyelectrolyte nanocarriers: Recent advances and open problems*, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 19 (2014) 122–130.
- [11] L. Chiappisi, I. Hoffmann, M. Gradzielski, *Complexes of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants – recent developments in the field of biologically derived polyelectrolytes*, *Soft Matter* 9 (2013) 3896–3909.
- [12] S. Aidarova, A. Sharipova, J. Krägel, R. Miller, *Polyelectrolyte/surfactant mixtures in the bulk and at water/oil interfaces*, *Adv. Colloid Interface Sci.* 205 (2014) 87–93.
- [13] K. Thalberg, B. Lindman, *Interaction between hyaluronan and cationic surfactants*, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 1478–1483.
- [14] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlstroem, *Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water*, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 4289–4295.

- [15] A. Hersloef, L. Sundeloef, K. Edsman, Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/ tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 2345–2348.
- [16] M. Bjoerling, A. Hersloef-Bjoerling, P. Stilbs, An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide, *Macromolecules* 28 (1995) 6970–6975.
- [17] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlstroem, Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3370–3376.
- [18] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlstroem, Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6004–6011.
- [19] K. Fukada, E. Suzuki, T. Seimiya, Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions, *Langmuir* 15 (1999) 4217–4221.
- [20] K. Thalberg, J. Stam, C. Lindblad, M. Almgren, B. Lindman, Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 8975–8982.
- [21] N. Li, S. Liu, H. Luo, A new method for the determination of the first and second CMC in CTAB solution by resonance Rayleigh scattering technology, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1229–1238.
- [22] E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 95–100.

- [23] G. González-Gaitano, A. Crespo, G. Tardajos, Thermodynamic Investigation (Volume and Compressibility) of the Systems  $\beta$ -Cyclodextrin n- Alkyltrimethylammonium Bromides Water, J. Phys. Chem. B 104 (2000) 1869–1879.
- [24] V. Mosquera, J. del Río, D. Attwood, M. García, M. Jones, G. Prieto, M. Suarez, F. Sarmiento, A Study of the Aggregation Behavior of Hexyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Solution, J. Colloid Interface Sci., 206 (1998) 66–76.
- [25] T. Halasová, J. Krouská, F. Mravec, M. Pekař, Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 391 (2011) 25–31.
- [26] A. Kargerová, M. Pekař, High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants, Langmuir 30 (2014) 11866–11872.
- [27] J. Oremusová, Z. Vitková, P. Herdová, Influence of Alcohols on Micellar and Release Balances of Cationic Surfactant – Carbethopendecinium Bromide (Septonex), Tenside Surf. Det. 51 (2014) 339–347.
- [28] O. Greksáková, J. Oremusová, M. Vojteková, F. Kopecký, Spectrophotometric Study of the Effect of Univalent Electrolytes on Critical Micelle Concentrations of [1 - (Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium, 1-Hexadecylpyridinium, and Dimethylbenzyl dodecylammonium Bromides, Chem. Papers 48 (1994) 300–305.
- [29] L. Čermáková, J. Rosendorfová, M. Malát, Determination of critical micelle concentration of 1-carboxypentadecyltrimethylammonium bromide, ChemPlusChem 45 (1980) 210–213.
- [30] H. Vink, Rheology of dilute polyelectrolyte solutions, Polymer 33 (1992) 3711–3716.

[31] M. Rinaudo, M. Milas, N. Jouon, R. Borsali, On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt concent: sodium hyaluronate example, *Polymer* 34 (1993) 3710-3715.

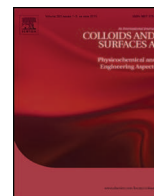
[32] K. Kogej, J. Škerjanc, Surfactant Binding to Polyelectrolytes, in T. Radeva (Ed.) *Physical chemistry of polyelectrolytes*, Surfactant science series vol. 99, Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 794–796.

**Příloha č. 4: Článek v impaktovaném časopise *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (accepted)**



Contents lists available at ScienceDirect

# Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)

## Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants



Pavla Sauerová<sup>a</sup>, Martina Verdánová<sup>b,c</sup>, Filip Mravec<sup>d</sup>, Tereza Pilgrová<sup>d</sup>,  
Tereza Venerová<sup>d</sup>, Marie Hubálek Kalbáčová<sup>a,c,e</sup>, Miloslav Pekař<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, alej Svobody 1655/76, Pilsen 323 00, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, Prague 2 128 43, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ke Karlovu 2, Prague 2 128 08, Czech Republic

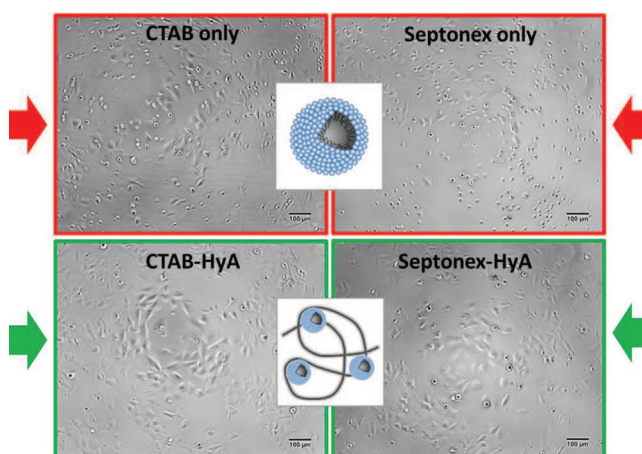
<sup>d</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, Brno 612 00, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, Pilsen 301 66, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- Surfactants (CTAB and Septonex) are toxic for osteoblasts.
- When complexed with hyaluronan their cytotoxicity is suppressed.
- Fetal bovine serum plays a positive role in the cytotoxicity suppression.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 May 2015

Accepted 29 June 2015

Available online 17 July 2015

#### Keywords:

Cytotoxicity  
Cell metabolic activity  
Human osteoblasts  
Hyaluronan  
Surfactant  
CTAB  
Septonex

### ABSTRACT

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and Septonex (carbethoxypendecinium bromide) are cationic surfactants known for harmful effects on different cell types (bacteria, fungi, mammal cells, etc.). Colloidal complexes of CTAB or Septonex with oppositely charged hyaluronic acid (HyA), based primarily on electrostatic interactions, were prepared with the aim to test potential modulation of surfactants cytotoxic effects. Complexes were tested for their cytotoxicity on human osteoblasts—the cell metabolic activity was determined after 24 h of treatment. Our data show that CTAB–HyA or Septonex–HyA complexes reduce (in different rate according to the used surfactant and HyA concentrations) cytotoxicity of both surfactants in all tested concentrations. In addition, a significant role of fetal bovine serum (important supplement of cell culture medium) in cell recovery under the stress conditions like CTAB or Septonex presence was observed. Taken together, HyA could be a useful modulator of CTAB or Septonex effects on cells at diverse levels. Drug or nucleic acid delivery system, diagnostic dye carriers or cosmetic industry are the possible applications of prepared complexes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [pekar@fch.vutbr.cz](mailto:pekar@fch.vutbr.cz) (M. Pekař).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.058>  
0927-7757/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



## 1. Introduction

Cationic surfactants are known for their cytotoxic properties [1–4] but due to their interactions with negatively charged substances – some kinds of drugs, nucleic acids, cellular surfaces, etc. – they can serve as an interesting tool in drug or gene cell delivery, for the study of cell trafficking processes, or in other cell structure visualisation techniques. The ability to form micelles is another positive property of surfactants and a benefit which is used in drug carriers [5]. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), in particular, is commonly used as a compound in drug delivery systems; for example, it is an ideal “shape-inducing” agent [6]. In general, it is known that cationic surfactants exhibit the highest cytotoxicity in comparison to anionic and non-ionic ones [7]. In spite of this, several studies have shown the anticancer effect of CTAB or other molecules containing the quaternary ammonium group [8–11]. Additionally, it was showed that these surfactants can behave as cytotoxic agents in dependence on the target cell type – surfactants were substantially cytotoxic to non-polarized cells in contrast to polarized cells [12]. Interestingly, it was shown that CTAB cytotoxicity can be depressed by polymers: Alkilany et al. reduced the CTAB-induced cytotoxicity of a CTAB-capped nanorods solution by PAA (polyacrylic acid) polymer over-coating [13].

The ideal polymer for our study, aimed at surfactant cytotoxicity modulation by forming complexes with oppositely charged biopolymer, appeared to be hyaluronan (HyA), because in our previous study, the reduction of the cytotoxic effects of CTAB on specific cell types in the presence of free sodium hyaluronate (HyA) was described [14]. Hyaluronan is a naturally occurring glycosaminoglycan composed of repeating  $\beta$ -1,4-D-glucuronic acid and  $\beta$ -1,3-N-acetyl-D-glucosamine disaccharide subunits [15]. HyA exhibits a wide spectrum of functions at various organism levels [16] and due to its favourable properties – biocompatibility, biodegradability, unique biomechanical features, and modifiability (functional groups) – HyA is called a biomaterial of the near future. Many HyA functions are conditioned by interactions with HyA-binding proteins, which are specific to the place of concrete HyA action [17–20].

As mentioned above, surfactants cytotoxicity could be regulated when complexed with hyaluronan. However, HyA in these complexes can play more roles, not only cell protecting but also it can also help the complex to bind onto the cell surface (via its receptors) and subsequently to move within the cell. Thus, the surfactant-HyA complex can serve as a carrier of non-polar drugs solubilized within the cores of surfactant micelles. HyA is degraded by hyaluronidases (Hyal), especially Hyal1 and Hyal2. Extracellular HyA is attached to Hyal2 anchored in the cell membrane and then cleaved [21]. It seems that this process is in cooperation with the HyA receptor CD44. HyA is then transferred into the cell by endocytosis. In lysosomal vesicles, HyA is cleaved again, but by HyA1 and then by exoglycosidases into monomers [16,22,23]. This pathway alone could be a way for the delivery of complexes to cells. The effects of HyA on cells have been well described, mostly thanks to its wide medical applications and the needs of regenerative medicine [24–31].

In this work, CTAB-HyA and Septonex-HyA complexes were prepared and their cytotoxicity was determined in comparison to native surfactants. In contrast to the previous study [14], in which the surfactant and hyaluronan were added to cells separately one at a time, the pre-prepared surfactant-HyA complexes were applied on cells. Further, Septonex, a structural analogue of CTAB, was also investigated. In addition, we were interested in the role of fetal bovine serum (FBS) in the ability of cells to overcome stress conditions (i.e. the presence of native surfactants or surfactants-HyA complexes). FBS (the blood fraction after clotting, free of blood cell elements) is a crucial component of the cell growth

**Table 1**

Composition of hyaluronan-surfactant complexes and their zeta potential (values in parentheses represent the standard deviation).

CTAB (mM)	HyA (mg/l)	Zeta potential (mV)
0.04	5	-14(2)
0.05	5	-8(2)
0.05	30	-15(2)
0.05	50	-34(5)
0.08	30	-29(1)
0.08	50	-19(5)
0.10	30	-26(1)
0.10	50	-28(4)
Septonex (mM)	HyA (g/l)	Zeta potential (mV)
0.03	1	-70(1)
0.06	1	-72(2)
0.08	1	-68(3)

medium because it provides supplements important for cell cultivation in vitro (for adhesion, division, survival etc.). However, the major compound of FBS, bovine serum albumin, is known to interact with various molecules (it provides a variety of binding sites for both hydrophobic and negatively charged hydrophilic moieties), and the behaviour of surfactants in complexes could be affected by this protein [33,34]. Moreover, it has already been demonstrated that cell behaviour and morphology can be substantially influenced by the presence or absence of FBS in general [14,35].

Surfactants with regulated cytotoxicity might play a role in drug, gene, or diagnostic dye carriers (thanks to the use of the natural HyA-transport system) and could exhibit only a moderate and controllable antiseptic activity (thanks to HyA's protective activity). The results could help to raise the profile of surfactant-HyA complexes with respect to their use in practical cell biology and clinical applications.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Surfactants and hyaluronan

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic) and carbethoxy-pendecinium bromide (Septonex) from GNB chem (Czech Republic), both used as received. Hyaluronan was purchased from Contipro Biotech (Czech Republic); two batches were acquired—one with a weight-average molecular weight of 1000 kDa was used in the preparation of complexes with CTAB, while the other with a weight-average molecular weight of 936 kDa was used in complexes with Septonex.

Solutions of complexes were prepared by mixing hyaluronan and surfactant stock solutions, prepared in deionized water, to obtain the desired final concentration. The surfactant solution was always added dropwise to the hyaluronan solution. In the case of CTAB-hyaluronan complexes, the hyaluronan concentration had to be sufficiently low in order to prevent precipitation and prepare homogeneous solutions of complexes. The concentrations of CTAB in complex solutions were 40, 50, 80 and 100  $\mu$ M; three hyaluronan concentrations were tested: 5, 30 and 50 mg/l. In the case of Septonex-hyaluronan complexes, only one hyaluronan concentration was used (1 g/l) at three different surfactant concentrations: 30, 60 and 80  $\mu$ M. Eleven different samples of complexes were thus prepared and used in experiments; their exact composition is given in Table 1.

The prepared complexes were characterized by their particle size distribution (measured by dynamic light scattering) and their zeta potential (measured by laser Doppler micro-electrophoresis) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

## 2.2. Cell culture

Human osteoblasts were used because they are a well-established and reproducible cell line suitable for this type of primary testing. The cells were incubated under different conditions for 24 h, when the treated cells were observed using light microscopy. This time period was found to be reasonable to obtain reproducible data and before all cells were destroyed in the presence of surfactants only. SAOS-2 cells (a human osteoblast-like cell line derived from osteosarcoma, obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (GmbH) in Germany) were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and in McCoy's 5A medium without phenol red (PromoCell, Germany) supplemented with 15% heat inactivated FBS (PAA, Austria), penicillin (20 U/ml, Sigma–Aldrich, USA) and streptomycin (20 µg/ml Sigma–Aldrich, USA).

## 2.3. Cell treatment with surfactant–HyA complexes

SAOS-2 cells were suspended using trypsin/EDTA and plated at a concentration of 20,000 cells/cm<sup>2</sup> onto a 96-well plate in the above mentioned culture medium and under the abovementioned conditions for 24 h. After 24 h, the cells were treated with complexes diluted 1:9 in fresh medium, with “only HyA”, or with “only surfactant” with or without FBS. In the latter, after 4 h of incubation without FBS, FBS was added to a final concentration of 15% (non-standard conditions).

## 2.4. Light microscopy

Phase contrast images of the cells were obtained using an Eclipse Ti-S microscope (Nikon, Japan) and a DS-Qi1Mc DigitalCamera (Nikon). Images were acquired with a 10× lens and adjusted by ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015) and Cell Profiler (Broad Institute, USA) software. Fig. 1 shows typical examples of obtained images.

## 2.5. Measurement of cell metabolic activity

A metabolic activity test (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS, Promega, USA) was performed according to the standard protocol (the reduction of MTS reagent to a coloured formazan product was induced by viable cells). 24 h after the addition of surfactant, the absorbance was measured in a 96-well plate using a multi-detection micro-plate reader (Synergy<sup>TM</sup> 2, BioTek, USA). The measured results were expressed relative to the control (“only cells”).

## 2.6. Statistical analysis

Results from MTS tests were obtained from two independent experiments performed in four parallels. Data were statistically analysed by the Wilcoxon rang test; the obtained values were tested for statistically significant differences at an alpha level of 0.05. The statistical evaluation was performed using Statistica (Stat-Soft CR, s.r.o.) and Microsoft Excel software.

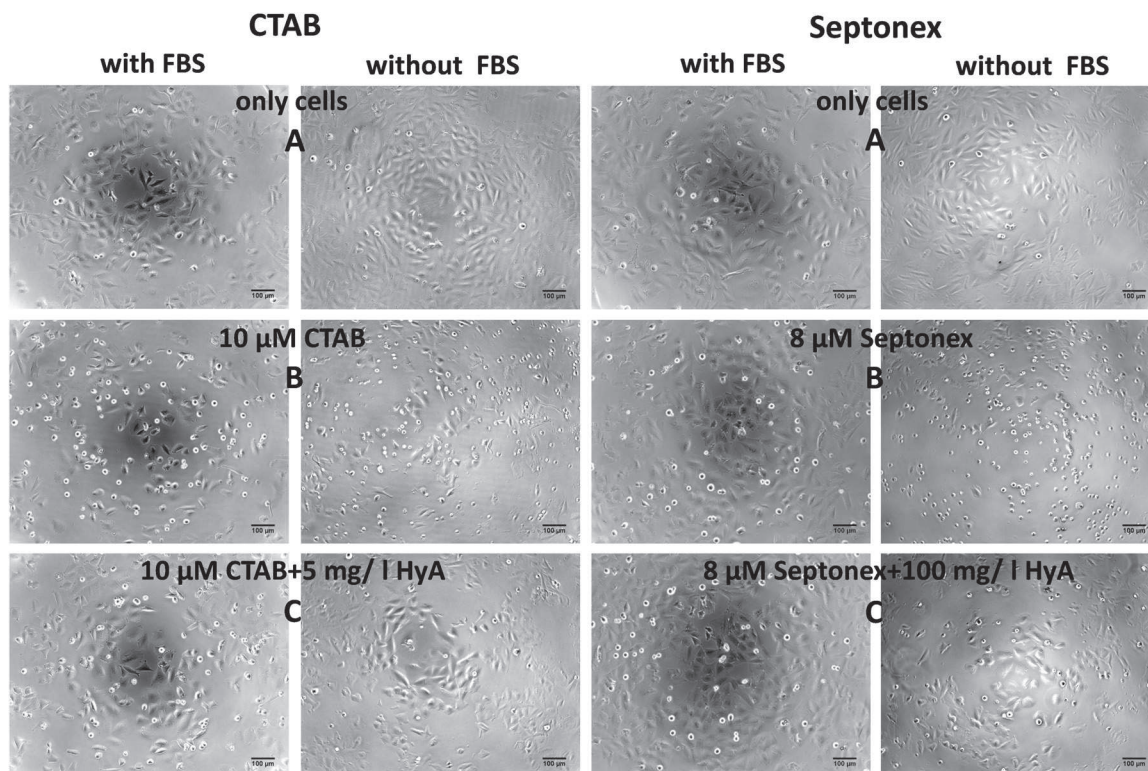
## 3. Results and discussion

Our previous study [14] revealed that osteoblasts treated with low CTAB concentrations did not show significantly reduced cell viability; however, their metabolic activity decreased with increasing CTAB concentrations. A 1 mM or higher CTAB concentration caused a dramatic reduction in cell metabolic activity. Adding HyA to the medium CTAB cytotoxicity was moderated, but only at the

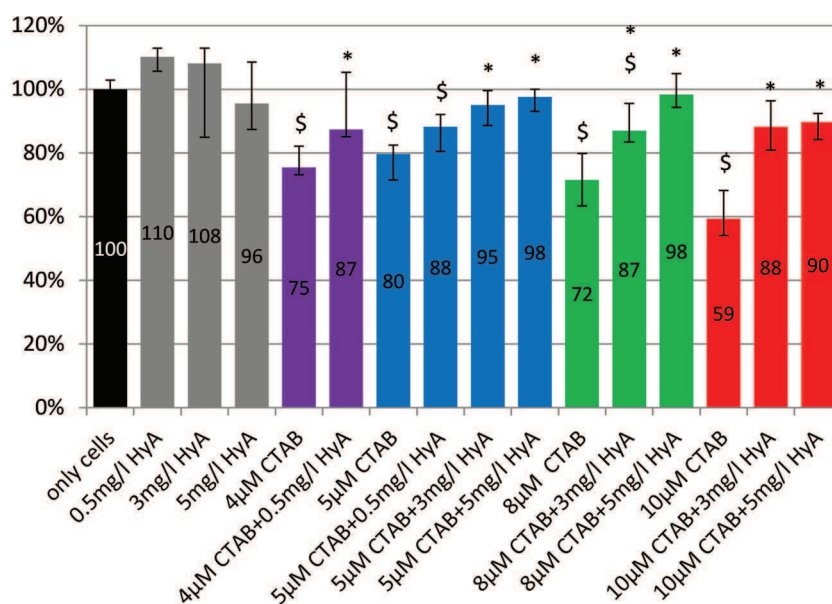
low CTAB concentration (not exceeding 0.2 mM). Consequently, low surfactant concentrations were used in the present work. These low concentrations were also dictated by the effort to avoid the precipitation of hyaluronan–surfactant aggregates which occurs at elevated surfactant concentrations [36,37] and to obtain clear colloidal solutions of hyaluronan–surfactant complexes.

In contrast to the previous study [14], the surfactant and hyaluronan were added to cells just in the form of the pre-prepared complexes. The formation of complexes between oppositely charged surfactants and polyelectrolytes, mainly on the basis of their electrostatic interactions, is a well-known fact [32,36,37]. The complexes were characterized by the two parameters relevant for their supposed interactions with cells—the size and charge. Measurements of particle sizes showed no clear dependence on concentration; all complexes were polydisperse with a main peak around 30 nm and a minor peak around 250 nm. A typical example of the measured size distribution is given in Fig. S1 in Supplementary material. Because the surfactant concentrations were well below their standard critical micellar concentrations, the polydispersity is believed to have been caused essentially by the presence of hyaluronan chains containing different numbers of attached induced micelles or even by the presence of structures formed by several biopolymer chains attached to the same induced micellar structure. The induced micelles are the micellar structures which are formed in solutions containing a polyelectrolyte and an oppositely charged surfactant at a concentration lower than their critical micellar concentration [32]. Zeta potential values are given in Table 1. They had negative values in all cases, indicating the prevailing negative charge of the complexes. This is an indication of the “elimination” of the surfactant's positive charges by interactions with hyaluronan. Complexes prepared from Septonex had significantly lower values due to the higher concentration of anionic hyaluronan. In the case of CTAB-based complexes, a lower hyaluronan concentration usually resulted in increased values of zeta potential. A typical example of the measured zeta potential distribution is shown in Fig. S2 in Supplementary material.

Fig. 2 shows that under standard conditions, the metabolic activity of cells treated with all of the used “only CTAB” concentrations was significantly decreased in comparison to the “only cells” control. Levels of cell metabolic activity after 4 µM or 5 µM CTAB treatments reached 75% or 80%, respectively. This is on the edge of cytotoxicity. Cytotoxicity is often defined by a drop in cell metabolic activity to under 75% [38], thus 8 µM or 10 µM CTAB concentrations (cf. Fig. 2) were already determined to be cytotoxic (inducing cell viabilities of 72% or 59%, respectively). The lowest HyA concentration (0.5 mg/l) was able to reduce the negative effect of “only CTAB” at its lowest concentration (4 µM). Higher HyA concentrations (3 mg/l and 5 mg/l) were able to significantly reduce the negative effects of all higher CTAB concentrations (5 µM, 8 µM and 10 µM). The contrast between the protective effects of the lowest and higher HyA concentrations is clearly apparent at the 5 µM concentration of CTAB and its complexes (see Fig. 2). As shown in the graph, the regenerative ability of HyA increased proportionally with the increase in CTAB concentration. All “only HyA” concentrations exhibited a positive effect on cell viability. Taken together, statistically significant differences between “only CTAB” and their complex analogues with higher HyA concentrations (3 mg/l and 5 mg/l) were observed in all cases. Thus, HyA in CTAB complexes is able to moderate the cytotoxicity induced by CTAB in general. Our results are more or less analogous to a reduction in CTAB cytotoxicity achieved by coating particles with polymers (specifically PAA) [13]. The moderation of cytotoxicity by HyA could be used for CTAB applications in which this surfactant plays the role of an effective disinfectant [4]. Thus, HyA could be used to regulate surfactant antiseptic effects.



**Fig. 1.** Phase contrast images (10× magnification) of human osteoblasts (SAOS-2) after 24 h treatment with surfactants (CTAB or Septonex (B)) or with complexes of surfactants and HyA (C) in the presence of FBS (with FBS) or in the absence of FBS (without FBS) during first 4 h of cultivation. (A)—untreated cells (only cells).

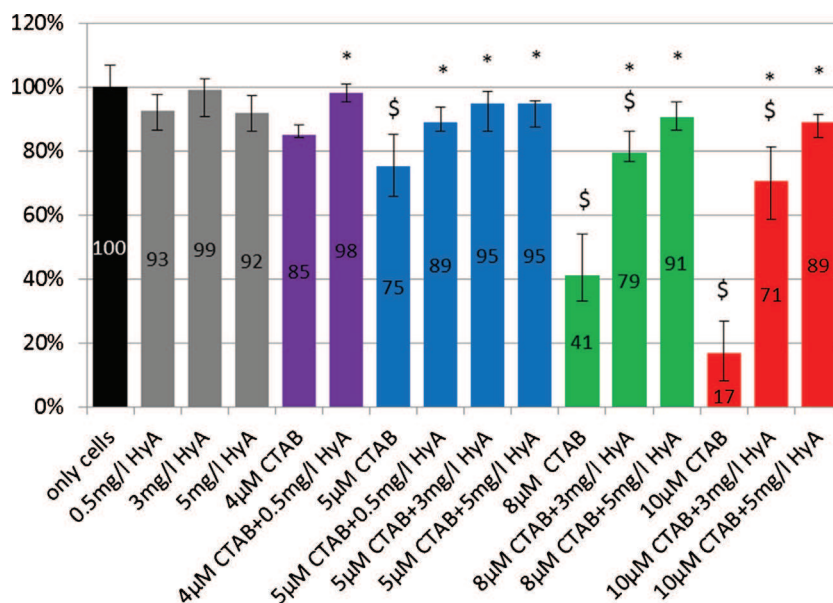


**Fig. 2.** Human osteoblast metabolic activity after 24h treatment with CTAB or CTAB–HyA complexes. FBS was present during the whole period of treatment (standard conditions). \$—significance at alpha level 0.05 compared to control (only cells); \*—significance at alpha level 0.05 compared to surfactant alone at the corresponding concentration based on the Wilcoxon rang test.

Results obtained under non-standard conditions with CTAB are shown in Fig. 3. A significant decrease in cell viability in most of the “only CTAB” samples (but not at the 4 μM CTAB concentration) compared to the “only cells” control was observed. Surprisingly, cells under non-standard conditions withstood the presence of 4 μM CTAB better than those under standard conditions, which could be explained by mild stress inducing higher mitochondrial activity (and, hence, the detection of higher metabolic activity). On

the other hand, higher CTAB concentrations (5 μM and above) were tolerated by cells under non-standard conditions substantially worse than under standard conditions. This indicates higher cell sensitivity to higher CTAB concentrations under non-standard conditions compared to standard conditions. The differences between “only CTAB” and its complex analogues were statistically significant in all cases. Moreover, the differences were more marked when compared to standard conditions. In contrast to standard





**Fig. 3.** Human osteoblast metabolic activity after 24 h treatment with CTAB or CTAB–HyA complexes. FBS was added after the first 4 h of treatment (non-standard conditions). \$—significance at alpha level 0.05 compared to control (only cells); \*—significance at alpha level 0.05 compared to surfactant alone at the corresponding concentration based on the Wilcoxon rang test.

conditions, even the lowest HyA concentration (0.5 mg/l) statistically significantly reduced the negative effects caused by the 5 μM CTAB concentration. Higher HyA concentrations (3 mg/l and 5 mg/l) in complexes with CTAB exhibited a highly positive effect on cell metabolic activity—this effect again rose proportionally with increasing CTAB concentration.

Generally, our results obtained with CTAB suggest that (i) cells are more sensitive to CTAB cytotoxicity (at concentrations above 5 μM) in the absence of FBS (non-standard conditions) compared to the setup with FBS present (standard conditions), (ii) FBS plays a positive role under the stress conditions induced by the presence of surfactant, and (iii) the cell protection offered by HyA is greater in the temporary absence of FBS (non-standard conditions). These results are in agreement with those from our previous study [14], in which free HyA was added to CTAB treated cells under standard and non-standard conditions. Furthermore, the protective effect of serum was also previously observed on keratinocytes [39]. FBS positive role could be ascribed to its binding on the cell surface and/or formation of aggregates between the HyA–surfactant complexes and proteinaceous components of serum [14].

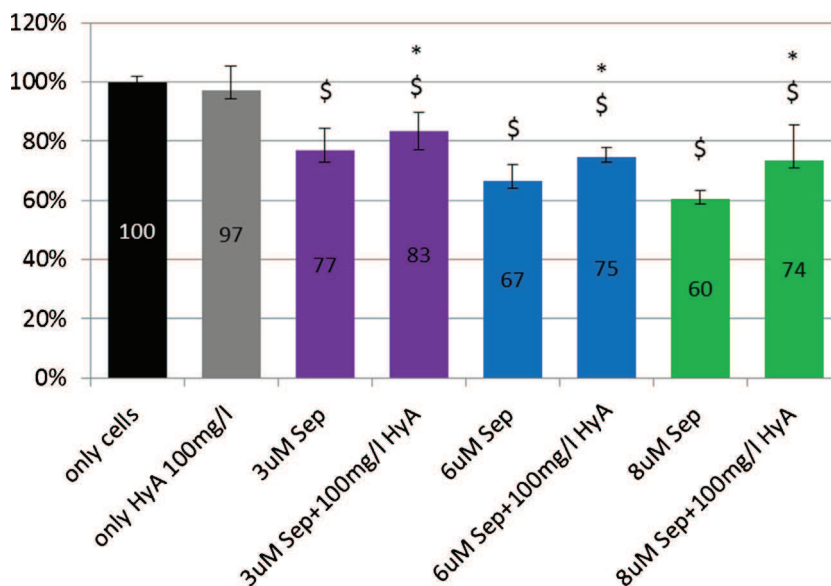
Cells under standard conditions treated by Septonex showed a significant decrease in metabolic activity when treated with “only Septonex” and also with all of the Septonex complexes with HyA in comparison to the “only cells” control (see Fig. 4). However, cytotoxicity was observed only at higher concentrations (6 μM and 8 μM). Statistically significantly higher levels of cell viability were observed in all Septonex complexes with HyA compared to “only Septonex”. Although these differences were not as apparent as in the case of CTAB, the positive effect of HyA rose proportionally with increasing Septonex concentration. Thus, HyA in complexes was again able to reduce cytotoxicity—in this case, the cytotoxicity induced by Septonex. In addition, the use of a comparable concentration of Septonex and CTAB (8 μM) indicated that Septonex was more cytotoxic. This could point to differences in CTAB and Septonex binding to cell membrane due to their structural differences.

Fig. 5 shows that under non-standard conditions, the data revealed a significant drop in cell metabolic activity under the “only Septonex” treatment and also under all of the Septonex/complex treatments in comparison to the “only cells” control (similarly to standard conditions). Cytotoxicity was observed when Sep-

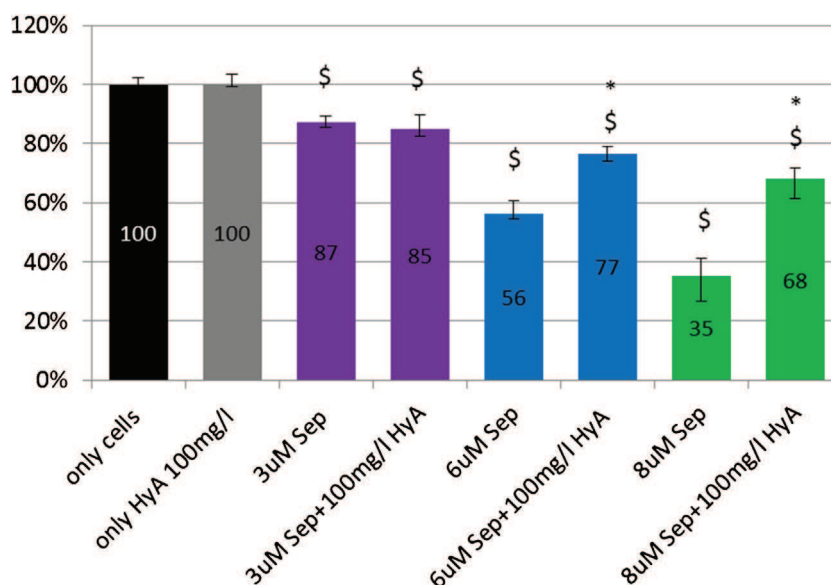
tonex at concentrations of 6 μM and above was used (see Fig. 5). This cytotoxicity was higher under non-standard conditions compared to standard conditions. Nevertheless, significantly higher cell metabolic activities were detected when Septonex complexes were added to cells in comparison to “only Septonex”, the one exception being Septonex at a concentration of 3 μM. Interestingly, the cell metabolic activities corresponding to 3 μM Septonex and the 3 μM Septonex–HyA complex were comparable. It seems that 3 μM Septonex under non-standard conditions acted as a mitochondrial activator. It is possible that very low Septonex concentrations could provoke cells to increase their metabolic activity. A similar effect was also observed in a previous study, when low concentrations of detergents caused increases in proliferative activity and mitochondrial metabolism in keratinocytes [39]. The cytotoxicity induced by higher Septonex concentrations (6 μM and 8 μM) was substantially reduced by the presence of HyA—this effect again rose proportionally with increasing Septonex concentration. The trend of metabolic activity in the presence and absence of FBS was similar, but cell viability under non-standard conditions was reduced overall. Thus, similarly to the results obtained for CTAB, a positive effect of FBS on cells treated by Septonex was observed. More significant HyA protection under non-standard conditions compared to standard conditions was also detected. In general, surfactant cytotoxicity reduction induced by HyA under higher surfactant concentrations could be due to the formation of stable micellar structures anchored on the biopolymer chain under these concentration conditions, preventing surfactant molecules from interactions with cell membranes.

Direct comparison with previous results, in which HyA and surfactants were not in the form of complexes, is very difficult due to the differences in concentrations which can be used in the preparation of complexes. The differences in cytotoxicity between plain surfactant and surfactant combined with hyaluronan were found to be more profound if hyaluronan was present in the form of a complex with surfactant. Therefore, it can be generally concluded that the protective effect of hyaluronan is greater when complexed with surfactant.

Taken together, all the presented results indicate the potential of HyA as a useful modulator of CTAB or Septonex induced cytotoxicity.



**Fig. 4.** Human osteoblast metabolic activity after 24 h treatment with Septonex or Septonex–HyA complexes. FBS was present during the whole period of treatment (standard conditions). \$–significance at alpha level 0.05 compared to control (only cells); \*–significance at alpha level 0.05 compared to surfactant alone at the corresponding concentration based on the Wilcoxon rang test.



**Fig. 5.** Human osteoblast metabolic activity after 24 h treatment with Septonex or Septonex–HyA complexes. FBS was added after the first 4 h of treatment (non-standard conditions). \$–significance at alpha level 0.05 compared to control (only cells); \*–significance at alpha level 0.05 compared to surfactant alone at the corresponding concentration based on the Wilcoxon rang test.

#### 4. Conclusion

In our study, HyA demonstrated the ability to protect cells against toxic cationic surfactants (CTAB and Septonex) when present in the form of a pre-prepared surfactant–HyA complex. The results also confirm and emphasize the role of FBS in cell response to stress conditions. Cells were more sensitive to surfactant toxicity in the absence of FBS. At the same time, cell protection by HyA was more efficient during the temporary absence of FBS. The combination of HyA and FBS thus provides the most efficient form of cell protection.

#### Acknowledgements

This work was supported by COST action CM1101 and projects No. LO1211 funded by the National Sustainability Programme I and LD12068 (Ministry of Education, Czech Republic). The Faculty of Medicine in Pilsen was supported by projects CZ.1.05/2.1.00/03.0076 (European Regional Development Fund) and grant SVV-2015 No. 260170, the 1st Faculty of Medicine by the project PRVOUK-P24/LF1/3, and the Faculty of Science by the project SVV-2015-260209. Special thanks go to Blanka Bílková for technical assistance.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.058>

## References

- 1] Â.S. Inácio, G.N. Costa, N.S. Domingues, M.S. Santos, A.J.M. Moreno, W.L.C. Vaz, O.V. Vieira, Mitochondrial dysfunction is the focus of quaternary ammonium surfactant toxicity to mammalian epithelial cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2631–2639, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02437-12>
- 2] L. Strakova, Z. Strosova, E. Sevcikova, Septonex color spray—a new disinfectant for the treatment of umbilical stubs (in Czech), *Veterinarstvi* 34 (1984) 69–70.
- 3] K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in *Escherichiacoli* cells, *J. Appl. Microbiol.* 110 (2011) 568–579, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04912.x>
- 4] O.V. Vieira, D.O. Hartmann, C.M.P. Cardoso, D. Oberdoerfer, M. Baptista, M.A.S. Santos, L. Almeida, J. Ramalho-Santos, W.L.C. Vaz, Y.-S. Bahn, Surfactants as microbicides and contraceptive agents: a systematic in vitro study, *PLoS One* 3 (2008) e2913, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002913>
- 5] V.P. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001) 137–172, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00299-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00299-1)
- 6] I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán, Silica-coating and hydrophobation of CTAB-stabilized gold nanorods, *Chem. Mater.* 18 (2006) 2465–2467, <http://dx.doi.org/10.1021/cm060293g>
- 7] R.L. Grant, C. Yao, D. Gabaldon, D. Acosta, Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies, *Toxicology* 76 (1992) 153–176, [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(92\)90162-8](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(92)90162-8)
- 8] Q. He, J. Shi, F. Chen, M. Zhu, L. Zhang, An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles, *Biomaterials* 31 (2010) 3335–3346, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.015>
- 9] I. Giraud, M. Rapp, J.-C. Maurizis, J.-C. Madelmont, Synthesis and in vitro evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2116–2119, <http://dx.doi.org/10.1021/jm010926x>
- 10] E. Ito, K.W. Yip, D. Katz, S.B. Fonseca, D.W. Hedley, S. Chow, G.W. Xu, T.E. Wood, C. Bastianutto, A.D. Schimmer, S.O. Kelley, F.-F. Liu, Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anticancer agent for head and neck cancer, *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 969–983, <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.055277>
- 11] M.J. Weiss, J.R. Wong, C.S. Ha, R. Bleday, R.R. Salem, G.D. Steele, L.B. Chen, Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 5444–5448.
- 12] Â.S. Inácio, K.A. Mesquita, M. Baptista, W.L.C. Ramalho-Santos, O.V. Vieira, D.T. Covas, In vitro surfactant structure–toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception, *PLoS One* 6 (2011) e19850, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019850>
- 13] A.M. Alkilany, P.K. Nagaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small* 5 (2009) 701–708, <http://dx.doi.org/10.1002/sml.200801546>
- 14] M. Kalbáčová, M. Verdánová, F. Mravec, T. Halasová, M. Pekař, Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 460 (2014) 204–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.048>
- 15] K. Meyer, Chemical structure of hyaluronic acid, *Fed. Proc.* 17 (1958) 1075–1077.
- 16] K.T. Dicker, L.A. Gurski, S. Pradhan-Bhatt, R.L. Witt, M.C. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1558–1570, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>
- 17] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C.B. Underhill, B. Seed, CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate, *Cell* 61 (1990) 1303–1313, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90694-A](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-A)
- 18] C.B. Knudson, Hyaluronan and CD44: strategic players for cell–matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly, *Birth Defects Res. Part C: Embryo Today: Rev.* 69 (2003) 174–196, <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.10013>
- 19] H. Ponta, L. Sherman, P.A. Herrlich, CD4: from adhesion molecules to signalling regulators, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 33–45, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1004>
- 20] W.F. Cheung, T.F. Cruz, E.A. Turley, Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (1999) 8.
- 21] G. Lepperdinger, J. Müllegger, G. Kreil, Hyal2—less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 20 (2001) 509–514, [http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00170-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00170-6)
- 22] H. Harada, M. Takahashi, CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5597–5607, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608358200>
- 23] E.S.A. Hofinger, J. Hoehstetter, M. Oettl, G. Bernhardt, A. Buschauer, Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases, *Glycoconj. J.* 25 (2008) 101–109, <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-007-9058-8>
- 24] G.D. Prestwich, Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine, *J. Control. Release* 155 (2011) 193–199, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.007>
- 25] B.P. Toole, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 528–539, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1391>
- 26] B.P. Toole, T.N. Wight, M.I. Tammi, Hyaluronan–cell interactions in cancer and vascular disease, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4593–4596, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R100039200>
- 27] J. Lam, W.E. Lowry, S.T. Carmichael, T. Segura, Delivery of iPSC-NPCs to the stroke cavity within a hyaluronic acid matrix promotes the differentiation of transplanted cells, *Adv. Funct. Mater.* 24 (2014) 7053–7062, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201401483>
- 28] S.K. Seidlits, Z.Z. Khaing, R.R. Petersen, J.D. Nickels, J.E. Vanscoy, J.B. Shear, C.E. Schmidt, The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation, *Biomaterials* 31 (2010) 3930–3940, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.125>
- 29] J. Lam, N.F. Truong, T. Segura, Design of cell–matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1571–1580, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.025>
- 30] M.J. Wilson, S.J. Liliensiek, C.J. Murphy, W.L. Murphy, P.F. Nealey, Hydrogels with well-defined peptide-hydrogel spacing and concentration: impact on epithelial cell behavior, *Soft Matter* 8 (2012) 390–398, <http://dx.doi.org/10.1039/C1SM06589K>
- 31] Y. Lee, H. Lee, Y.B. Kim, J. Kim, T. Hyeon, H. Park, P.B. Messersmith, T.G. Park, Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging, *Adv. Mater.* 20 (2008) 4154–4157, <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200800756>
- 32] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, Wiley, Chichester, 2007.
- 33] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life* 57 (2005) 787–796, <http://dx.doi.org/10.1080/15216540500404093>
- 34] W.C. Little, R. Schwartlander, M.L. Smith, D. Gourdon, V. Vogel, Stretched extracellular matrix proteins turn fouling and are functionally rescued by the chaperones albumin and casein, *Nano Lett.* 9 (2009) 4158–4167, <http://dx.doi.org/10.1021/nl902365z>
- 35] M. Verdanova, A. Broz, M. Kalbac, M. Kalbacova, Influence of oxygen and hydrogen treated graphene on cell adhesion in the presence or absence of fetal bovine serum, *Phys. Status Solidi (b)* 249 (2012) 2503–2506, <http://dx.doi.org/10.1002/pssb.201200099>
- 36] K. Thalberg, B. Lindman, Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 1478–1483.
- 37] A. Kargerová, M. Pekař, High-resolution ultrasonic spectroscopy study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants, *Langmuir* 30 (2014) 11866–11872.
- 38] E. Flahaut, M.C. Durrieu, M. Remy-Zolghadri, R. Bareille, C. Baquey, Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells, *Carbon* 44 (2006) 1093–1099, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2005.11.007>
- 39] P.L. Bigliardi, M.J. Herron, R.D. Nelson, M.V. Dahl, Effects of detergents on proliferation and metabolism of human keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 3 (1994) 89–94, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.1994.tb00053.x>

**Příloha č. 5: Článek v impaktovaném časopise *International Journal of Biological Macromolecules* (accepted)**



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

# Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types



Pavla Sauerová<sup>a,b</sup>, Tereza Pilgrová<sup>c</sup>, Miloslav Pekař<sup>c</sup>, Marie Hubálek Valbáčová<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, alej Svobody 1655/76, Pilsen 323 00 Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ke Karlovu 2, Prague 2, 128 08, Czech Republic

<sup>c</sup> Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00, Brno, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 April 2017

Received in revised form 22 May 2017

Accepted 30 May 2017

## Keywords:

Cytotoxicity  
Osteoblasts  
Keratinocytes  
Fibroblasts  
Hyaluronan  
Surfactants

## ABSTRACT

The cationic surfactants carbethoxypropyltrimethylammonium bromide (Septonex) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) are known to be harmful for certain cell types (bacteria, fungi, mammal cells, etc.). Colloidal complexes of these surfactants with negatively-charged hyaluronic acid (HyA) were prepared for potential drug and/or universal delivery applications. The complexes were tested for their cytotoxic effect on different human cell types – osteoblasts, keratinocytes and fibroblasts. Both the CTAB-HyA and Septonex-HyA complexes were found to reduce the cytotoxicity induced by surfactants alone concerning all the tested concentrations. Moreover, we suggested the limits of HyA protection provided by the surfactant-HyA complexes, e.g. the importance of the amount of HyA applied. We also determined the specific sensitivity of different cell types to surfactant treatment. Keratinocytes were more sensitive to CTAB, while osteoblasts and fibroblasts were more sensitive to Septonex. Moreover, it was indirectly shown that CTAB combines lethal toxicity with cell metabolism induction, while Septonex predominantly causes lethal toxicity concerning fibroblasts. This comprehensive study of the effect of surfactant-HyA complexes on various human cell types revealed that HyA represents a useful CTAB or Septonex cytotoxic effect modulator at diverse levels. Potential applications for these complexes include drug and/or nucleic acid delivery systems, diagnostic dye carriers and cosmetics production.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cationic surfactants make up commonly used agents for a range of molecular biology methods and are known for their antiseptic qualities, which makes them ideal for use in the field of medicine. Furthermore, such surfactants also make up attractive substances for use in a variety of new therapeutic and molecular biology applications due to their micellar behaviour, antiseptic properties, wide availability and affordability. The two surfactants employed in this study – CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and Septonex (carbethoxypropyltrimethylammonium bromide) – belong to this group of materials. Their potential application in the medical and molecular biology fields includes that of drug or universal (nucleic acid, diagnostic dye etc.) delivery systems based on the positive charge of both surfactants and as one of the components that make up antiseptic-hydration agents employed in the pharmaceutical industry. Generally, both CTAB and Septonex are widely used and

are well-known cationic surfactant agents, with the latter particularly being used in a number of pharmaceutical preparations in the Czech Republic. While the two surfactants are structurally closely related, the hydrocarbon chain in Septonex is one carbon atom shorter than in CTAB and its polar head, in contrast to CTAB, contains the carbethoxy group. Despite their relatively common use, however, the natural cytotoxicity of both surfactants may present a fundamental complication with respect to certain advanced applications in organisms; indeed, in addition to their positive antimicrobial effects [1], a number of undesirable side-effects have been observed on mammalian cells, i.e. cationic surfactants have been proved to be inducers of apoptosis in low concentrations and necrotic cell death inducers in higher concentrations [2,3]. However, it is possible to minimise such negative side-effects so as to allow for the advanced application of surfactants. Interestingly, the issue of the reduction of undesirable cytotoxicity is closely connected to research on nanoparticles with respect to their drug delivery potential. CTAB is often used for nanoparticle synthesis purposes; however, this surfactant remains bound to particles even following preparation thus inducing cyto-

\* Corresponding author.

E-mail address: [marie.kalbacova@lf1.cuni.cz](mailto:marie.kalbacova@lf1.cuni.cz) (M. Hubálek Valbáčová).



toxicity, which substantially complicates cell application in general [4].

Polymer application provides an interesting method via which to reduce surfactant cytotoxicity [4]. A good example of surfactant toxicity and the polymer reduction effect was provided by an experiment in which gold nanorods were separately covered with either CTAB or commonly used PEG (polyethylene glycol) [3]. More recently, further evidence was presented concerning the high degree of efficiency of synthetic polymers in the reduction of cytotoxicity induced by surfactants [5,6]. However, with respect to biomaterial applications, polymers naturally occurring in organisms appear to provide the best candidate in terms of clinical applications. Moreover, in addition to reducing the level of cytotoxicity, natural polymers are more likely to be tolerated by the immune system, are universally biocompatible and degrade naturally within organisms. At the same time, with respect to the natural occurrence of polymers (and their receptors) and the rarity of such occurrences in tissue, such polymers may also serve as a tool for the targeting of specific tissue.

Hyaluronic acid (HyA), a naturally-occurring glycosaminoglycan composed of repeating  $\beta$ -1,4-D-glucuronic acid and  $\beta$ -1,3-N-acetyl-D-glucosamine disaccharide subunits, appears to provide the ideal natural polymer. HyA participates in the maintenance of tissue homeostasis and hydration and is an essential component of the extracellular matrix. It plays a role in cell migration, proliferation and general signalisation. Moreover, it is a commonly occurring substance within organisms and has an abundant number of receptors on cells (CD44, RMM). Furthermore, it is also well-known for its biocompatibility and high level of modifiability [7,8]. The attractiveness of HyA for many researchers is further enhanced simply by its omnipresence within organisms [9] which allows it to serve as a carrier of universality under specific conditions. On the other hand, the high modifiability of HyA and proved overexpression of CD44 in certain types of tumour cells may allow this polymer to become a carrier with high specificity. Furthermore, cell-extracellular matrix interactions and migration are generally directly connected to the main HyA receptors, i.e. CD44 and RHAMM (a receptor for HyA-mediated motility which triggers cellular signalisation via its interaction with HyA and CD44) [10,11]. It appears that these receptors are crucial for the interaction of extracellular HyA with cells and thus also for new potential delivery systems based on HyA. As mentioned previously, HyA-CD44 interactions make up potential drug carriers and, moreover, provide for the possibility of selective targeting based solely on CD44 interactions [12]. In general, the potential of HyA with respect to clinical applications and the development of new materials has been supported by a range of observations connected with the positive effects of HyA on cells [13,14]. A good example of the positive effects of HyA on cells and its generally high level of efficiency was provided by the simple substitution of the frequently used polymer PEG with HyA for the coating of nanoparticles [15]. Interestingly, a number of effects of the molecular weight of HyA on its functioning have been observed. Indeed, molecular weight appears to be critical in terms of the interaction of HyA with cells (low/intermediate HyA molecular weights are usually defined as <800 kDa and high molecular weights as >800 kDa [16]). While low molecular weight HyA has a low affinity to CD44 (the dominant cell receptor for HyA) and thus has the potential for passive transport to cells, high molecular weight HyA has the potential for active transport as a consequence of delivery via CD44. The CD44 preference for high molecular weight HyA could be used for targeting to cells with an overexpression of CD44, e.g. tumour cells [15], a fact which enhances both the overall potential of HyA and its applicability with respect to delivery systems based on HyA [17].

This contribution provides a comprehensive study of the effect of surfactants and complexes thereof with HyA on different human

**Table 1**

The composition and the charge ratio of individual CTAB-HyA and Septonex-HyA complexes. Final working concentrations are indicated. \* HyA – 5 mg/l and 500 mg/l concentrations are indicated in the text as lower and higher HyA concentration, respectively.

CTAB ( $\mu$ M)	HyA (mg/l)*	charge ratio HyA:surfactant
3	5	4,2
	500	415
6	5	2,1
	500	208
8	5	1,6
	500	156
Septonex ( $\mu$ M)	HyA (mg/l)	charge ratio HyA:surfactant
3	5	4,2
	500	415
6	5	2,1
	500	208
8	5	1,6
	500	156

cell types with a focus on the reduction of surfactant cytotoxicity when combined with HyA in a pre-mixed complex, as well as an indication of the limits related to the protection provided. It is hoped that the study will serve as a base for the development of a transfer system based on complexes consisting of surfactants and HyA for the purposes of a range of clinical and molecular biology applications. Clearly, surfactants may assume the role of hydrophobic cargo transporters (due to their positive charge) or that of “killers” due to their cytotoxicity in such a transfer system. On the other hand, the addition of HyA should reduce the degree of toxicity of the surfactants through the coating of their surfaces and, at the same time, provide support for their binding to the cell membrane via HyA-specific receptors. Following cell entry, the transferred cargo may be released or the surfactants may assume the role of endogenous cell destroyers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Surfactants and hyaluronan

Hyaluronan (sodium salt of hyaluronic acid – HyA) with a weight averaged molecular weight of 639 and 903 kDa (determined by the producer using the SEC-MALLS technique), was purchased from Contipro Ltd, Czech Republic. CTAB was purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic and Septonex from GBNchem, Czech Republic. The surfactants were of the best quality available and were used as received without further purification. Stock solutions of the various components were prepared in deionised water, while surfactant-HyA complex solutions were prepared by means of the gradual dropping of the surfactant stock solutions into the biopolymer stock solutions until the desired concentrations were obtained. Due to subsequent dilution in the cell studies, the complexes were prepared at ten times higher concentrations than the final concentrations given in Table 1.

The concentrations of the surfactants and HyA were selected on the basis of a previous study conducted by the authors [18,17] and aimed at exerting a reasonable effect on the cells. Further, the concentrations were selected bearing in mind the various colloidal aspects. While the surfactant concentrations were well below their standard critical micelle concentration, they were in the region in which the formation of micelles upon the HyA added was detected (generally, the formation of micelles was induced by the presence of oppositely-charged polyelectrolyte) and no phase separation of the surfactant-HyA complexes was observed. The formation of induced micelles was confirmed by using pyrene as a fluorescence probe and measuring the pyrene polarity index [19]. The polarity index decreased steeply in the selected concentration region indicating

the formation of hydrophobic domains and the solubilisation of pyrene within them (data not shown). Increased surfactant concentration can lead to the precipitation of surfactant-HyA complexes. The lower HyA concentration was selected as the lowest concentration exerting a sufficient degree of protective effect as determined in preliminary experiments with CTAB. In the case of preliminary experiments with Septonex, it appeared that the concentration had to be significantly higher; therefore, a higher HyA concentration was also tested (on both surfactants).

## 2.2. Cell culture

Human primary fibroblasts derived from skin (obtained from FN Lochotin, Pilsen, Czech Republic) were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and in DMEM medium (Sigma–Aldrich, USA) supplemented with 10% heat inactivated FBS (PAA, Austria), 1% l-glutamine (Sigma–Aldrich, USA), 1% glucose and 1% penicillin (20 U/ml, Sigma–Aldrich, USA) and streptomycin (20 µg/ml Sigma–Aldrich, USA). Spontaneously immortalised human keratinocyte cell line HaCaT (obtained from ATCC – LGC Standards, Poland) was cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and in DMEM medium (Sigma–Aldrich, USA) supplemented with 10% heat inactivated FBS (PAA, Austria), 1% l-glutamine (Sigma–Aldrich, USA) and 0.1% gentamicin (Sigma–Aldrich, USA). Human osteoblasts (SAOS-2; a human osteoblast-like cell line derived from osteosarcoma, obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (GmbH) in Germany) were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and in McCoy's 5A medium without phenol red (PromoCell, Germany) supplemented with 15% heat inactivated FBS (PAA, Austria), 1% penicillin (20 U/ml, Sigma–Aldrich, USA) and streptomycin (20 µg/ml Sigma–Aldrich, USA).

## 2.3. Cell treatment with surfactant-HyA complexes

The fibroblasts, osteoblasts and keratinocytes were suspended using trypsin/EDTA and plated at a concentration of 20 000 cells/cm<sup>2</sup> onto a 96-well plate in the above-mentioned culture medium and under the above-mentioned conditions for 24 h after which the cells were treated with the complexes, free HyA or free surfactant diluted at a ratio of 1:9 in fresh medium with FBS (standard cultivation conditions) or without FBS (non-standard cultivation – stress conditions); the concentrations finally used are shown in Table 1. Under non-standard cultivation conditions, applied to the osteoblasts only, FBS was added (to a final concentration of 15%) to cells the incubated in the FBS-free medium following 4 h of incubation.

## 2.4. Light microscopy

Phase contrast images of the cells were obtained using an Eclipse Ti-S microscope (Nikon, Japan) and a DS-Qi1Mc digital camera (Nikon). Images were acquired with a 10 × lens and adjusted by means of ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015).

## 2.5. Determination of cell metabolic activity

A metabolic activity test (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS, Promega, USA) was performed according to the standard protocol (the reduction of MTS reagent to a coloured formazan product was induced by viable cells). 24 h following the addition of the surfactant, absorbance was measured in a 96-well plate using a multi-detection micro-plate reader (Synergy™ 2, BioTek, USA). The measured results were expressed relative to the control (“only cells”; untreated cells).

## 2.6. Imaging of fluorescently stained cells

The cells were fixed by means of 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 15 min following the end of cell metabolic activity measurement. They were then permeabilised in 0.1% Triton X-100 in PBS (Sigma–Aldrich, USA) at RT for 20 min and stained using DAPI – fluorescent dye for cell nuclei – at RT for 45 min (1:1000; Sigma–Aldrich, USA).

The wide field nuclei images for the purpose of the determination of nuclei number were obtained using an Eclipse Ti-S microscope and DS-U2 digital camera (Nikon, Japan). Images were acquired using a 4 × lens and adjusted by means of ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015) and Cell Profiler (Broad Institute, USA) software.

## 2.7. Statistical analysis

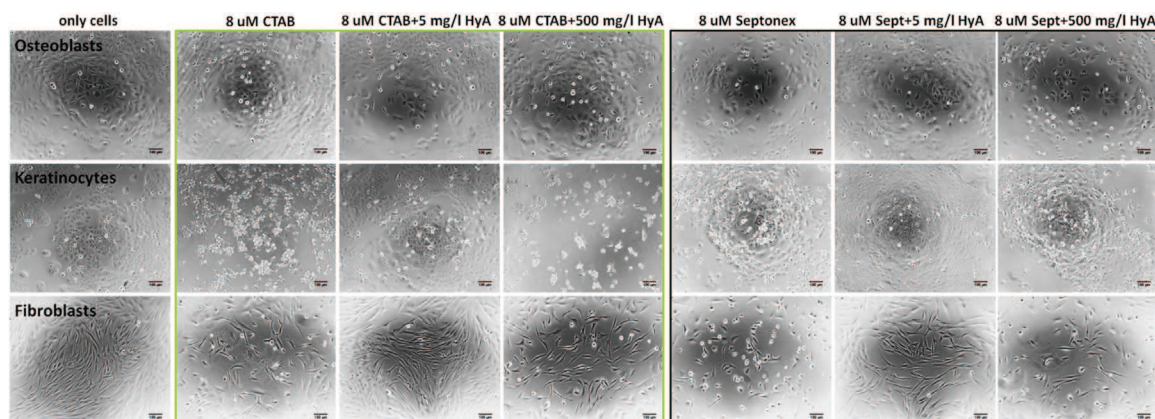
MTS test results were obtained from at least two independent experiments performed in four to six parallels. The data was statistically analysed by means of non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with a subsequent post-hoc Multiple Comparison test; the values obtained were tested for statistically significant differences at an alpha level of 0.05. The statistical evaluation was performed using Statistica (StatSoft CR, s.r.o.) and Microsoft Excel software.

## 3. Results and discussion

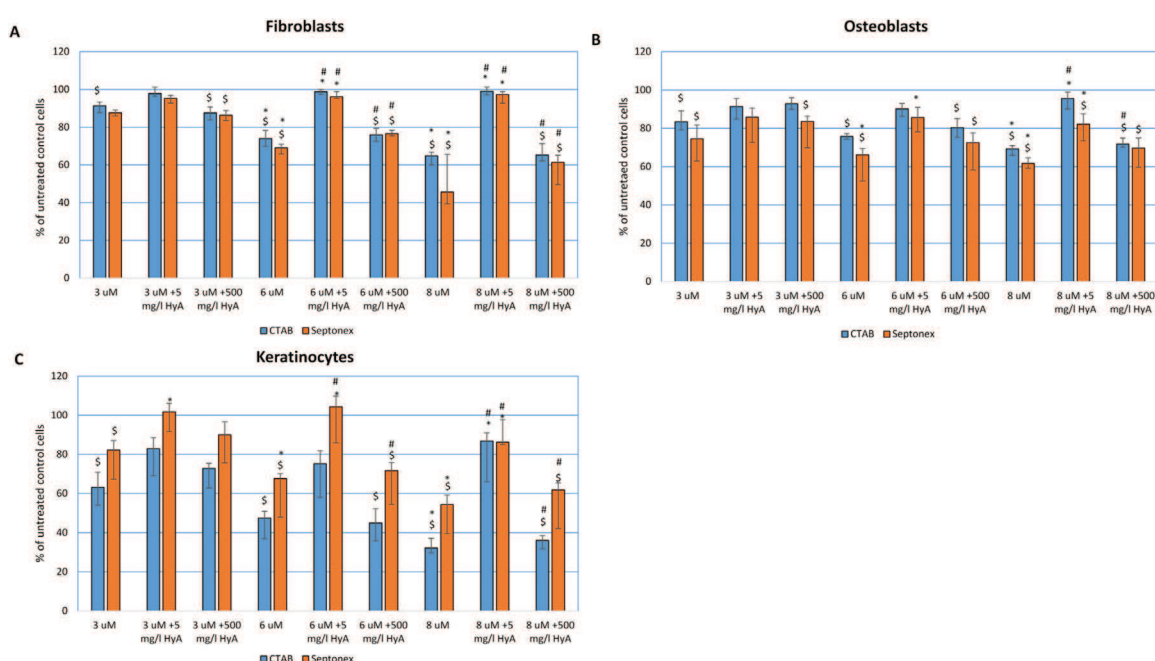
### 3.1. Determination of the effect of surfactants and HyA complexes thereof on cell morphology

The complexes, modified according to the authors' previous results [17], were composed of various concentrations of CTAB and HyA or Septonex and HyA (Table 1). The charge ratio provided in Table 1 was calculated on the basis of the occurrence of one charge on each surfactant molecule and one charge per each HyA disaccharide repeating unit with a molar weight of 401.299 g/mol. The negative charge originating from the HyA prevailed with respect to all the compositions. Dynamic light scattering revealed the bimodal distribution of particle sizes with peaks of around 20–30 nm and 250–350 nm with no unambiguous correlation with composition or surfactant type. It was supposed that the smaller particles were formed by free HyA chains or HyA chains interacting with individual surfactant molecules, whereas the larger particles were formed by micellar aggregates covered with HyA. So as to enhance the level of comparability, identical concentrations of HyA with CTAB or Septonex were employed.

Three differing cell types – human primary cells: fibroblasts, human immortalised cell lines: osteoblasts, and keratinocytes – were pre-seeded and then exposed to CTAB-HyA and Septonex-HyA complexes or their corresponding controls for 24 h (Fig. 1). Cell morphological changes indicating cytotoxicity, and the rate or intensity of cell reaction to the complexes or free surfactant treatment were studied throughout the period of exposure. Light microscopy provided a brief but sufficient live mode observation with the minimisation of cell stress induction during imaging. With respect to all the cell types tested, we observed a linear dependence with increased CTAB or Septonex concentration (both free and integrated within the complexes) and a cumulative damage effect at the cell morphological change level (Fig. 1). This phenomenon intensified proportionally over time (0 – 24 h). At the same time, as the microscope images show, there was a clear difference between the free surfactant and surfactant-HyA complexes in these respects. Furthermore, the morphological differences between the two complex analogues (which differed only in terms of HyA concentration) and the highest surfactant concentrations of CTAB and Septonex



**Fig. 1.** Phase contrast images of human osteoblasts (SAOS-2), human keratinocytes (HaCaT) and human fibroblasts after 24 h treatment with free surfactants (CTAB or Septonex) or by complexes composed of surfactants and HyA under standard conditions; only cells are untreated control cells.



**Fig. 2.** Metabolic activity of human fibroblasts (A), osteoblasts (B) and keratinocytes (C) 24 h after treatment with CTAB or Septonex and CTAB-HyA or Septonex-HyA complexes under standard conditions expressed as a percentage of the untreated cells. \$ – significance at alpha level 0.05 compared to control (untreated cells); \* – significance at alpha level 0.05 between surfactant and its complex analogue; # – significance at alpha level 0.05 between different HyA concentrations with the same surfactant concentration in the complex – based on non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with subsequent post-hoc Multiple comparison test.

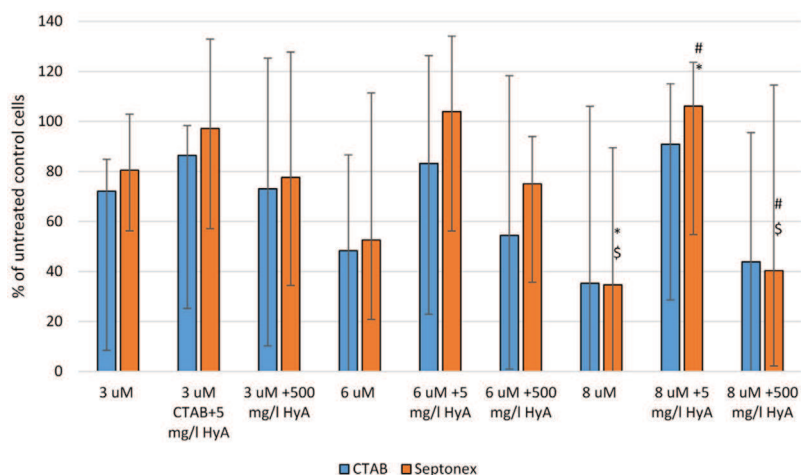
were well distinguished (Fig. 1). Similar free surfactant and surfactant complex effects had already been observed with respect to osteoblasts in the authors' previous publication [17]. However, the present study revealed a somewhat surprising phenomenon with concern to all the tested cell types, i.e. a minimum indication of CTAB or Septonex cytotoxicity was recorded only in the presence of complexes with lower HyA concentration (5 mg/l). The complexes with a higher HyA concentration (500 mg/l) were characterised by a level of cytotoxicity approaching that induced by free surfactant – non-attached/dead cells.

### 3.2. Determination of the effect of surfactants and surfactant-HyA complexes on cell metabolic activity

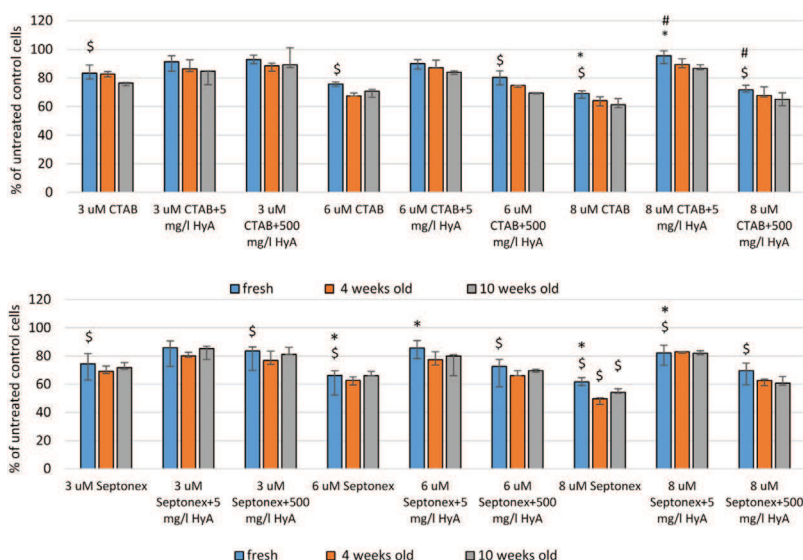
A detailed characterisation was performed employing cell metabolic activity analysis. As shown in Fig. 2, changes in cell metabolic activity induced by treatment with surfactants or surfactant-HyA complexes exhibited a similar trend in all the

three cell types tested. We observed a clear relationship between cytotoxicity and higher surfactant concentrations, which is in agreement with both the presented microscope observation, the authors' previous results and results obtained by others in the past [17,18,20]. The degree of cell viability diminished with increasing concentrations of free surfactants and, at the same time, we noted an increase in viability in cases in which the same amount of surfactant was incorporated into surfactant-HyA complexes. Following on from previously observed differences between the cytotoxicity induced by free and bound surfactants [20,21], the clear differences determined between free surfactants and their complex analogues appear to verify good interaction between the surfactants and HyA resulting in good complex formation and compactness. As Fig. 2 also shows, a concentration of 6  $\mu$ M (and above) of both free surfactants led to cytotoxicity in all the cell types tested – cell viability was reduced to below 75–80% of the control value (untreated cells) [22]. Further, an increase in viability and thus in the level of HyA protection was more apparent in cases of higher surfactant con-





**Fig. 3.** Cell number determination in human fibroblasts 24 h after treatment with CTAB or Septonex and CTAB-HyA or Septonex-HyA complexes under standard conditions expressed as a percentage of the untreated cells. \$ – significance at alpha level 0.05 compared to control (untreated cells); \* – significance at alpha level 0.05 between surfactant and its complex analogue; # – significance at alpha level 0.05 between different HyA concentrations with the same surfactant concentration in the complex – based on non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with subsequent post-hoc Multiple comparison test.

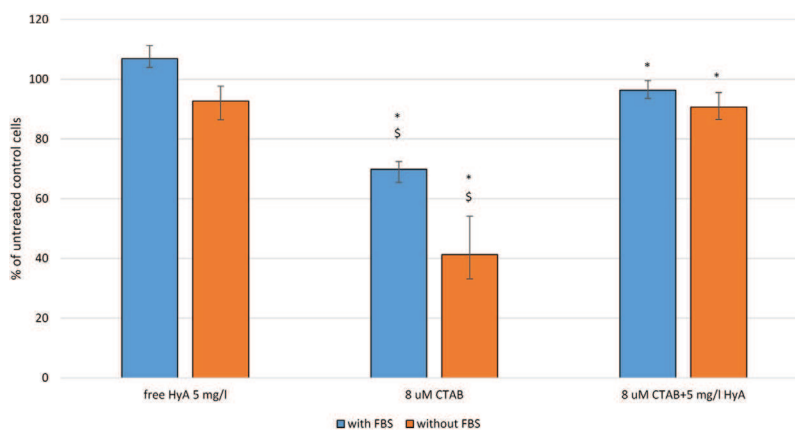


**Fig. 4.** Determination of complex stability – metabolic activity of human osteoblasts treated with fresh, 4-weeks old and 10-weeks old CTAB complex (A) and Septonex complex (B) 24 h after the treatment under standard conditions. \$ – significance at alpha level 0.05 compared to control (untreated cells); \* – significance at alpha level 0.05 between surfactant and its complex analogue; # – significance at alpha level 0.05 between different HyA concentrations with the same surfactant concentration in the complex; ## – significance at alpha level 0.05 between different times with the same surfactants or complexes – based on non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with subsequent post-hoc Multiple comparison test.

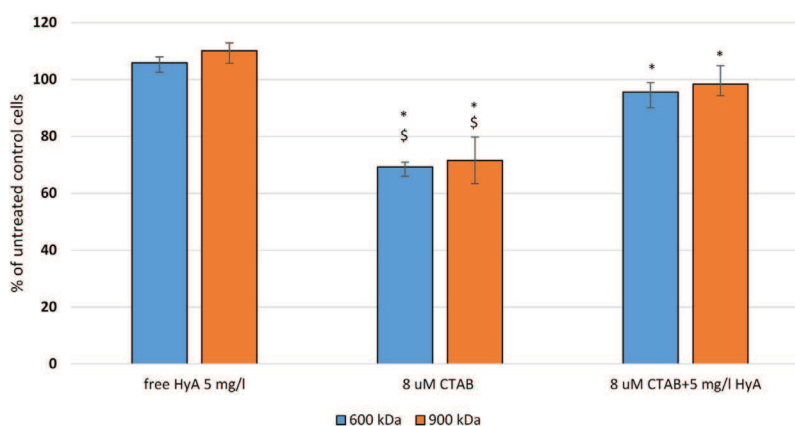
centrations; however, a more marked difference was evident in this respect between the free surfactants (both CTAB and Septonex) and both their complex analogues containing HyA. The results thus correspond to the authors' previous results according to which the protective effect of HyA was more pronounced under higher stress conditions (a higher amount of surfactant). However, unlike in previous experiments, the modification of complexes to include different HyA concentration (5 or 500 mg/l) employed in this study allowed us to more accurately define the degree of HyA protection. As predicted by the microscopy results, metabolic activity confirmed that the distinct protective effect of HyA in complexes is limited – protection was defined only in complexes with a lower HyA concentration (5 mg/l), whereas a higher HyA concentration (500 mg/l) caused either a markedly lower degree of protection or had no protective effect when compared to treatment with free surfactants. The existence of limits to this protective phenomenon is supported by the authors' previous results involving the testing

of prepared "CTAB-HyA" and "Septonex-HyA" complexes with various CTAB- and Septonex-HyA concentrations [17]. HyA protection was confirmed with respect to all three of the tested HyA concentrations contained in the complexes (0.5, 3 and 5 mg/l of HyA) combined with surfactants, including in the presence of the highest levels of concentration of CTAB (10  $\mu$ M) and Septonex (8  $\mu$ M) applied. It follows that HyA protection is limited on the one hand by the concentration thereof in the complex and, on the other, by surfactant concentration in the complex.

In general, it is reasonable to suggest that excessive concentrations of HyA in the complex lead to a loss of HyA protection ability. Nevertheless, this reduction was observed only with respect to HyA with surfactants; free HyA in both concentrations (5 and 500 mg/l) exerted a comparable or positive effect on cell viability in a similar way to the non-treated control cells (Fig. 6). Taken together, this observation provides evidence that a reduction in HyA protection is directly connected with surfactant presence.



**Fig. 5.** Metabolic activity of human osteoblasts cultivated under standard (FBS present for whole time of treatment) and non-standard cultivation condition (FBS was added after first 4 h of treatment) 24 h after treatment by CTAB or Septonex and CTAB-HyA or Septonex-HyA complexes expressed as a percentage of the untreated cells. \$ – significance at alpha level 0.05 compared to control (untreated cells); \* – significance at alpha level 0.05 between surfactant and its complex analogue; # – significance at alpha level 0.05 between different HyA concentrations with the same surfactant concentration in the complex; ## – significance at alpha level 0.05 between different conditions with the same surfactants or the complexes – based on non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with subsequent post-hoc Multiple comparison test.



**Fig. 6.** Metabolic activity of human osteoblasts treated with complexes of different molecular weight size of HyA (cca 600 kDa and 900 kDa) 24 h after the treatment with CTAB or Septonex and CTAB-HyA or Septonex-HyA complexes expressed as a percentage of the untreated cells. \$ – significance at alpha level 0.05 compared to control (untreated cells); \* – significance at alpha level 0.05 between surfactant and its complex analogue; # – significance at alpha level 0.05 between different HyA concentrations with the same surfactant concentration in the complex; ## – significance at alpha level 0.05 between different weight size of HyA in the same complexes – based on non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA with subsequent post-hoc Multiple comparison test.

Moreover, this finding is supported by an interesting observation [15], according to which the quality of HyA and its ability to interact with cells may be altered significantly if it is not free and interacts with other components (e.g. particles). In addition, this alteration is fundamentally influenced by the molecular weight of the HyA, which may substantially contribute towards cell interaction via the degree of binding capacity of the HyA molecule. A further explanation for the observed decrease in HyA protection under high HyA concentration conditions may lie in the difference in complex conformation induced solely by the amount of HyA molecules. During the formation of complexes, the surfactant binds to the HyA and divides itself between the HyA molecules in the solution. From the macroscopic point of view, there are no significant differences between complexes located in the polymer-bound surfactant area though they are of different concentrations [23,24]. However, interactions with cells occur at the microscopic level, with respect to which the differences in molecular arrangement may be significant. The principal interaction force consists of the electrostatic attraction between the oppositely charged groups, which most probably results in an altered HyA conformation compared to non-interaction chains. In addition, the presence of an attached hydrophobic tail or even micellar structures undoubtedly contribute to conformation changes. At higher concentrations,

the polyelectrolyte binds more surfactant molecules than at lower concentrations (with the same surfactant concentration; [23]). The resulting conformation of HyA in the complexes formed with higher concentrations thereof may hinder its cell protective effect. It can also be hypothesised that at high HyA concentrations, almost all the surfactant molecules are well covered by biopolymer chains, i.e. are wrapped within them in micellar form; surfactant-free biopolymer chains exist and subsequently HyA serves as an effective transporter into the cells and only here, following HyA degradation, the toxic effect of the surfactant molecules is manifested. At lower HyA concentrations, but with a charge ratio still higher than one, surfactant molecules bind themselves to almost all the HyA macromolecules present, which thus lose their ability to interact with cells effectively which, in turn, leads to more effective cell protection.

An analysis of metabolic activity changes at different cell type levels revealed that the fibroblasts (Fig. 2A) and osteoblasts (Fig. 2B) behaved in a more similar manner than either did with the keratinocytes (Fig. 2C) following general surfactant treatment. While the osteoblasts and fibroblasts reacted mildly to increased concentrations of both surfactants and their analogous complexes, the keratinocytes reacted mildly only to Septonex treatment, while they reacted dramatically to CTAB treatment. The sensitivity of the

fibroblasts to both the surfactants altered markedly and was more distinguishable with respect only to the highest surfactant concentration (8  $\mu\text{M}$ ). Moreover, a higher sensitivity to Septonex than to CTAB was evident. Unlike the fibroblasts, the osteoblasts exhibited a higher degree of sensitivity to Septonex than to CTAB with concern to all the concentrations tested. In contrast to the fibroblasts and osteoblasts, the keratinocytes appeared to be extremely sensitive to CTAB. As Fig. 2 shows, overall, the keratinocytes proved to be the most sensitive cell type of all the tested cell types to surfactant treatment. While the keratinocyte metabolism decreased rapidly to below cytotoxic level (around 75%) [22], as early as in the presence of the lowest (3  $\mu\text{M}$ ) CTAB concentration, the metabolism of the fibroblasts and osteoblasts markedly decreased to below this level only in the presence of higher CTAB concentrations (6  $\mu\text{M}$  and more). Indeed, this development is supported by the authors' previous finding which revealed that the surfactant sensitivity of keratinocytes was more similar than that of osteoblasts [18]. Taken together, the results clearly show that cell reactions to free surfactants or complexes thereof with HyA are determined by a combination of cell origin and cell sensitivity to the structure of the surfactant. The dependence of toxicity only on the structure of the surfactant and its subsequent impact on different cell types has already been well described in the past by other authors [20,25–27]. The Inácio team demonstrated significant differences in the toxicity of surfactants in polarised and non-polarised epithelial cells. These differences were based solely on the chemical nature of the polar head group of surfactants. Based on this evidence, our results indicate that, in addition to elevated concentration, the sensitivity of keratinocyte is given by its ability to distinguish between the chemical structures of CTAB and Septonex. In comparison, fibroblasts and osteoblasts react only to increasing concentrations of both surfactants. It is proposed that one reason for the selective sensitivity of keratinocytes may consist of their origin; in general, keratinocytes make up the predominant cell type in the epidermis (the outer layer of the skin), thus they are the first cells to come into contact with external chemical substances and, thus, are required to be selectively sensitive. Fibroblasts, in contrast, make up extracellular matrix producers and form tissue stroma, and osteoblasts synthesise bone tissue. Thus, both cell types perform a more structural function which may well be linked to a higher level of mechanical resistance. Further, the impact of the size of the different cell types on the cytotoxicity phenomenon can be disregarded due to the similarity in this respect of fibroblasts and keratinocytes (HaCaT), which is in contrast to the significant difference in surfactant treatment observed between these cell types.

### 3.3. Determination of the effect of surfactants and hyA-complexes thereof on fibroblast cell number

The analysis of the effect of surfactants and HyA-complexes thereof on cells was expanded to include the determination of nuclei number (cell number), the aim of which was to assist in distinguishing between lethal cytotoxicity that results in cell death and sub-lethal cytotoxicity that leads merely to cell metabolism inhibition [28].

Generally, the cell number results (Fig. 3) corresponded with the trend of the MTS results thus indicating that the MTS results reflect both cytotoxicity and cell number. Despite the significant deviations in the cell number results, more detailed analysis revealed an interesting tendency which differed with respect to the two surfactants, i.e. a certain percentage difference was noticeable between the nuclei number and metabolic activity results (Fig. 2). CTAB exerted a more marked influence in terms of reducing the number of cells than it did with concern to affecting metabolic activity, which did not decline with the same degree of intensity. This appears to suggest the higher lethal toxicity of CTAB and, at the

same time, an increase in the cell metabolism of the surviving cells. This is supported by the study presented by Inácio's team which described levels of cytotoxicity induced by ammonium surfactants which can play role only in mitochondrial respiratory inhibition, which, in turn, is induced by their sub-lethal concentrations; on the other hand, mitochondrial fragmentation and cell death, however, are induced by their higher concentrations [28]. Further, Enomoto's team detected an increase in apoptotic features following CTAB treatment under below-critical micellar concentrations [2]. Similarly, a "switch" between surfactant- (CTAB) induced toxicity and its ability to activate the mitochondrial metabolism of cells based on surfactant concentration has been described previously [27]. Low concentrations of surfactants are able to elevate the rate of cell mitochondrial metabolism. However, a different situation from that of CTAB was observed with respect to Septonex treatment concerning which, in general, a higher level of similarity of cell number and metabolic activity was observed. Higher Septonex concentrations appeared to lead to a mild elevation in both lethality and cell metabolism, which is somewhat in contrast to the theory suggesting that only low surfactant concentrations exert an activating effect on cells [27]. However, this apparent contradiction may be due to the chemical dissimilarity between Septonex and the other surfactant tested, which may have caused the above-mentioned alteration in terms of cell activation. Taken together, it appears that Septonex (and its analogue HyA complexes) induces lower lethal toxicity than does CTAB and does not have such a marked effect on the elevation of cell metabolism. From the viewpoint of fibroblasts as a cell type, this observation provides evidence of a higher degree of cell tenderness with respect to Septonex than to CTAB. At the same time, it seems that CTAB induced cell metabolism in addition to lethal toxicity. Based on the previous observation that antibacterial cationic surfactants make up apoptosis inducers [2], we are able to predict that the observed lethality of both surfactants is connected to the apoptosis phenomenon.

### 3.4. Determination of the stability of surfactants and HyA-complexes thereof over time tested with respect to osteoblasts

Due to the known instability of similar complexes over time [29], the study included an investigation of possible changes affecting free surfactants and their complex analogues over time (testing of the same complex batches over time). The metabolic activity was determined of cells treated with freshly prepared, 4-week old and 10-week old solutions of free surfactants and their corresponding complex analogues. In order to ensure the highest degree of reproducibility of the obtained results, a well-defined immortalised osteoblast cell line was used for this purpose. No significant changes in cell metabolic activity were identified following the treatment of the cells using the same, but varying in age, CTAB (Fig. 4A) and Septonex (Fig. 4B) surfactants and their HyA-complexes. We suggest that only very moderate changes (if any) were evident with respect to the surfactant and complex solutions over time which resulted in no noticeable changes in the level of HyA protection or cytotoxicity of the free surfactants employed. Indeed, this finding is supported by the good colloidal stability of the prepared complexes during storage – no opacity or phase separation development was observed, nor was there a shift in particle size distribution to higher dimensions (data not shown).

### 3.5. Determination of the effect of surfactants and HyA-complexes thereof on osteoblasts under standard and non-standard conditions

Further, the well-defined osteoblast cell line was used for the verification of the effect of complexes on cells under standard (foetal bovine serum (FBS) present in the cultivation medium dur-

ing whole of the incubation period) and non-standard conditions (FBS added only 4 h following cell seeding). While FBS makes up a typical representative standard cultivation component, it cannot be used for clinical applications due its many potential health risks [30]; nor should it be used due to requirements concerning certain cell types and molecular-biological methods [31]. Fig. 5 demonstrates the positive role of FBS under stress conditions under which the cells were treated with the surfactant (CTAB). This positive serum effect has already been observed in previous studies [17,25,27,32]. The trend of cell viability under non-standard conditions was similar to the standard trend, although it was reduced in general. Despite a certain degree of viability reduction under non-standard conditions, the results confirmed the applicability of complexes under such conditions. These findings suggest the potential for broader application in practice, e.g. the use of such complexes for nuclei acid delivery purposes, which is usually performed under serum-free conditions.

### 3.6. The effect of HyA molecular weight in a complex with CTAB on osteoblast metabolic activity

Finally, potential differences between complexes made up of HyA of differing molecular weights were determined. As mentioned in the introduction, it is known that the biological function of HyA depends on its molecular weight. Thus, complexes of CTAB with high molecular weight HyA (ca 900 kDa) and a CTAB complex with lower molecular weight HyA (ca 600 kDa) were studied on osteoblasts under standard conditions. In addition, CTAB complexes composed of the highest surfactant concentration (8  $\mu$ M) and a lower HyA concentration (5 mg/l) were tested since the protective role of HyA in this CTAB-HyA complex was found to be the most extensive and significant in comparison to free CTAB (see Fig. 1 and Fig. 2). Fig. 6 reveals no significant change in osteoblast metabolic activity following treatment with complexes of differing HyA molecular weight. Thus, HyA protection in relation to complexes with surfactants is determined solely by its concentration (5 or 500 mg/l) and not by its molecular weight in the range tested. This presumption is supported by Mizrahy et al. [15], who demonstrated a linear relationship between the molecular weight of HyA and its affinity to the CD44 receptor (the dominant HyA receptor). This means that the molecular weight of HyA directs “HyA-cell” interactions and thus the means of transport to the cell. Furthermore, evidence was found of an alteration with respect to general HyA affinity to CD44 induced by HyA molecular weight where the HyA was coated with nanoparticles (NPs), i.e. not free. While the binding of free HyA of different molecular weights (132 kDa, 700 kDa and 1500 kDa) to CD44 was very similar, 132 kDa HyA-coated NPs bound less to cells than 700 kDa or 1500 kDa HyA-coated NPs. It seems that potential reaction sites on lower-molecular-weight-HyA easily become unavailable to CD44 since they are depleted in terms of interaction with NPs as compared to higher-molecular-weight-HyA where enough potential reaction sites exist for both interactions – both CD44 and NP. Thus, there appears to be no significant difference in terms of HyA protection between 600 kDa and 900 kDa HyA, which the research concluded could be caused by the similarity of both molecular weight ranges – it seems that a molecular weight of 600 kDa provides enough potential reaction sites for surfactant binding (and thus a reduction in its cytotoxicity) and for potential cell interaction, which leads to a comparable level of protection as provided by 900 kDa HyA.

## 4. Conclusion

The research study confirmed HyA protection ability with respect to cationic surfactant- (CTAB and Septonex) induced cytotoxicity and provided a detailed definition of the limits, conditions

and factors concerning the protection phenomenon. In addition, the results obtained from the study of various cell types and differently modified complexes enhanced present knowledge of the ways in which surfactant-induced cytotoxicity occurs and the reduction thereof following the addition of HyA. Keratinocytes indicated extreme sensitivity to the CTAB surfactant in general and relatively low sensitivity to Septonex which suggests that surfactant sensitivity is influenced by both surfactant concentration and by distinguishing between the structures of the two surfactants. Fibroblasts and osteoblasts indicated a comparable level of sensitivity to both surfactants depending solely on the surfactant concentration applied. All these cytotoxic effects were diminished by the presence of HyA in the surfactant complexes. Moreover, only low concentration HyA (5 mg/l) caused a considerable protective effect, whereas the same HyA at the higher concentration (500 mg/l) failed to protect cells from negative effects induced by the surfactants. No significant effect was observed with respect to surfactant complexes with HyA of differing molecular weight (600 kDa or 900 kDa) or differing age (fresh, 4-week old, 10-week old). We also revealed the positive effect of FBS on cells under stress conditions (surfactant presence) and the cell protective function of HyA in complexes containing surfactants under non-standard conditions. In addition, we confirmed the potential use of the complexes studied in serum-free systems. Further, we demonstrated HyA protection ability and the limits thereof in relation to different cell types. Our results strongly indicate that cationic surfactant-HyA complex systems can be employed for “delivery system” purposes in various biomedical applications.

## Acknowledgement

This study was supported by National Sustainability Programme I projects No. LO1503 and No. LO1211 and by project SVV 260 390.

## References

- [1] K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in *Escherichia coli* cells, *J. Appl. Microbiol.* 110 (2) (2011) 568–579.
- [2] R. Enomoto, et al., Cationic surfactants induce apoptosis in normal and cancer cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1095 (1) (2007) 1–6.
- [3] K. Lun Cheung, et al., CTAB-coated gold nanorods elicit allergic response through degranulation and cell death in human basophils, *Nanoscale* 4 (15) (2012) 4447–4449.
- [4] A.M. Alkilany, P.K. Nalaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small* 5 (6) (2009) 701–708.
- [5] Y. Zhang, D. Xu, W. Li, J. Yu, Y. Chen, Effect of Size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEP-2 and canine MDCK cells, *J. Nanomater* 2012 (2012) 7.
- [6] J. Wan, J.-H. Wang, T. Liu, Z. Xie, X.-F. Yu, W. Li, Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo, *Sci. Rep* 5 (2015) 11398.
- [7] G.D. Prestwich, Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine, *J. Controlled Release* 155 (2) (2011) 193–199.
- [8] K.T. Dicker, L.A. Gurski, S. Pradhan-Bhatt, R.L. Witt, M.C. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomater.* 10 (4) (2014) 1558–1570.
- [9] R. Stern, Hyaluronidases in cancer biology, *Semin. Cancer Biol.* 18 (4) (2008) 275–280.
- [10] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C.B. Underhill, B. Seed, CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate, *Cell* 61 (7) (1990) 1303–1313.
- [11] W.-F. Cheung, T.F. Cruz, E.A. Turley, Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (2) (1999) 135–142.
- [12] R.E. Eliaz, S. Nir, F.C. Szoka, Interactions of Hyaluronan-targeted liposomes with cultured cells: modeling of binding and endocytosis, *Methods Enzymol.* 387 (2004) 16–33.
- [13] J. Lam, N.F. Truong, T. Segura, Design of cell–matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds, *Acta Biomater.* 10 (4) (2014) 1571–1580.
- [14] S.K. Seidlits, et al., The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation, *Biomaterials* 31 (14) (2010) 3930–3940.



- [15] S. Mizrahy, et al., Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response, *J. Controlled Release* 156 (2) (2011) 231–238.
- [16] J.E. Rayahin, J.S. Buhman, Y. Zhang, T.J. Koh, R.A. Gemeinhart, High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 1 (7) (2015) 481–493.
- [17] P. Sauerová, et al., Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 483 (2015) 155–161.
- [18] M. Kalbáčová, M. Verdánová, F. Mravec, T. Halasová, M. Pekař, Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 460 (2014) 204–208.
- [19] T. Halasová, F. Mravec, M. Pekař, The effect of hyaluronan on the aggregation of hydrophobized amino acids—A fluorescence study, *Carbohydr. Polym.* 97 (1) (2013) 34–37.
- [20] Â.S. Inácio, K.A. Mesquita, M. Baptista, J. Ramalho-Santos, W.L.C. Vaz, O.V. Vieira, In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception, *PLoS One* 6 (5) (2011) e19850.
- [21] T.S. Hauck, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells, *Small* 4 (1) (2008) 153–159.
- [22] E. Flahaut, M.C. Durrieu, M. Remy-Zolghadri, R. Bareille, C. Baquey, Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells, *Carbon* 44 (6) (2006) 1093–1099.
- [23] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactant micellization, in: Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons Ltd, 2002, pp. 39–66.
- [24] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlstrom, Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water, *J. Phys. Chem.* 94 (10) (1990) 4289–4295.
- [25] M. Cornelis, C. Dupont, J. Wepierre, Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests in vitro on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes, *Toxicol. In Vitro* 6 (2) (1992) 119–128.
- [26] J.K. Lee, D.B. Kim, J.I. Kim, P.Y. Kim, In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants, *Toxicol. In Vitro* 14 (4) (2000) 345–349.
- [27] P.L. Bigliardi, M.J. Herron, R.D. Nelson, M.V. Dahl, Effects of detergents on proliferation and metabolism of human keratinocytes, *Exp. Dermatol* 3 (2) (1994) 89–94.
- [28] Â.S. Inácio, et al., Mitochondrial dysfunction is the focus of quaternary ammonium surfactant toxicity to mammalian epithelial cells, *Antimicrob. Agents Chemother* 57 (6) (2013) 2631–2639.
- [29] D. Li, M.S. Kelkar, N.J. Wagner, Phase behavior and molecular thermodynamics of coacervation in oppositely charged Polyelectrolyte/Surfactant systems: a cationic polymer JR 400 and anionic surfactant SDS mixture, *Langmuir* 28 (28) (2012) 10348–10362.
- [30] M. Sundin, O. Ringdén, B. Sundberg, S. Nava, C. Götherström, K.L. Blanc, No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients, *Haematologica* 92 (9) (2007) 1208–1215.
- [31] G. Gstraunthaler, Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture, *Altex* 20 (4) (2003) 275–281.
- [32] M. Verdánová, A. Broz, M. Kalbac, M. Kalbacova, Influence of oxygen and hydrogen treated graphene on cell adhesion in the presence or absence of fetal bovine serum, *Phys. Status Solidi B* 249 (12) (2012) 2503–2506.



**Příloha č. 6: Článek v recenzovaném časopise *Materials Science Forum*  
indexovaném v databázi *Web of Science* (accepted)**

## Interaction between cationic micelles and hyaluronan

PILGROVÁ Tereza<sup>1,a\*</sup>, PEKAŘ Miloslav<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, CZ

<sup>a</sup>xckrutisova@fch.vutbr.cz, <sup>b</sup>pekar@fch.vutbr.cz

**Keywords:** hyaluronan, micelle, nanoparticles, turbidimetry, dynamic light scattering.

**Abstract.** Micelles are particles of colloidal dimension and it is known that in an aqueous phase can solubilize water insoluble molecules (hydrophobic biologically active substances) in their inner core. However surfactants may have adverse effects on biological structures. Association of micelles with suitable bioacceptable molecules (e.g. hyaluronan) may lead to enhance their biocompatibility, decrease the nanoparticles cytotoxicity and also to target to the specific receptors in a human body. In this study, results of the research of electrostatic coating of cationic micelle with hyaluronan are reported. The cationic micelle/hyaluronan complexes were studied using turbidimetry and dynamic light scattering method and were evaluated to determine their structure, average size and zeta potential as a function of the amount of the both component in the system. Turbidimetric titration was chosen as indicator of the loss of intensity of transmitted light due to the scattering effect of particles associated from hyaluronan and surfactant in it. Dynamic light scattering measurement provided information about size distribution and zeta potential during mixing of component. Pilot solubilization experiments were performed to evaluation of stability and solubilization ability of the complexes. Results of turbidimetry revealed that aggregates formation (turbidity increasing) depends especially on hyaluronan concentration while surfactant concentration (above critical micelle concentration) affects interaction insignificantly. Dynamic light scattering experiments indicate that hyaluronan molecular weight has insignificant effect on isoelectric point of the systems. It was found that solubilization ability of the complexes is influenced by molecular weight of hyaluronan.

### Introduction

Molecules which are amphiphilic, that is contain both a hydrophobic and hydrophilic part, in aqueous solution frequently assemble at interfaces and self-associate in an attempt to sequester their nonpolar regions from contact with the aqueous phase. The self-association gives colloid-size aggregates – micelles. Thanks to this structure can solubilize water-insoluble molecules in their inner, essentially hydrophobic nature. Over the years several of the phase structures produced by surfactants have been of interest to the pharmaceutical scientist, either as drug vehicles carriers or more recently as targeting systems. However surfactants may have adverse effects on biological structures, e.g. cell membranes therefore covering of micelles with suitable bioacceptable molecules may enhance their biocompatibility and perhaps also stability in biological environment and may also provide the micelles with targeting moieties.

Hyaluronan (refers to all physiological forms of hyaluronic acid, the most common of which is the sodium salt) is the naturally occurring glykosaminoglycan (a class of negatively charged polysaccharides) and a major constituent of the extracellular matrix. It is a linear, unbranched polysaccharide containing alternating N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid residues linked by  $\beta(1-4)$  and  $\beta(1-3)$  bonds. Despite the simple primary hyaluronan structure this molecule has very different physiological roles in living organism depending on the molecule size and spatial arrangement, including maintenance of the viscoelasticity of liquid connective tissues (such as synovial fluid in the joints or eye vitreous humor), control of tissue hydration, water transport, proteoglycan organization in the extracellular matrix (ECM), tissue repair and various receptor-mediated functions in cell detachment, tumor development and inflammation [1]. Hyaluronan is

therefore an attractive building block for new biocompatible and biodegradable materials that could have applications in drug delivery, tissue engineering, wound healing or surgery [2].

Hyaluronan is incapable directly carry nonpolar substances (e.g. hydrophobic drugs) due to its highly hydrophilic character and large hydration shell. A combination of hyaluronan with suitable partner (e.g. micelles) may lead to formation of associates in which the surfactant hydrophobic domains solubilize hydrophobic substances and hyaluronan plays a role of biocompatible carrier and targeting agent [3]. The association of hyaluronan and micelles is mutually advantageous alternative for new drug delivery system.

In this study first results of the research on decorating of cationic surfactant micelles with hyaluronan are reported. Hyaluronan interacts with positively charged micelles by electrostatic interactions mediated by its dissociated carboxyl groups. These interactions has been studied many experimental methods including turbidimetry, dynamic light scattering methods [4], fluorescence spectroscopy methods, etc. [5]. In our study interactions were followed by turbidimetry and dynamic light scattering method and the effects of concentration of both interacting partners and of the hyaluronan molecular weight were investigated. These two parameters control the particle size and, consequently, clear to turbid dispersions can be prepared.

## Materials and methods

Hyaluronan (as sodium salt of hyaluronic acid; HyA) at different molecular weights (13 kDa, 117 kDa and 1635 kDa) was purchased from CPN, Ltd., Czech Republic. Cationic surfactant Septonex of the best available purity was purchased from GBNchem and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) of the best available purity was purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic.

Stock solutions of hyaluronan and surfactants were prepared in aqueous solution. All stock solution were prepared by slow dissolution of powdered substances upon stirring and left stirred for 24 hours to ensure complete dissolution.

Turbidity measurements, reported as absorbance  $A$ , were performed at 400 nm using Varian Cary 50 spectrometer equipped with a 1 cm path length fiber optics probe at  $24 \pm 1$  °C. Turbidimetric titrations were carried out by adding hyaluronan solution at different concentration (0.3 and 0.5 g/l) to surfactant solutions of Septonex or CTAB at concentration 3 mmol/l.

Interaction between hyaluronan and surfactants were studied using titration experiments by adding hyaluronan at concentration 5 g/l to surfactant solutions at concentration 5 mmol/l. All measurements were carried out by Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) and Autotitrator MPT-2 (Malvern Instruments) at 25 °C. Particle size distributions and zeta potentials were obtained. All Zetasizer units provide a  $z$ -average figure which is the intensity weighted mean hydrodynamic size of the ensemble collection of particles measured by dynamic light scattering.

Effect of hyaluronan molecular weight on solubilization ability of surfactant-hyaluronan system was studied using Sudan Red G dye and was evaluated by UV-VIS spectroscopy. Septonex concentration series was prepared in aqueous solution (including concentration of 2, 5, 10, 15 and 20 mmol/l). Final hyaluronan concentration in the samples was 0.1 g/l. The samples were prepared as supersaturated solution of Sudan Red G dye because of calculation of dye maximum concentration that can be solubilize in the systems.

## Results and discussion

Turbidimetric titration was chosen as indicator of the loss of intensity of transmitted light due to the scattering effect of particles associated from hyaluronan and surfactant suspended in it. Hyaluronan was added to the surfactant solution at concentration 3 mmol/l. This concentration ensures that a micelle aggregates are presented in the systems. Critical micelle concentration of CTAB is reported as  $0.98 \pm 0.01$  mmol/l [6] and of Septonex as  $0.78 \pm 0.01$  mmol/l [7]. During the

titration surfactant concentration decreases while hyaluronan concentration increases and it can be study what is going on in the system with components and if they interact to each other.

Fig. 1 shows turbidimetric titration curves of hyaluronan at low molecular weight (13 kDa) with surfactant CTAB or Septonex. The concentration of titrant (hyaluronan) was 0.3 and 0.5 g/l. Obtained data indicate that hyaluronan and surfactant interact due to electrostatic attraction forces and that aggregates of these components are formed in the system. An abrupt increase in turbidity was observed, indicating the onset of macroscopic phase separation. This change is in the Fig. 1 represent by breaks on the curve which corresponds with intersection of linear fitting of linear parts of graphs. The slope for the hyaluronan-micelle solutions was always zero at low hyaluronan concentration in the system. Above this aggregation point, slope is increased and depends on composition of the systems. It was found that aggregation starts at surfactant concentration above critical micelle concentration, so we can consider the presence of the micelle aggregates in the system, which can be coated by hyaluronan.

It is revealed that aggregates formation (turbidity increasing) depends on hyaluronan concentration while type of studied cationic surfactant affects interactions insignificantly.

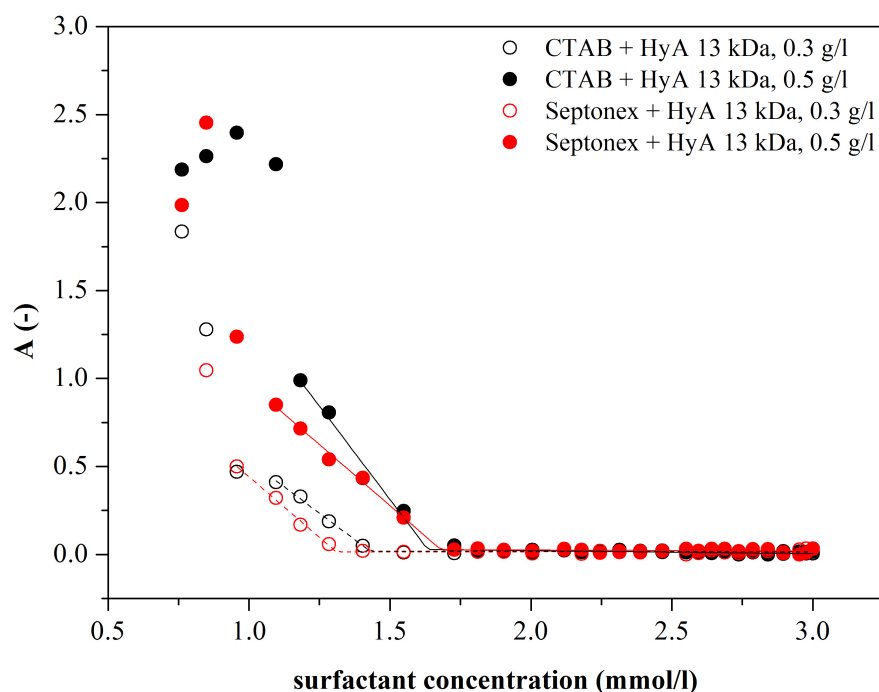


Fig. 1 Turbidimetric titration graph for adding hyaluronan 13 kDa (0.3 or 0.5 g/l) to CTAB or Septonex at concentration 3 mmol/l

In Fig. 2 is shown turbidimetric titration curves for hyaluronan molecular weight 117 kDa with surfactant CTAB or Septonex. It was found that an abrupt increase in turbidity occurs at slightly lower surfactant concentration and higher hyaluronan concentration than in the case of low molecular weight hyaluronan. Molecular weight of hyaluronan influences interactions between components and titrant concentration influences turbidity increasing. In the case of high molecular weight of hyaluronan – 1635 kDa (data not shown) aggregation starts almost immediately after addition of hyaluronan to the surfactant solution, at very low hyaluronan concentration. It is clear that micelle-hyaluronan complexes have different structure depending on length of hyaluronan chain that is a correlative of number of negative charge in the system.

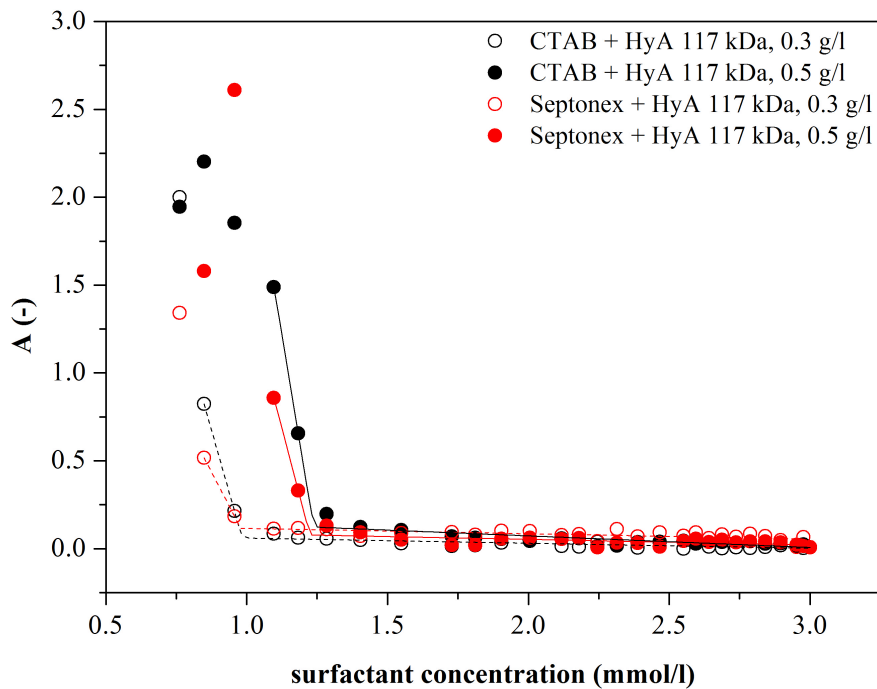


Fig. 2 Turbidimetric titration graph for adding hyaluronan 117 kDa (0.3 or 0.5 g/l) to CTAB or Septonex at concentration 3 mmol/l

Interaction between hyaluronan and surfactant were studied using dynamic light scattering method by titration experiments. Hyaluronan was added gradually to surfactant solution and interactions were evaluated from the point of view of size distributions and zeta potential values. These parameters as a function of hyaluronan concentration are presented in Fig. 3. The samples were measured in triplicate immediately after mixing of component. The pure Septonex solution containing only surfactant micelle aggregates had a zeta potential of about 30 mV.

Fig. 3 shows a way the size and zeta potential change as a function of hyaluronan content. The size of aggregates in the system after adding of hyaluronan into the surfactant solution was in the range of 200 and 500 nm. The size increases in the region of isoneutrality, when the zeta potential curve crosses zero (see in Fig. 3) but it could not be measured because the mean size of the complexes increased the values beyond the reliable limit for the equipment. We can clearly observe precipitates in the sample. These data is not shown because of better display of remaining data.

Zeta potential decreases mostly linearly during titration experiments, ending values were  $-25.9 \pm 0.2$  mV or  $-41.5 \pm 0.2$  mV depending on molecular weight of hyaluronan. These values generally indicate high stability of the colloid systems.

In addition, it was found that hyaluronan molecular weight has inconsiderable effect on achievement of region of system isoneutrality.

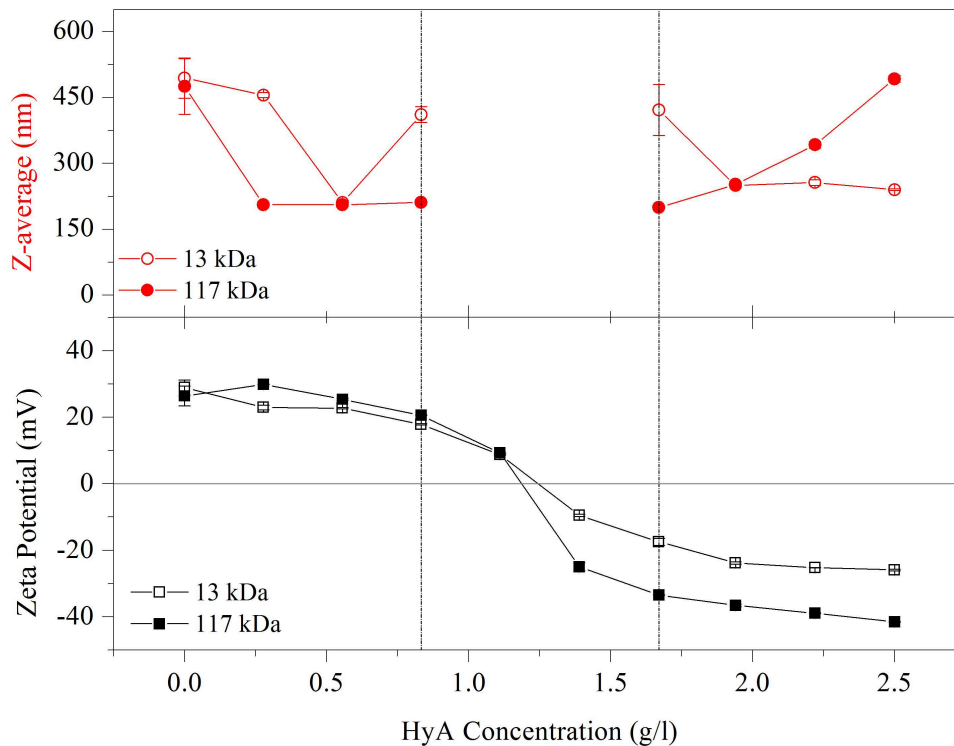


Fig. 3 Additive titration graphs for experiment using hyaluronan at concentration 5 g/l as titrant, initial concentration of surfactant Septonex was 5 mmol/l. Top: zeta potential. Bottom: average hydrodynamic diameter (z-average, intensity-weighted). The error bars correspond to the standard deviation of three independent experiments; the straight lines are just a visual guide.

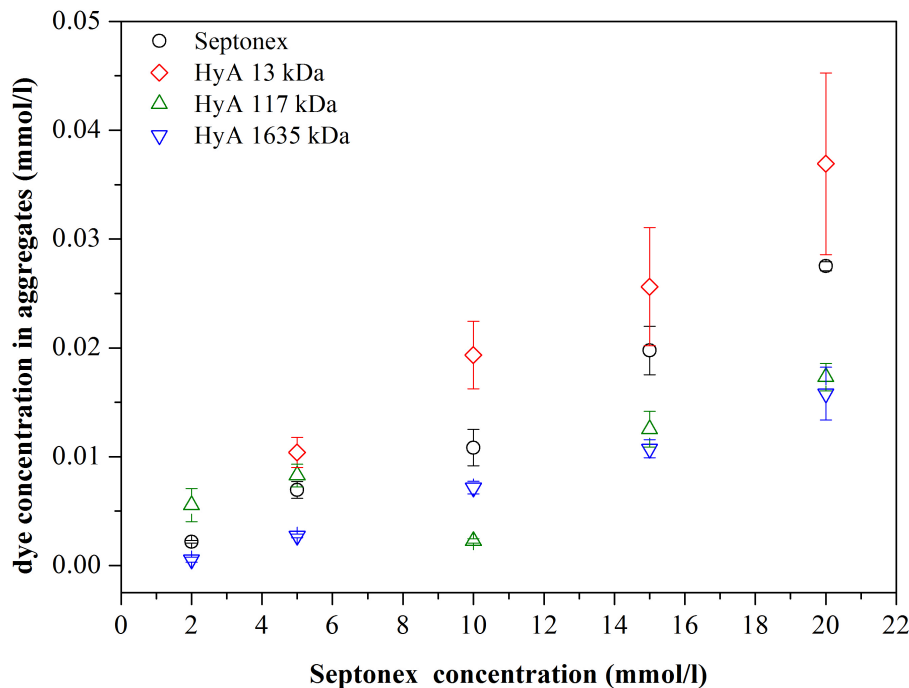


Fig. 4 Sudan Red G concentration solubilized in aggregates of Septonex or Septonex-hyaluronan complexes depending on Septonex concentration in the system, hyaluronan concentration in the system was 0.1 g/l.

Effect of hyaluronan molecular weight was studied by solubilization experiments (Fig. 4). It was found that molecular weight of hyaluronan has significant effect on solubilization of Sudan Red G dye. Concentration of solubilized dye increases with increasing concentration of surfactant. Hyaluronan concentration in the system was 0.1 g/l. It is shown that hyaluronan molecular weight 117 and 1635 kDa decreases solubilization ability of micelle-like aggregates in the system while low molecular weight hyaluronan slightly increases this ability. Our hypothesis is that higher molecular weight of hyaluronan coated micelle aggregates and impedes dye solubilization whereas low molecular weight hyaluronan has too short chain for coating of micelle. By contrast, it seems that low molecular weight hyaluronan support the solubilization process.

In Fig. 4 one point is omitted. Sample of this hyaluronan-surfactant concentration combination is phase separated and Sudan Red G dye is absorb in gel phase and therefore it could not be measured using UV-VIS spectrophotometry.

## Summary

Interactions of micelles with hyaluronan were investigated because of biocompatibility enhancement of this type of surfactant aggregates. There were several combinations of concentration of components compared. Effect of molecular weight of hyaluronan was studied. The result of our experiments showed that these systems are very dynamic and that composition of the system and hyaluronan molecular weight influences the interaction of components, structure of complexes and stability of aggregates. In the following experiments is important focus on all of these parameters.

## Acknowledgement

This work is supported by project Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development, REG LO1211, with financial support from National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports).

## References

- [1] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*. 2014, **10**(4): 1558-1570.
- [2] Girish K. S. and K. Kemparaju. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 80, 1921-1943 (2007).
- [3] Balazs, E. A. Therapeutic use of hyaluronan. *Structural Chemistry*, 20, 341-349 (2009).
- [4] Rao, J. Prasad a Kurt E. Geckeler. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 36, 887-913 (2011).
- [5] Dian-shu Yin, Wan-yun Yang, Zhi-qiang Ge, Ying-jin Yuan, A fluorescence study of sodium hyaluronate-surfactant interactions in aqueous media, *Carbohydrate Research*, 340, 1201-1206 (2005).
- [6] VENEROVÁ, Tereza. *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul*. Brno, 2014. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [7] CIMALOVÁ, Jana. *Ionokomplexy hyaluronanu*. Brno, 2013. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## **Applied Chemistry in Solving of Production Goals**

10.4028/www.scientific.net/MSF.851

## **Interaction between Cationic Micelles and Hyaluronan**

10.4028/www.scientific.net/MSF.851.26

### **DOI References**

[1] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*. 2014, 10(4): 1558-1570.

10.1016/j.actbio.2013.12.019

[2] Girish K. S. and K. Kemparaju. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 80, 1921-1943 (2007).

10.1016/j.lfs.2007.02.037

[3] Balazs, E. A. Therapeutic use of hyaluronan. *Structural Chemistry*, 20, 341-349 (2009).

10.1007/s11224-009-9435-y

[4] Rao, J. Prasad a Kurt E. Geckeler. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters. *Progress in Polymer Science*. 36, 887-913 (2011).

10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001

[5] Dian-shu Yin, Wan-yun Yang, Zhi-qiang Ge, Ying-jin Yuan, A fluorescence study of sodium hyaluronate-surfactant interactions in aqueous media, *Carbohydrate Research*, 340, 1201-1206 (2005).

10.1016/j.carres.2005.01.017