



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

INTERAKCE HYALURONANU S TENZIDEM CAE

INTERACTION OF HYALURONAN WITH SURFACTANT CAE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jan Trtek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1156/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Jan Trtek**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Interakce hyaluronanu s tenzidem CAE

Zadání diplomové práce:

1. Změření dat ultrazvukovou spektroskopií, kalorimetricky a denzitometricky
2. Vyhodnocení dat a diskuze k naměřeným datům

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

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

Bc. Jan Trtek
student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium interakcí mezi hyaluronanem o různých molekulových hmotnostech s tenzidem CAE. Tato povrchově aktivní látka nemá dané přesné složení a není známa ani její molekulová hmotnost. Jedním z hlavních parametrů nutných pro popis interakcí mezi tenzidem a hyaluronanem je stanovení kritické micelární koncentrace, avšak ani tato hodnota není pro CAE zatím známá. Všechna měření byla prováděna pro roztoky ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 M NaCl.

Určení molekulové hmotnosti této povrchově aktivní látky bylo prováděno technikou SEC–MALS–dRI. Pro určení kritické micelární koncentrace byly zvoleny techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jako doplňková metoda byla zvolena technika tenziometrie. Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a denzitometrické metody byly pozorovány interakce tenzidu CAE s polysacharidem hyaluronanem. Z ultrazvukové rychlosti a hustoty byla vypočítána stlačitelnost.

Klíčová slova

hyaluronan, tenzid, CAE, ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, SEC-MALS

Abstract

The diploma thesis is focused on the study of interactions between hyaluronan of various molecular weights with CAE surfactant. This surfactant does not have the exact composition and there is not known their molecular weight. One of the main parameters needed to describe the interactions between surfactant and hyaluronan, there is the determination of critical micellar concentration. The value of critical micellar concentration of CAE is not known yet. All measurements were made for solutions in aqueous solution and 0.15 M NaCl.

The determination of the molecular weight of this surfactant was performed by the technique SEC-MALS-dRI. High resolution ultrasonic spectroscopy was chosen to determine the critical micellar concentration and tensiometry was chosen as a complementary method. The interactions of CAE surfactant with polysaccharide of hyaluronan were showed by high resolution ultrasonic spectroscopy and densitometry. Compressibility was calculated from ultrasonic velocity and density.

Keywords

Hyaluronan, surfactant, CAE, high resolution ultrasonic spectroscopy, SEC-MALS

Citace

TRTEK, J. Interakce hyaluronanu s tenzidem CAE . Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 75 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D..

Prohlášení

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

.....
Bc. Jan Trtek

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé diplomové práce Ing. Andrei Kargerové Ph.D. za trpělivost a cenné rady při měření na ultrazvukovém spektrometru. Dále bych rád poděkoval Ing. Jitce Krouské Ph.D., Ing. Michalu Kalinovi Ph.D. a Ing. Adamu Juglovi za pomoc při měření na přístrojích, které byly v této práci použity. V neposlední řadě bych rád také poděkoval společnosti DUK-PC za rychlou výměnu harddisku, bez kterého bych tuto práci nemohl dokončit.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Kyselina hyaluronová	8
2.1.1 Historie	8
2.1.2 Charakteristika kyseliny hyaluronové	9
2.1.3 Chemická struktura hyaluronanu	10
2.1.4 Syntéza hyaluronanu	10
2.1.5 Chování v roztoku	11
2.1.6 Aplikace hyaluronanu	13
2.2 Tenzidy	14
2.2.1 Obecná charakteristika	14
2.2.2 Kritická micelární koncentrace	15
2.2.3 Tvar micel	15
2.2.4 Solubilizace	16
2.2.5 CAE	17
2.2.6 Interakce hyaluronan-kationtový tenzid	17
2.3 ULTRAZVUKOVÁ SPEKTROSKOPIE S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM	19
2.3.1 Princip ultrazvukového spektrometru	19
2.3.2 HRUS	20
2.4 Současný stav řešené problematiky	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Použité chemikálie	28
3.2 Příprava roztoků	28
3.2.1 Příprava zásobních roztoků	28
3.2.2 Zásobní roztok NaCl	28
3.2.3 Zásobní roztok hyaluronanu	28
3.2.4 Zásobní roztok CAE	29
3.3 Měření ultrazvukové rychlosti a zeslabení	30
3.3.1 Měření v kinetickém režimu	31
3.3.2 Měření v titračním režimu	31
3.4 Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti denzitometricky	32

3.5	Měření povrchového napětí	34
3.6	Stanovení molekulové hmotnosti CAE.....	35
3.7	Okometrické pozorování interakce hyaluronan-CAE.....	35
3.8	Vyhodnocení dat a diskuze	36
3.8.1	Stabilita roztoku CAE pomocí ultrazvukového spektrometru.....	36
3.8.2	Titrace na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením.....	38
3.8.3	Interakce hyaluronan-CAE ultrazvukovou spektroskopií	40
3.8.4	Charakterizace interakcí denzitometrií.....	46
3.8.5	Měření povrchového napětí pro určení CMC.....	50
3.8.6	Okometrické pozorování titrací CAE	52
3.8.7	Určení molekulové hmotnosti CAE	54
4	Závěr	56
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATY	58
6	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
7	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

Hyaluronan, neboli kyselina hyaluronová, je významným polysacharidem, který lidstvo zná již několik desetiletí. Poprvé byl popsán Karlem Meyerem a jeho kolegou Johnem Palmerem v roce 1934, kdy se jim tento glykosaminoglykan podařilo izolovat z očního sklivce. Tato látka je lidskému tělu vlastní a plní řadu důležitých funkcí. Nachází se v očním sklivci, synoviální tekutině kolenních kloubů a spoluutváří i šlachy a vazy. Nádorové buňky ovšem také obsahují určité množství hyaluronanu. V posledních několika letech jsou vlastnosti a následné využití zkoumány hlavně v oblasti medicínských aplikací této látky.

V současné době je hyaluronan přidáván do léčiv, např. nosních sprejů na zvlhčení sliznice. Tato látka se využívá i v kosmetickém průmyslu na potlačení známek stárnutí a po plastických operacích na podporu hojení ran. Tyto účinky hyaluronanu však nejsou dostatečně ověřeny. [1]

Diplomová práce navazuje na předchozí práce, které byly vydány pod záštitou Fakulty chemické. Tyto práce byly zaměřeny na interakce kationtových tenzidů o známé struktuře. V této práci je však na rozdíl od ostatních zkoumán tenzid CAE, který je v dostupné literatuře pouze částečně popsán. Jako hlavní metoda pro studium těchto interakcí je použita metoda ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením, jenž je velmi citlivá a umožňuje měření v titračním režimu. Doplňkovými metodami jsou tenziometrie, SEC–MALS–dRI a denzitometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Historie

Karl Meyer s tehdejším kolegou Johnem Palmerem jako první v roce 1934 popsali způsob izolace doposud neznámého glykosaminoglykanu z očního sklivce hovězího skotu, který obsahovala dvě rozdílné molekuly cukru. Jedna z nich byla uronová kyselina. Pro takto izolovanou látku navrhli označení „kyselina hyaluronová“. Tento název je odvozen od výše zmíněné uronové kyseliny a první část je z řeckého slova „hyalos“ – sklo. V roztoku o fyziologickém pH dochází k disociaci karboxylových skupin, a proto by se spíše mělo používat označení hyaluronát. V běžné praxi je ovšem nyní tato molekula označována jako hyaluronan, aby byla ihned zřejmá její polysacharidová podstata. [2], [3]

V roce 1950 popsal Karl Meyer do podrobných detailů chemickou strukturu kyseliny hyaluronové. Na základě těchto poznatků bylo dokázáno, že se v organismu vyskytuje ve formě sodné nebo jiné soli této kyseliny. Během následujících let byl hyaluronan izolován také z mnoha jiných zdrojů, jako jsou kohoutí hřebínky, kůže, nebo pupečnicková šňůra. Takto získaná kyselina hyaluronová měla vysokou molekulovou hmotnost. Z důvodů průmyslové výroby byla kladena důležitost i na výrobu této látky o nižší molekulové hmotnosti. Toto bylo prováděno tak, že ze zmražených kohoutích hřebínek nebo pupeční šňůry byly odstraněny buněčné stěny buněk, které obsahovaly kyselinu hyaluronovou. Poté následovala extrakce vodou a výsledná kyselina hyaluronová byla vysrážena organickým rozpouštědlem (např. ethanol). [4]

V roce 1972 bylo zjištěno, že hyaluronan dokáže interagovat s molekulami proteinové povahy. Od roku 1986 se používá právě označení hyaluronan, aby došlo ke zdůraznění sacharidové struktury. Platí, že hyaluronan je obecný pojem. Oproti tomu kyselina hyaluronová označuje přímo kyselinu a hyaluronát její sůl. [2], [5]

V poslední době se také pro výrobu hyaluronanu používají bakterie *Streptococcus zoopidemicus* nebo *Streptococcus equi*, které mají ve své struktuře bakteriálního obalu obsaženou kyselinu hyaluronovou vykazující velmi vysokou čistotu. Hyaluronan získaný z bakterie *Streptococcus equi* má nižší molární hmotnost než získaný z druhu *zoopidemicus*. Česká republika má významného producenta kyseliny hyaluronové ve firmě Contipro Biotech s.r.o. v Dolní Dobrouči. [6], [7]

2.1.2 Charakteristika kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je v přírodě se vyskytující polysacharid, jenž je složen z opakujících se disacharidových jednotek. Molekulová hmotnost, jedinečné uspořádání a reologické vlastnosti dovolují kyselině hyaluronové plnit důležitou roli v organismech. Molekulová hmotnost může dosahovat až hodnot 10^7 Da. Je také vhodná pro využití v medicíně jako velmi zajímavý biomateriál. [8], [9]

Svou konzistencí a pozitivním vlivem na tkáně se kyselina hyaluronová používá v prostředcích na péči o pleť jako hydratační složka. Což je způsobeno tím, že tato látka vykazuje vysokou schopnost navázat vodu a lubrikovat pohyblivé části těla (klouby, svaly). Tato molekula je jednou z nejvíce hydrofilních molekul, a proto může být označena jako přírodní hydratační látka. V tkáních funguje jako materiál pro udržení vodní homeostázi, reguluje propustnost různých jiných látek vytvořením sterické zábrany. Váže se také na extracelulární proteiny a ovlivňuje tak buněčnou signalizaci. Tyto interakce zprostředkovávají kaskády řady signalizačních dějů v buňce (proliferace, morfogeneze). [2], [10], [12]

Ukázka schopnosti kyseliny hyaluronové vázat velké množství vody je demonstrována na **Obrázku 1**.

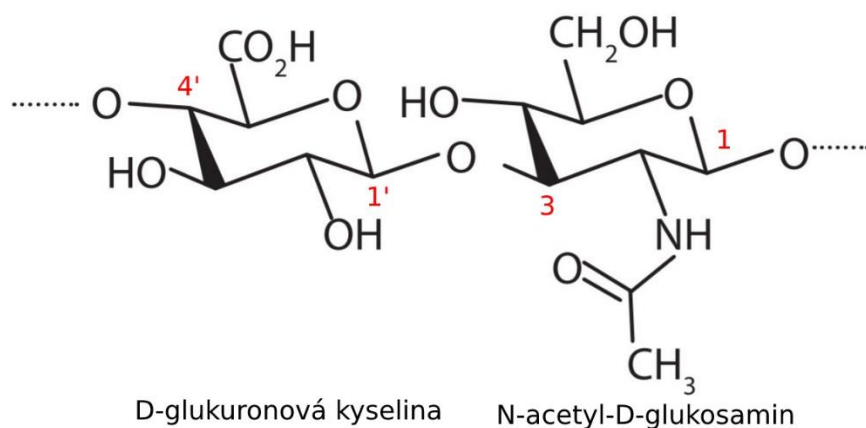


Obrázek 1: List kyseliny hyaluronové, na jehož jeden konec byla aplikována voda. [11]

2.1.3 Chemická struktura hyaluronanu

Kyselina hyaluronová je nevětvený mukopolysacharid tvořený disacharidovými podjednotkami, kterými jsou D-glukuronová kyselina a N-acetyl-D-glukosamin. Tyto jednotlivé monosacharidy jsou spojeny β (1'-3) glykosidickou vazbou a jednotlivé disacharidy glykosidickou vazbou β (1-4'). Glykosaminoglykany mohou být volné nebo jsou součástí extracelulární matrix. Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů, které se nachází v mezibuněčné hmotě (např. heparin či chondroitin), neobsahuje sulfátovou skupinu. Pokud je obsah hyaluronanu ve vodě 10 mg/ml, dochází ke zvýšení viskozity vody přibližně 5 000násobně. Velikost řetězce hyaluronanu se pohybuje v rozmezí od 0,2 do 10 MDa, přičemž nejčastěji je jeho velikost 2-5 MDa. [13]

Základní vazbu v disacharidové jednotce znázorňuje **Obrázek 2**.



Obrázek 2: Struktura kyseliny hyaluronové. [13]

Oba dva monomery jsou odvozeny od molekuly glukózy. Po bližším se zaměření na strukturu disacharidu vidíme, že hydroxylové a karboxylové části jsou v ekvatoriální poloze, na rozdíl od vodíkových atomů nacházejících se v axiální poloze. Do takového uspořádání molekula přechází, jelikož je to pro ni energeticky nejstabilnější konformace. [3]

2.1.4 Syntéza hyaluronanu

K syntéze kyseliny hyaluronové dochází pomocí enzymů přímo na plazmatické membráně. Ostatní GAG jsou tvořeny v Golgiho aparátu. Jako substráty zde vstupují monosacharidové jednotky aktivované uridindifosfátem, tedy UDP-glukuronová kyselina a UDP-N-acetylglukosamin. Syntéza takto objemného řetězce je pro buňku vysoce energeticky náročná, a proto je striktně enzymaticky regulována. Tato regulace je zajištěna hyaluronansyntázami (HAS1, HAS2 a HAS3). Z chemické podstaty se jedná o transmembránové proteiny, které se liší svou katalytickou aktivitou. Nejvíce aktivní je enzym HAS3, který řídí syntézu velkého množství nízkomolekulárních řetězců hyaluronanu. Zatímco

o syntézu vysokomolekulárního řetězce se starají méně aktivní HAS1 a HAS2. Daný enzym v membráně střídavě váže jednotlivé monosacharidové jednotky k redukujícímu konci řetězce. Nově nasyntetizovaný řetězec je vpraven do extracelulární matrix. [3], [14], [15]

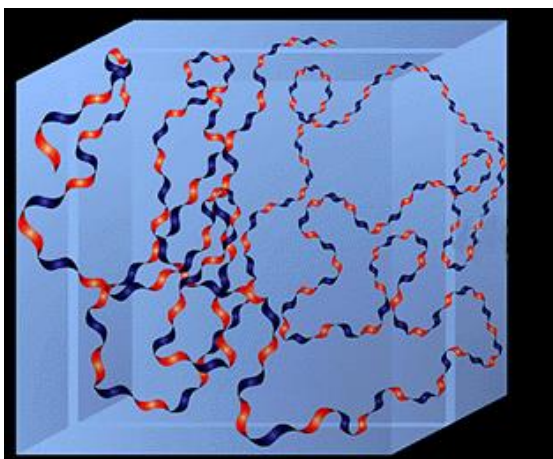
Jedna disacharidová jednotka má molekulovou hmotnost přibližně 400 Da. Počet opakujících se disacharidových jednotek v jednom řetězci může přesáhnout i 10 000. Z toho je zřejmé, že molekulová hmotnost celého řetězce může dosáhnout až například 4 000 000 Da. [3]

2.1.5 Chování v roztoku

Hyaluronan ve fyziologickém roztoku nabývá na pevnosti díky samotné struktuře disacharidu (částečná rotace kolem vnitřních glykosidických vazeb), interakcím hyaluronanu s rozpouštědlem a vnitřním vodíkovým vazbám. Následkem toho, že se v disacharidu nachází karboxylová skupina glukuronové kyseliny, dochází při pH 7 k disociaci. Na takto vzniklý polyaniont se vážou kationty (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+}), které zajišťují elektroneutrální charakter molekuly. Stupeň disociace ovlivňuje konformaci, tvar, hydrataci a délku řetězce hyaluronanu. Disociace je závislá na pH, iontové síle, teplotě a dostupnosti kationtů. Navázáním těchto kationtů dochází také k ovlivnění rozpustnosti. Pokud by byly všechny karboxylové skupiny esterifikovány methylovými skupinami, hyaluronan by byl ve vodě nerozpustný. [3], [16]

Jak bylo zmíněno v kapitole **2.1.3**, tak vodíky se nachází v axiální rovině, zatímco karboxylové a hydroxylové skupiny jsou v poloze ekvatoriální. Toto uspořádání umožňuje alespoň částečnou rotaci. Každý disacharidový úsek je stočen vůči sousedícím o 180° . Tetrasacharidová jednotka je tedy stočena o 360° . Toto uspořádání sekundární struktury je nazýváno „two-fold helix“, tedy dvakrát stočenou šroubovicí. Pravidelně se opakující hydrofobní a hydrofilní místa v řetězci tvoří základ pro možnost agregace těchto řetězců. [17]

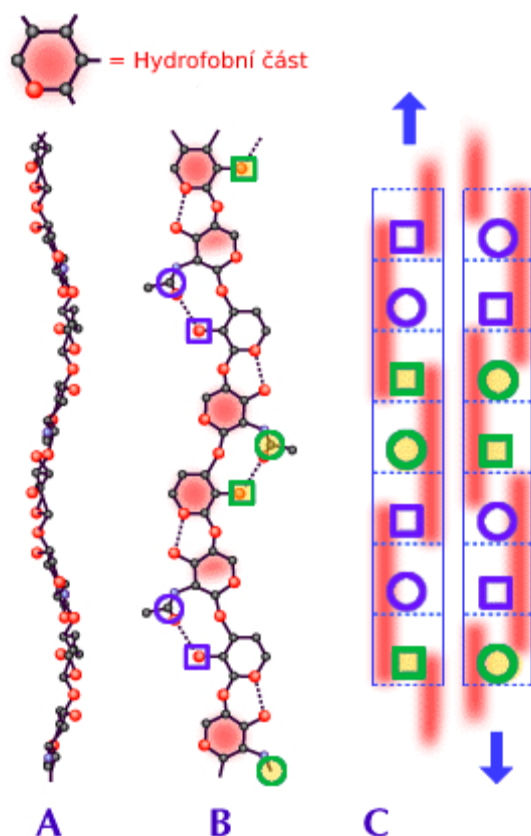
Ve fyziologickém roztoku tvoří tato molekula strukturu připomínající náhodně stočenou stuhu, která je znázorněna na **Obrázku 3**.



Obrázek 3: *Struktura hyaluronanu v roztoku připomínající stuhu. Opakují se zde hydrofilní (modrá) a hydrofobní (červená) disacharidové jednotky. [3]*

V důsledku přítomnosti polární a nepolární části v řetězci hyaluronanu, dochází k tomu, že molekula vytváří klubka. Tuhost těchto agregátů je dána přítomností vodíkových vazeb. Následkem tuhosti je možné zadržovat v těchto klubkách velké množství vody (až tisícinásobek své hmotnosti). [2]

Tímto shlukováním klubek dochází až k tvorbám spojené sítě. Toto se děje jako následek spojování hydrofobních částí antiparalelních řetězců jednotlivých molekul hyaluronanu. Antiparalelní spojení poskytuje celému řetězci vlastnost růst z obou stran. Na **Obrázku 4** v části A a B je znázorněna molekula hyaluronanu. Červené oblasti jsou hydrofobní části molekuly. Čtverce označují karboxylové skupiny, zatímco kruhy reprezentují acetamidovou skupinu. V části C je možné vidět antiparalelní konjugaci dvou řetězců hyaluronanu. Hydrofobní části se k sobě přiblíží, a následně vznikne vodíková vazba mezi skupinou acetamidovou a karboxylovou. [2], [16]



Obrázek 4: Hyaluronan a jeho možnost tvorby dvojitého antiparalelního řetězce. [16]

2.1.6 Aplikace hyaluronanu

Základní aplikační oblasti pro využití hyaluronanu a jeho derivátů jsou při chirurgických zákrocích k zajištění ochrany jemných tkání nebo vyplnění hlasivkových a hltanových tkání při poranění, aby se zabránilo adhezi a tvoření jizev. Dále je možné hyaluronan použít při léčbě artritidy k doplnění synoviální tekutiny nebo k hydrataci tkáňových povrchů před nadměrnou suchostí a podpoře hojení těchto tkání. Na základě unikátních vlastností našel hyaluronan uplatnění v medicínských odvětvích jako je diabetologie, revmatologie, oftalmologie, při hojení ran po chirurgických zákrocích nebo při zkrášlovacích terapiích. [18], [19]

V oftalmologii byl hyaluronan poprvé použit již na konci padesátých let minulého století jako náhrada za oční sklivec. V současnosti je přidáván do očních kapek, které zvlhčují oční sliznici. Také je přidáván do roztoků pečujících o kontaktní čočky [20]. V diabetologii se využívají hyaluronové scaffoldy modifikované různými proteiny a vitamíny při léčbě diabetologických jizev [21].

V širokém měřítku je hyaluronan využíván v terapiích, které mají za cíl minimalizovat vnější projevy stárnutí, jakými jsou například vrásky. Využívá se zde hydratačních a viskoelastických vlastností hyaluronanu, jelikož v průběhu stárnutí organismu klesá i obsah hyaluronanu v kůži. Nejúčinnější metodou pro účinnou terapii je injekční aplikace do kůže, ale lidský organismus

dokáže tento aplikovaný hyaluronan během půl roku rozložit, tudíž je nutné tuto terapii provádět opakovaně. [22]

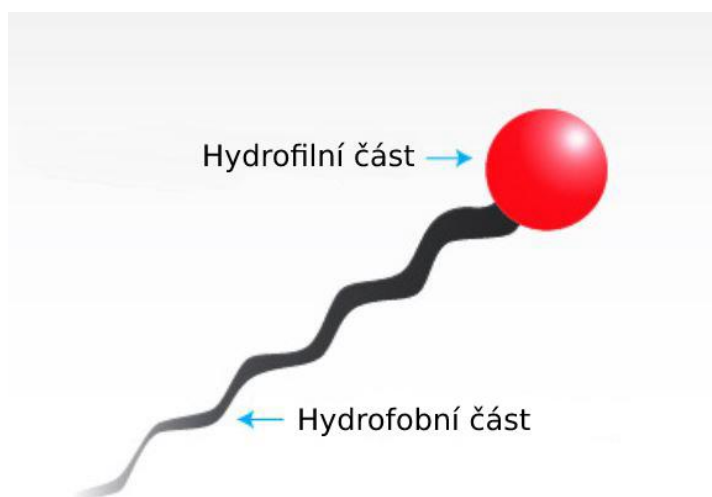
Při léčbě artritidy je aplikován zesíťovaný hyaluronan, který je injekčně vpraven do synoviální tekutiny, kde zvyšuje jeho viskozitu. Dochází ke zvýšení viskozity kloubního mazu, čímž je dosaženo efektivnějšího promazání kloubní chrupavky. [23]

Při hojení interních poranění je možné využít jako nosiče pro cílené uvolňování léčiva mikrovláknenné scaffoldy. Pro tkáňové inženýrství je možné tyto nanovláknenné scaffoldy rovněž použít. Avšak závisí na strukturální modifikaci hyaluronanu, aby organismus tuto látku nerozložil dříve, než se začne projevovat účinek medikamentu.

2.2 Tenzidy

2.2.1 Obecná charakteristika

Tenzidy neboli povrchově aktivní látky (PAL) patří mezi asociativní koloidy (micelární koloidy). Asociativní koloidy jsou některé nízkomolekulární látky, které ve vhodném rozpouštědle asociují při určité koncentraci do agregátů koloidních rozměrů. PAL se při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní a svými vlastnostmi snižují mezifázovou energii, což způsobuje především jejich specifická chemická struktura. Každý tenzid se skládá ze skupiny hydrofilní (lyofilní) a hydrofobní (lyofobní), přičemž hydrofilní skupiny vykazují silně polární charakter a mají vysokou afinitu k rozpouštědлу ($-\text{SO}_3\text{H}$ nebo $-\text{COOH}$). Hydrofobní skupiny jsou tvořeny dlouhými uhlovodíkovými řetězci a jsou v daném rozpouštědle prakticky nerozpustné. Tato struktura se nazývá amfifilní nebo amfipatická. [24], [25]



Obrázek 5: Obecná struktura tenzidu. [27]

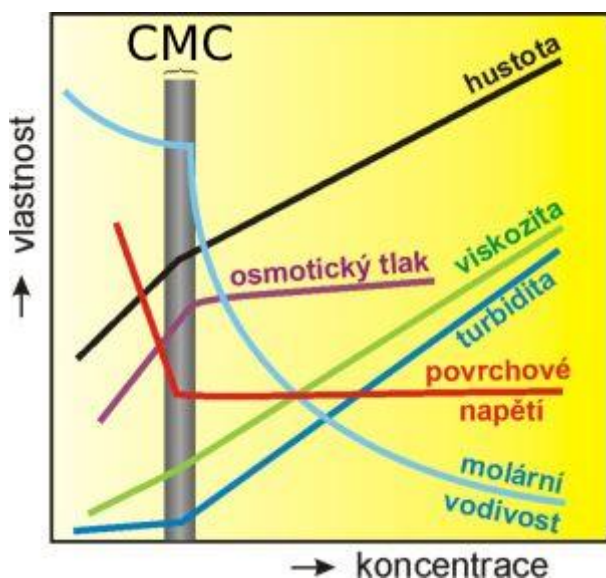
Díky svým schopnostem jako je smáčení, emulgace, pění a čištění mají tenzidy široké využití v praxi. Setkáváme se s nimi v kosmetice, čistících, pracích a mycích prostředcích. Důležitou roli mohou hrát i v medicíně jako nosiče léčiv. [26]

Podle schopností disociovat ve vodném roztoku se povrchově aktivní látky dělí na iontové a neiontové (nedisociují). Mezi iontové PAL patří sloučeniny aniontové, kationtové, amfoterní. Výsledný náboj amfoterních tenzidů závisí na pH roztoku. [25]

2.2.2 Kritická micelární koncentrace

Působením povrchově aktivní látky dochází ke snižování mezifázové volné energie. Jsou však i případy, kdy při použití dochází k opačnému jevu. Pokud je PAL rozpuštěn ve vodě v koncentraci vyšší, než je jeho kritická micelární koncentrace (CMC), vytvářejí se agregáty známé jako micely. [28]

V polárním rozpouštědle jsou hydrofobní části molekuly uschovány v jádře micely a hydrofilní skupiny tvoří vnější obal, aby se maximalizoval jejich kontakt s vodou. Naopak je tomu při rozpouštění v nepolárním rozpouštědle a tyto micely se poté nazývají jako inverzní. [25]



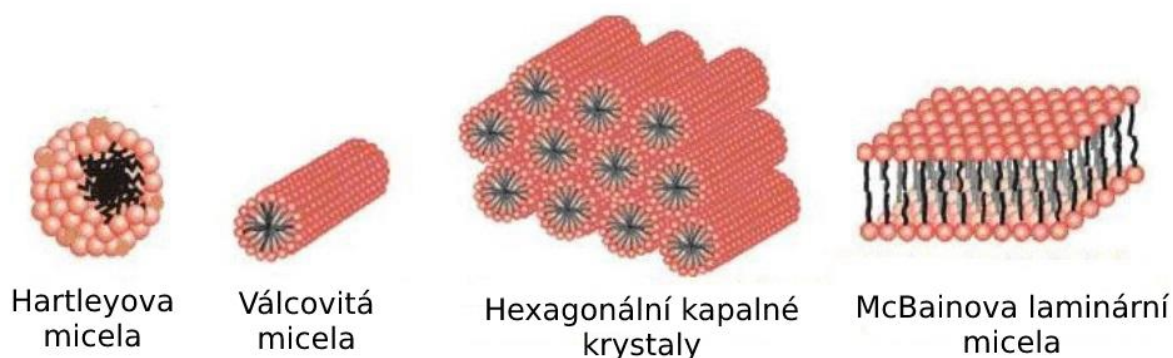
Obrázek 6: Ovlivnění vlastností roztoku po překročení CMC. [25]

2.2.3 Tvar micel

Velikost a tvar micel závisí na koncentraci a struktuře PAL, teplotě a na působících intermolekulárních interakcích. Agregačním číslem je rozuměno to, kolik molekul spoluutváří jednu micelu. Sférické Hartleyovy micely, mající tvar nepravidelné koule, se vyskytují ve zředěných vodných roztocích v koncentraci tenzidu mírně nad CMC. Poloměr takové micely takřka odpovídá délce jedné molekuly povrchově aktivní látky. Hodnota agregačního čísla je většinou mezi 50 a 150, zvyšuje se s délkou uhlovodíkového řetězce a snižuje se s velikostí

oblasti, jakou zaujímá jedna polární skupina na povrchu micely. Kritickou micelární koncentraci snižuje delší uhlovodíkový řetězec nebo přidání soli. Ke zvyšování CMC dochází zvyšováním teploty za současného snížení agregačního čísla. [25], [28]

Se zvyšující se koncentrací tenzidu dochází k tvorbě micel jiných tvarů. Dlouhé uhlovodíkové řetězce se poté orientují stále více rovnoběžně, čímž vznikají válcovité agregáty, hexagonální krystaly nebo útvary podobné lipidové dvojvrstvě v buněčné stěně (McBainovy micely). Tvar vzniklého agregátu závisí také na poměru velikosti a tvaru jednotlivých částí molekuly tenzidu. [25]



Obrázek 7: Schéma vlivu koncentrace tenzidu na tvar micel. [25]

2.2.4 Solubilizace

Důležitou vlastností micel, která je spojena s tvarem micel je solubilizace. Jedná se o schopnost zvýšit rozpustnost látek jinak v daném rozpouštědle nerozpustných. Nejčastěji se jedná o rozpuštění nepolární látky ve vodě, která se inkorporuje do jádra micely. Pokud je rozpuštěna polární látka, je solubilizována na povrchu micely. V laminárních micelách vstupují nepolární látky mezi hydrofobní řetězce a tím se molekuly tenzidu od sebe oddalují. U obrácených micel dochází taktéž k solubilizaci a to v prostředí vykazující nepolární charakter. Při solubilizaci se zvyšuje hmotnost micel tenzidu z důvodu inkorporace solubilizátu do micely, a také z nutnosti zvýšení počtu molekul tvořících micelu, v důsledku zvětšení objemu hydrofobního jádra. [25], [29]

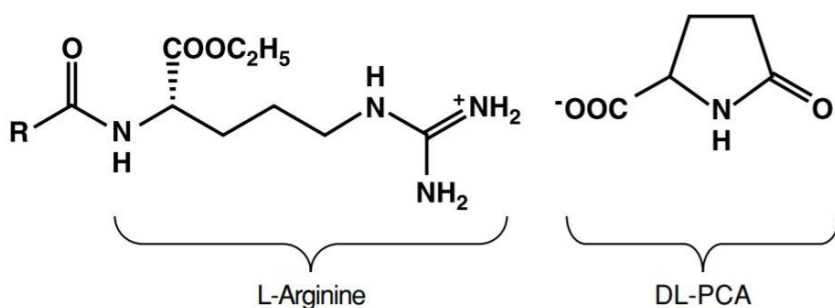
Této vlastnosti využívají prací a kosmetické prostředky, kdy je mastnota uzavřena do jádra micely a micely jsou z povrchu odstraněny následným oplachem. Trendem posledních desetiletí je inkorporovat do jádra micely medikament nebo vázané léčivo na polymerním nosiči. [29], [30]

2.2.5 CAE

CAE je kationtová povrchově aktivní látka, která je odvozená od L-argininu, mastné kyseliny a DL-pyrrolidonu. Jedná se o velmi bezpečnou látku vhodnou pro kosmetické prostředky. CAE je i ve vysoké koncentraci bezpečný pro kůži a oční sliznici. Tato látka vykazuje biodegradabilní charakter, přestože se jedná o kationtový tenzid. [31]

Hlavními aplikacemi tohoto tenzidu je kosmetický průmysl. CAE se adsorbuje na vlasy a působí jako kondicionér a také zabraňuje akumulaci statické elektřiny. Používá se také do tělových krémů, sprchových gelů, šampónů, rtěnek a přípravků na opalování. [31]

V současné době není publikován žádný článek, který by se zabýval tenzidem CAE. Není zveřejněna jeho molekulová hmotnost ani chování při interakcích s hyaluronanem.

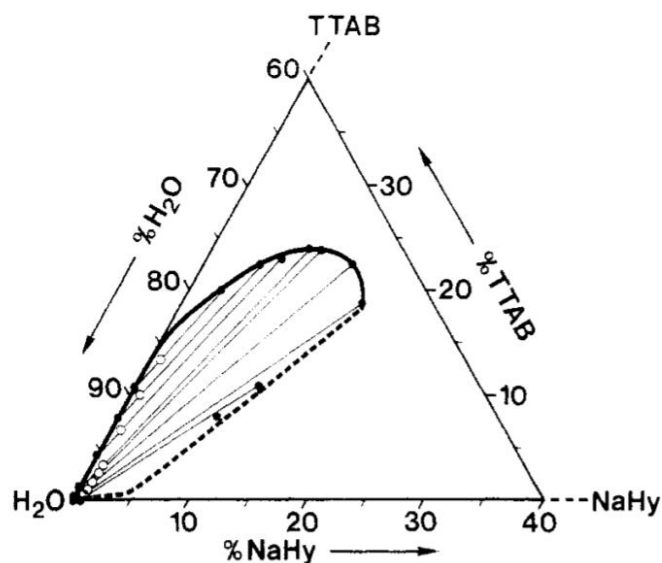


Obrázek 8: Chemický vzorec tenzidu CAE. [31]

2.2.6 Interakce hyaluronan-kationtový tenzid

Hyaluronan disponuje ve své struktuře karboxylovou skupinou, která je schopná disociace, což dává hyaluronanu charakter polyelektrolytu. Při fyziologickém pH jsou karboxylové skupiny v disociované formě a celá molekula je tedy polyaniontem. Ta nyní vyhledává kationtový iont, aby si molekula udržela neutrální náboj. Tato skutečnost je možností interakcí s kationtovými tenzidy. [6]

Vazba tenzidu na hyaluronan byla zjištěna pouze pro PAL s uhlovodíkovým řetězcem složeným z alespoň deseti uhlíkových atomů. Tato vazba je podstatně slabší, než je tomu u většiny ostatních elektrolytů, z důvodu nízké hustoty náboje na řetězci hyaluronanu. Při zvyšující se koncentraci tenzidu bylo zjištěno, že dochází k tvorbě sraženiny nebo gelové fáze. Fázový diagram tohoto systému obsahuje homogenní jednofázovou oblast obklopující dvoufázovou oblast situovanou v rohu fázového trojúhelníku, který je bohatý na vodu. Tento fázový trojúhelník je možné vidět na **Obrázku 9**. Čím delší je uhlovodíkový řetězec, tím větší je plocha dvoufázové oblasti. Molekulová hmotnost hyaluronanu neměla na velikost oblasti znatelný vliv. Tyto výsledky ukázaly silnou součinnost vazby tenzidu na makromolekulu hyaluronanu, což vedlo k tvorbě shluků podobným micelám. [32], [33], [34]



Obrázek 9: Fázový trojúhelník hyaluronan-TTAB-H₂O [33]

Aby bylo možné analyzovat jednotlivé složení fází, byly provedeny experimenty smícháním roztoku hyaluronanu a tenzidu s různou koncentrací. Jiný přístup ke studiu těchto interakcí se zaměřuje spíše na interagující molekuly po vzájemném přiblížení, z čehož je možné mít dynamičtější pohled na celý systém. K takovýmto experimentům byly využity metody konduktometrických a kalorimetrických titrací. [35], [36], [37]

Na základě měření pomocí techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením bylo zjištěno, že v systému tenzid-hyaluronan se nejedná pouze o ostrý přechod mezi jednofázovým/dvoufázovým stavem. Díky této velmi citlivé metodě bylo ve vodném prostředí odhaleno šest oblastí, kdy byly tvořeny komplexy mezi hyaluronanem a PAL. Tyto oblasti se lišily především v trendu závislosti ultrazvukové rychlosti na koncentraci tenzidu. [38]

2.3 ULTRAZVUKOVÁ SPEKTROSKOPIE S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM

Existuje mnoho spektroskopických metod pro charakterizaci kapalných vzorků. Valná většina z nich měří parametry vln procházejících analyzovaným vzorkem. Klasické metody (NMR, UV, VIS, IR atd.) jsou založeny na pozorování interakcí mezi elektromagnetickým zářením a zkoumaným vzorkem. Všechny tyto metody využívají frekvence elektromagnetického vlnění v infračervené, viditelné a ultrafialové oblasti. Hlavní nevýhodou těchto metod je skutečnost, že je zde nutnost měřit vzorek pro každou vlnovou délku zvlášť, což vyžaduje specifické optické prvky. Tyto optické prvky mohou být univerzální (na úkor citlivosti měření) nebo konstruované přímo na rozmezí určitých vlnových délek, čímž technika ztrácí na univerzálnosti. Metoda ultrazvukové spektroskopie však k analýze využívá zvukové vlny. Jedná se o vysokofrekvenční akustické vlnění o frekvenci 20–100 kHz. Tyto frekvence jsou velmi podobné nebo i vyšší těm, které používají delfini pro komunikaci nebo netopýři pro navigaci. Tato technika je založena na změně vlastností tohoto záření vyvolané jeho průchodem vzorkem. Zásadní výhodou tohoto typu spektroskopie je fakt, že ultrazvuková vlna dokáže proniknout většinou materiálů, a to dokonce i těmi, které jsou neprostupné pro elektromagnetické vlny. [39]

Vztahy mezi vlastnostmi materiálu a akustickými vlastnostmi byly studovány po několik desetiletí. Ultrazvukové techniky jsou v nedestruktivním zobrazování využívány celou řadu let. Využití ultrazvukových vln je známo především v oblasti medicíny a při měření vad u výrobků bez jeho porušení nebo poškození (defektoskopie). Díky významnému technickému pokroku na konci dvacátého století, je možné využít výhod ultrazvukových vln v oblasti koloidní chemie.

2.3.1 Princip ultrazvukového spektrometru

Ultrazvuková vlna je vlnou, která podléhá podélným deformacím. Dochází u ní ke kompresi a následné dekompresi, v závislosti na směru šíření této vlny. Jednotlivé molekuly na tuto skutečnost reagují změnou intramolekulárních sil. Jedná se o změnu v intramolekulárním odpuzování a přitahování, které vypovídají o elasticitě vzorku. Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením je natolik citlivá metoda, že dokáže tyto nepatrné změny přímo měřit. Tato technika je tedy založena na studiu interakcí ultrazvukové vlny se studovaným vzorkem. U této metody měření je možnost analyzovat dva parametry – ultrazvuková rychlost a ultrazvukové zeslabení. [40]

Rychlost ultrazvukové vlny je dána hustotou a elasticitou média. Elasticita obvykle dominuje, jelikož je velmi citlivá na změny v molekulární organizaci a na intramolekulárních

interakcích. Pevné látky mají nejsilnější mezimolekulární interakce, následují kapaliny a plyny. Na základě toho pevné látky vykazují nejvyšší modul pružnosti ve srovnání s kapalinami a plyny. Z tohoto důvodu zvuková vlna prochází nejrychleji pevnými látkami. [40], [44]

Ultrazvuková vlna má jako každý periodický svoji amplitudu. Ta se sníží při průchodu vzorkem, kdy ultrazvuková vlna ztrácí část své energie. Ultrazvukové zeslabení je mírou této ztráty. V době komprese ultrazvukové vlny při interakci se vzorkem dochází ke stlačení vzorku. Naopak v období dekomprese je vzorek rozvolňován, což je spojeno s absorpcí energie. Na základě této vlastnosti je možné pozorovat kinetiku chemické reakce a dělení částic v emulzích a suspenzích. U heterogenních vzorků je hodnota ultrazvukového zeslabení způsobena rozptylem ultrazvukové vlny na dispergovaných částicích. Rozptyl vlny na těchto částicích vede ke snížení amplitudy procházející vlny. Při měření ultrazvukové rychlosti je žádoucí vysoké rozlišení měření, kterého nelze dosáhnout u objemných vzorků z důvodů nemožnosti udržování konstantní teploty. [39], [40], [42]

2.3.2 HRUS

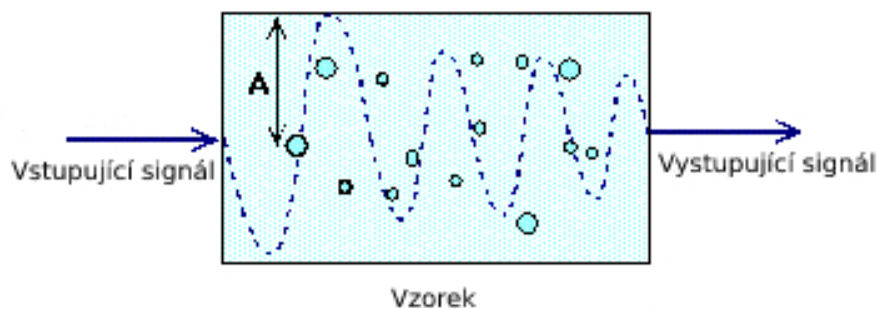
Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HRUS), z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy, je novou technikou pro studium materiálů na základě měření parametrů ultrazvukových vln procházejících vzorkem. Tato metoda je založena na měření rychlosti a zeslabení akustických vln při vysokých ultrazvukových frekvencích šířících se zkoumaným materiálem. Díky této technice je možné přímé a nedestruktivní měření beze změny stavu vzorku. Hlavní výhodou této techniky je schopnost procházet opticky netransparentním materiálem (barevný, dokonce i neprůhledný).

Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením je konstruován především pro měření ultrazvukové rychlosti a ultrazvukového zeslabení s vysokým rozlišením. Výhodou ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením není jenom jeho vysoké rozlišení, ale také možnost výběru mezi třemi měřicími módy. Jedná se o kinetické, titrační a měření v režimu teplotního skenu.

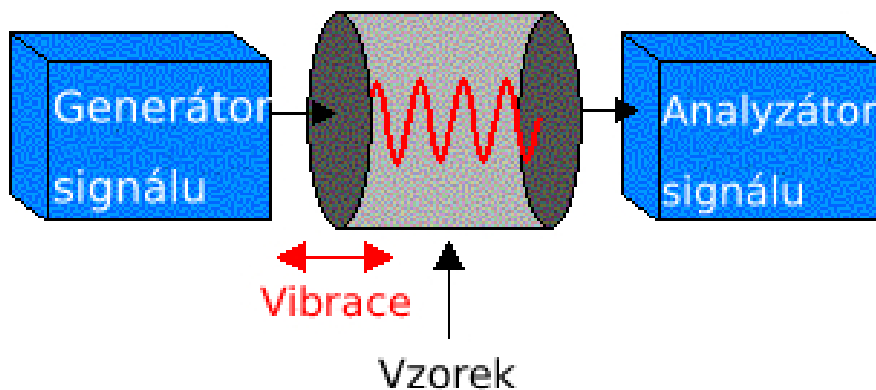
2.3.2.1 Princip měření HRUS

Měřený vzorek metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením je založen na měření rychlosti ultrazvukové vlny a změně její amplitudy. Standardní měření v tomto typu spektrometru jsou realizována jako komparativní. Což lze chápat tak, že měření probíhá v referenční cele, kde se nachází čisté disperzní prostředí, a také v měřicí cele obsahující zkoumaný vzorek. Rozdíl mezi hodnotami rychlosti a zeslabení v jednotlivých celách se poté využívá k vyhodnocení měření. Hlavní výhodou tohoto typu přístroje je možnost kontinuálního měření při několika vybraných ultrazvukových frekvencích.

Akustická vlna je generována piezoelektrickým převodníkem na jedné straně cely a ve změněné podobě detekována druhým piezoelektrickým převodníkem na straně druhé. První převodník mění elektrický signál z řídicího počítače na ultrazvukovou vlnu, zatímco druhý převodník koná proces opačný. Ze změny amplitudy ultrazvukové vlny prošlé, lze vyvodit vlastnosti zkoumaného vzorku, jak znázorňuje **Obrázek 10**. Schéma umístění piezoelektrických převodníků a cely, kterou prochází ultrazvuková vlna je možné vidět na **Obrázku 11**.



Obrázek 10: Změna amplitudy ultrazvukové vlny při průchodu vzorkem. [43]



Obrázek 11: Princip měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením. [43]

Je známo, že hodnota zeslabení zvukové vlny je nezávislá na teplotě. Což neplatí pro ultrazvukovou rychlost vlny procházející vzorkem. [45]

2.3.2.2 Využití HRUS

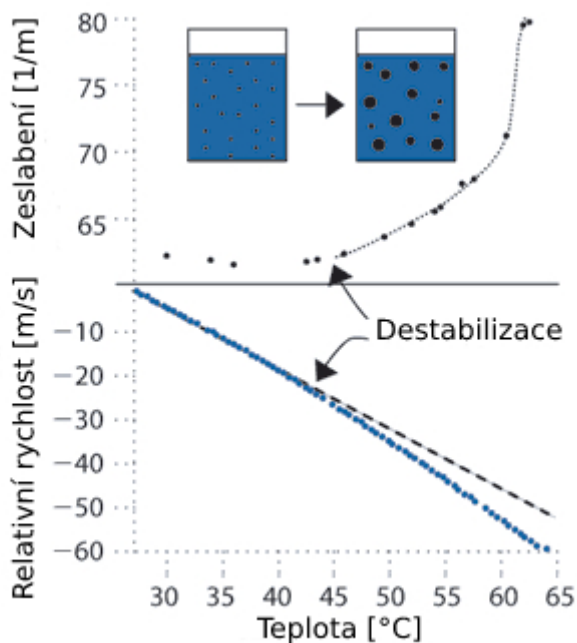
Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením disponuje celou řadou možných aplikací pro sledování velmi slabě detekovatelných chemických reakcí.

HRUS nachází uplatnění při studiu:

- Stability farmaceutických emulzí
- Procesů tvorby gelů
- Biochemických reakcí
- Charakterizace pektinu a pektátu

Studium stability farmaceutických emulzí

Na základě hodnot ultrazvukového zeslabení získaných především při měření v teplotním režimu je možné určit stabilitu, životnost a také ideální podmínky pro skladování a použití těchto emulzí. Při zvyšující se teplotě dochází u emulzí k restrukturalizaci a tím pádem i k zvýšení hodnot ultrazvukového zeslabení. V tomto experimentu byl použit jako vzorek emulze voda/olej. Na **Obrázku 12** je možno vidět markantní změnu hodnot ultrazvukového zeslabení, když teplota přesáhne 44 °C. Zvýšení ultrazvukového zeslabení může být přičítáno flokulaci vodních kapeček, což je vyvoláno zvyšující se teplotou. [46]

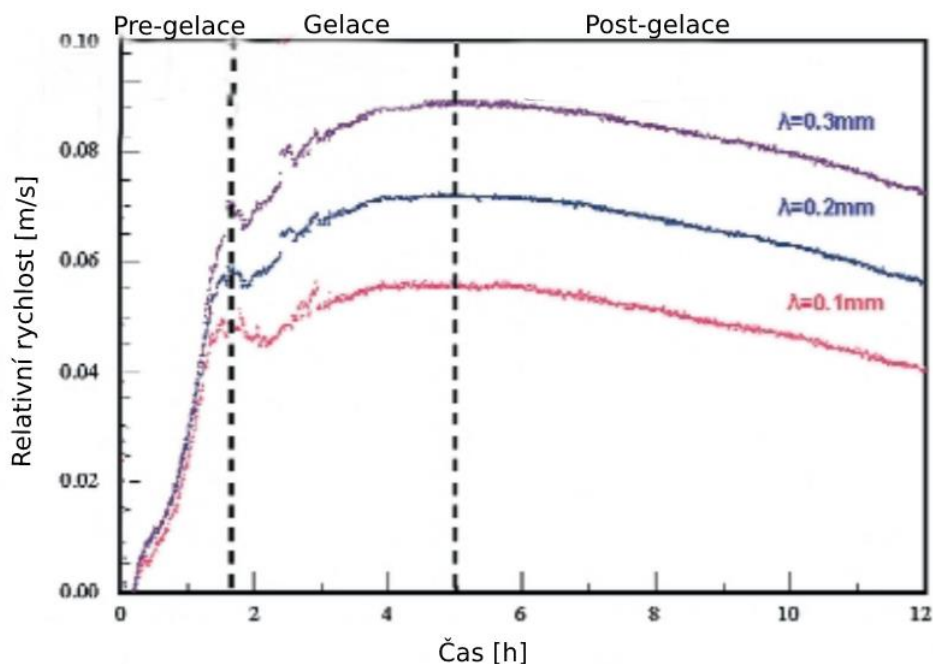


Obrázek 12: Analýza stability farmaceutických emulzí [46]

Studium tvorby gelů

Při studiu tvorby gelů pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením bylo v jednom z mnoha jiných případů studován proces tzv. „studeného okyselení“ bílkovin pomocí 2 % GDL (glukonolakton). V potravinářském odvětví též označován jako E575. Na **Obrázku 13** je možné zaznamenat po uplynutí 80 minut od okyselení velký nárůst relativní ultrazvukové rychlosti, což způsobuje vznik agregátů v roztoku. Po 110 minutách dochází ke gelaci a následně je tvořen síťovaný gel. Po pěti hodinách se ultrazvuková rychlost dostane do roviny, jakmile je dokončena tvorba gelové sítě. Pokles v relativní ultrazvukové rychlosti

v období post-gelace nastává v důsledku probíhajících konformačních a chemických změn uvnitř gelové sítě. [47]



Obrázek 13: Studium gelace pomocí HRUS [47]

Studium biochemických reakcí

Při měření v titračním režimu na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením byl pozorována vznik vazby protein-ligand. Přikapáván byl zde roztok ligandu, který byl postupně dávkován do měřicí cely, která obsahovala roztok proteinu. Po dostatečném množství přídavků došlo ke snížení hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti. Tento jev byl způsoben navázáním ligandu na hydratační obal proteinu a současným vytlačení molekul vody z tohoto obalu. [47]

Studium pektinu a pektátu

V mé bakalářské práci jsem se zaměřil na studium koncentračních řad pektinu a pektátu. Bylo zjištěno, že pro všechny řady je charakteristická lineárně rostoucí závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku. Bylo také dokázáno, že pektát rozpuštěný v rozpouštědle (ultračistá deionizovaná voda; 0,15 M NaCl; PBS) o dané koncentraci vykazuje vždy vyšší hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti, než je tomu v případě pektinu za totožných podmínek. [48]

2.4 Současný stav řešené problematiky

Dle mnohých autorů jsou možnosti praktického využití hyaluronanu především v cílené distribuci léčiv při nádorových onemocnění. Toto léčivo by bylo možné dopravit přímo k postižené tkáni pomocí specifického nosiče, který by mohl zabránit nežádoucímu působení léčiva na zdravé tkáni. Avšak na tento nosič jsou kladeny vysoké požadavky. Tento nosič musí vykazovat biodegradabilitu, biokompatibilitu, schopnost vázat léčivou látku a tuto látku později uvolnit na požadovaném místě. Dle mnoha autorů by právě touto látkou mohl být modifikovaný hyaluronan. Pro tuto modifikaci jsou v současné době nejvíce zkoumány interakce mezi tenzidem a molekulami hyaluronanu. Vědci předpokládají citlivost hyaluronanu na savčí receptor CD44, který je u savců zodpovědný za migraci a proliferaci buněk. Avšak tento receptor je hlavně ve velké míře exprimován na povrchu nádorových buněk. [49]

Interakce mezi hyaluronanem a tenzidem byly cílem výzkumu *T. Halasové a spol* [49]. V tomto výzkumu byly použity dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu (90 kDa a 1,4 MDa) a dva kationtové tenzidy (CTAB a TTAB) v roztoku 0,15 M NaCl. Z výsledků je zřejmé, že NaCl potlačuje interakce mezi opačně nabitými polyelektrolyty a tenzidy, avšak tyto interakce jsou stále v některých případech přítomny. Výsledky z fluorescenční spektroskopie poukazují a skutečnost, že tvorba micel (agregátů) se vyskytuje spíše v určitých intervalech koncentrace PAL než v jednom bodě, a to hlavně v přítomnosti hyaluronanu. Toto zjištění bylo velmi důležité v problematice cílené medikace, kdy je nutno zjistit, při jaké koncentraci je systém hyaluronan-PAL schopen tvořit micely ochotné pojmout medikament.

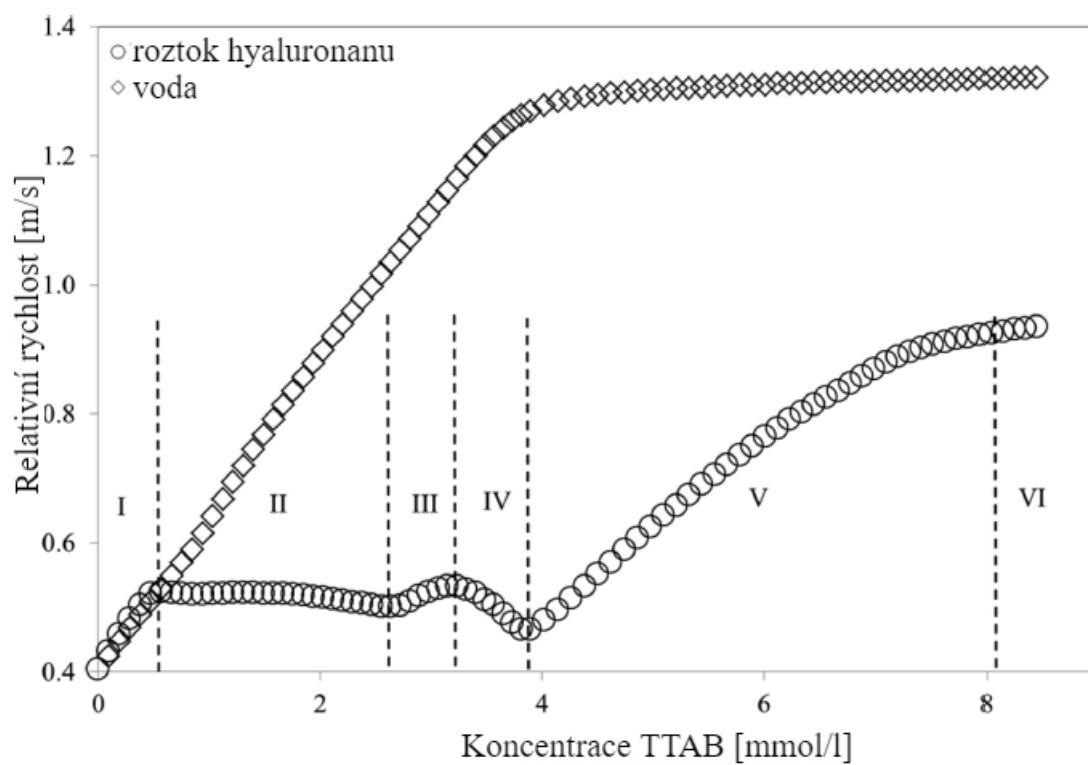
Ve své dizertační práci *T. Halasová* [51] prohloubila svůj dosavadní výzkum interakcí hyaluronan-tenzid. V tomto případě byl testovaným tenzidem pouze CTAB, kdy proběhly experimenty kolem kritické micelární koncentrace tenzidu. Bylo potvrzeno, že při těchto interakcích dochází k tvorbě stabilních agregátů, které jsou schopny pojmout nepolární látku. Při vyšší koncentraci CTAB vznikala gelová fáze, která byla schopna pohltit veškerou polární látku. Tento výzkum byl proveden pro různé koncentrace CTAB v různých prostředích (voda; 0,15 M NaCl). Reologickým měřením bylo zjištěno, že vlastnosti gelu jsou ovlivněny molekulovou hmotností použitého hyaluronanu.

V diplomové práci se *S. Jarábková* [52] zaměřila na téma hydrogelů, které vznikají interakcemi kationtových polymerů (chitosan, dextran hydrochlorid) s aniontovými tenzidy (SDS, SDBS) z makroskopického hlediska ve vodě a v prostředí 0,15 M NaCl. Z reologických experimentů vyplývá, že lepší mechanické vlastnosti mají chitosanové gely, které jsou schopny tvořit rigidnější strukturu, než je tomu v případě dextranu.

J. Mondek [53] se ve své dizertační práci zaměřil na využití pokročilých fluorescenčních technik v systému hyaluronan-tenzid. Pomocí technik časově-rozlišené a stacionární fluorescence byl zkoumán vliv hydratace hyaluronanu na jeho interakce s opačně nabitými micelami za pomoci fluorescenčních sond, které podléhají deprotonaci v excitovaném stavu. Na základě těchto experimentů byla vybrána jedna sonda (1-naftol) pro další postup. Pomocí této sondy byla zkoumána její použitelnost pro určení CMC tenzidu (CTAB, Septonex) a základě zhášení fluorescence chlorovými deriváty. Dle citlivosti deprotonace v excitovaném stavu této fluorescenční sondy byl určen vliv hyaluronanu na vnitřní prostředí micel. Bylo zjištěno, že se 1-naftol včleňuje do Sternovy vrstvy, což je vnější část elektrické dvojvrstvy.

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením **prof. Pekař a spol.** [40] potvrdil, že je možné určit hodnotu CMC s použitím této velmi citlivé metody. Na základě tohoto článku se vznik micel vyznačuje snížením rychlosti ultrazvukové vlny díky micelárnímu elastickému jádru. Také zde byl diskutován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na velikost relativní ultrazvukové rychlosti. Bylo prokázáno, že není rozhodující molekulová hmotnost hyaluronanu, ale pouze koncentrace dimerů ve vzorku, ze kterých je molekula hyaluronanu tvořena. Pokud tedy roste lineárně koncentrace hyaluronanu, roste i relativní ultrazvuková rychlost lineárně (ve vodě i v 0,15 M NaCl). Tento jev je opodstatněn tím, že dochází k tvorbě hydratovaných molekul hyaluronanu.

A. Kargerová a spol. [38] zkoumala, v rámci studia interakcí hyaluronanu a kationtových tenzidů (CTAB, TTAB), řadu experimentů, pomocí techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením v titračním režimu. Byla použita dvě prostředí (voda; 0,15 M NaCl) a čtyři molekulové hmotnosti hyaluronanu. Nejdříve byla proměřena CMC a poté interakce hyaluronanu s tenzidem TTAB, jak je možné vidět na **Obrázku 14**. Díky vysoké citlivosti této metody, bylo možné rozpoznat až šest různých oblastí, kdy dochází ke vznikům interakcí při formování komplexů.



Obrázek 14: Titrační křivka TTAB do vody a TTAB do roztoku hyaluronanu s viditelnými oblastmi (I-VI). [38]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika)

Použité šarže hyaluronanu jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Hyaluronan použitý v experimentální části

Hyaluronan sodný		
Mw [kDa]	Šarže	Obsah vlhkosti [% hm.]
13	021014-E1	8,826
80-130	260315-E2	9,782
250-450	230215-E1	7,249
1400-1600	181214-4-D1	7,756

V následující *Tabulce 2* jsou uvedeny další použité chemikálie.

Tabulka 2: Další použité chemikálie v experimentální části

Chemikálie	Specifikace
Chlorid sodný	Lachner (Česká republika), CAS: 7647-14-5, čistota 99,5 %
CAE	Ajinomoto (Japonsko) CAS: 95370-65-3

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu všech zásobních roztoků i vzorků byla použita ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB.

3.2.2 Zásobní roztok NaCl

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství NaCl a doplněno vodou na výsledný objem 0,5 l. Na tuto přípravu bylo vždy naváženo množství 4,3833 g NaCl. Pro lepší rozpuštění navážky byla zásobní lahev umístěna na magnetickou míchačku, kde byl roztok po dobu 24 h míchán v uzavřené nádobě. Takto připravený zásobní roztok měl výslednou koncentraci 0,15 M.

3.2.3 Zásobní roztok hyaluronanu

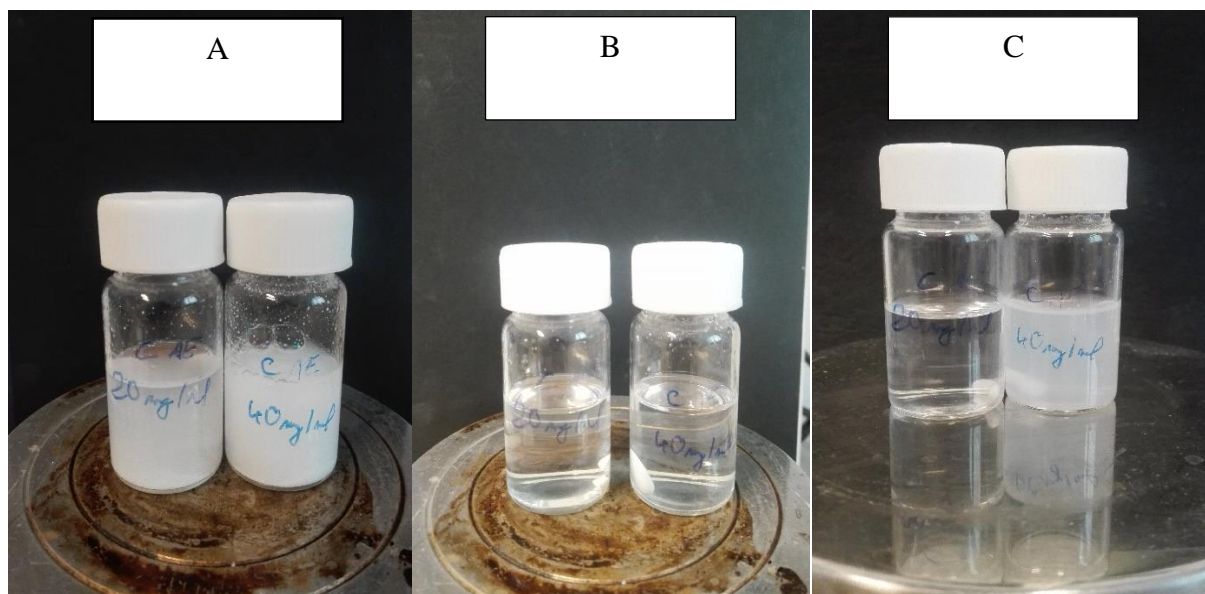
Roztoky hyaluronanu používané v této experimentální části byly o koncentraci 1 g/cm³ pro molekulové hmotnosti 13 kDa, 80–130 kDa, 250–450 kDa a 1 400–1 600 kDa. Roztoky byly připravovány přímým rozpouštěním hyaluronanu v ultračisté deionizované vodě. Tato voda byla používána i při přípravě všech dalších roztoků a měření. Všechny komponenty, které

tvořily výsledný roztok, tedy hyaluronan i voda, byly během přípravy váženy. Roztok hyaluronanu byl před samotným měřením vždy ponechán 24 h v uzavřené nádobě na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Pokud vzorky nebyly měřeny po 24 hodinách od přípravy, byly tyto roztoky ponechány v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách, aby došlo k zamezení možné degradace hyaluronanu. Při přípravě hyaluronanu rozpuštěného v 0,15 M NaCl se postupovalo obdobně jako při přípravě hyaluronanu ve vodě.

3.2.4 Zásobní roztok CAE

Roztok CAE byl připravován v odměrné baňce přímým rozpouštěním daného tenzidu v ultračisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Tato látka od firmy AJINOMOTO byla dodávána ve formě prášku a její množství bylo váženo na analytických vahách. Výsledné koncentrace byly zprvu voleny 20 mg/ml a 40 mg/ml. Tento roztok ovšem nevykazoval homogenní charakter a bylo nutné provést postup pro jeho naprosté rozpuštění. Takto připravený roztok bylo nutné umístit na magnetickou míchačku s teplotním ohřevem, kde došlo při teplotě 45 °C k úplnému rozpuštění CAE. Následně byl vzorek ponechán na běžné magnetické míchačce po dobu 24 h. U 40 mg/ml CAE ovšem po 120 sekundách docházelo k opětovnému vysrážení tenzidu. Toto byl hlavní důvod pro použití pouze méně koncentrovaného (20 mg/ml CAE) tenzidu. Pokud během jednoho týdne nebyl zásobní roztok spotřebován, bylo nutné jej připravit znovu.

Obdobně byly připraveny roztoky v prostředí 0,15 M NaCl. Zde docházelo k úplnému rozpuštění při teplotě 50 °C. Na **Obrázku 15** je možno vidět, jak probíhalo rozpouštění připravovaného vzorku CAE o koncentraci 20 mg/ml (vlevo) a 40 mg/ml. Na první fotografii (A) je stav roztoků před zahřátím na teplotu 45 °C. Na druhé fotografii (B) je možno vidět zcela čiré roztoky při dosažení rozpouštěcí teploty. Poté byly roztoky několik minut ponechány 5 minut při laboratorní teplotě. Po této době došlo k opětovnému vysrážení CAE v roztoku o koncentraci 40 mg/ml, jak je znatelné na fotografii (C).



Obrázek 15: Rozpouštění CAE a opětovné vysrážení roztoků o koncentraci 20 mg/ml (vlevo) a 40mg/ml (vpravo). V části A je vidět roztoky před zahřátím. Na fotografii B jsou roztoky ihned po zahřátí a rozpouštění tenzidu. Fotografie C zobrazuje stav 5 minut po skončení zahřívání.

3.3 Měření ultrazvukové rychlosti a zeslabení

K experimentálnímu pozorování interakcí mezi hyaluronanem a CAE byl použit přístroj HRUS 102T, od Irské firmy Ultrasonic Scientific. Měřený vzorek byl vždy umístěn v měřící cele. Všechny vzorky byly měřeny při šesti frekvencích v rozsahu 2,5–17,5 MHz. Charakteristické píky roztoků jsou definovány harmonickými čísly jednotlivých píků. Tato harmonická čísla se počítají jako podíl frekvence píku a rozdílu frekvencí dvou sousedních píků. Tato čísla byla stejná pro všechna měření. Čísla píků, při kterých měření probíhalo, byla 22,4; 42,4; 65,4; 93,9; 99,3 a 120,0. Frekvence jednotlivých píků pro referenční ultračistou deionizovanou vodu odpovídaly 2 869 kHz; 5 239 kHz; 8 106 kHz; 11 348 kHz; 12 212 kHz; 14 712 kHz. Aby byl přístroj správně nastaven musí platit, že harmonická čísla referenčního roztoku a vzorku jsou stejná. Jelikož je měření na ultrazvukovém spektrometru komparativním měřením, byly všechny vzorky měřeny proti ultračisté deionizované vodě, která se nacházela v referenční cele.

Do přístroje byl vždy dávkován přesně jeden mililitr odplyněného vzorku automatickou pipetou. K odplynění docházelo na centrifuze při 3 000 ot/min po dobu 3 minut.

Tento přístroj umožňuje několik typů měření, a to kinetické, titrační nebo v režimu teploty. V experimentální části byly využity dva typy měření, a to kinetické při konstantní teplotě a titrační. V experimentální části bylo prováděno měření při dvou konstantních teplotách. Jednou z nich byla laboratorní teplota 25 °C a druhá byla zvolena na fyziologickou teplotu 37 °C.



Obrázek 16: Přístroj HRUS 102T vybavený termostatem a automatickým titrátorem.

3.3.1 Měření v kinetickém režimu

Pro měření v kinetickém režimu byla zvolena pouze teplota 25 °C. Tato teplota byla po celou dobu měření neměnná. Tímto způsobem bylo zkoumáno chování méně zředěného (20 mg/ml) CAE v průběhu 5 000 minut. Také byla touto technikou proměřena kritická micelární koncentrace tenzidu v ultračisté deionizované vodě při 25 °C pro vzorky použité při měření povrchového napětí. Vždy byly vyhodnocovány hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti odpovídající píku s charakteristickým číslem 93,9.

3.3.2 Měření v titračním režimu

Přístroj v titračním režimu pracuje spolu s automatickým titrátorem, který přikapává titrant do měřící cely přes titrační nástavec na základě programového nastavení. Finální titrační program byl volen na základě několika sérií měření. Nakonec byl nastaven režim pro přidávky 6 μl do přititrovaného objemu 210 μl , následně byl přírůstek tenzidu zvýšen na 10 μl . Po přidávku přístroj zapnul spodní i horní míchání. Po tomto promíchání následoval čas bez míchání, ustalování signálu. Do měřeného roztoku byl vždy přikapáván tenzid CAE (20 mg/ml). Byly vyhodnocovány výsledky píku s charakteristickým číslem 93,9.

Konstantní teplota roztoků v celách je zajišťována termostatem s vodní lázní Thermo Haake Phoenix, který dokáže teplotu kontrolovat s přesností $\pm 0,01$ °C. Na **Obrázku 17** je možno vidět titrační nástavec osazený horním míchadlem a dávkovací trubicí.



Obrázek 17: Titrační nástavec pro HRUS 102T.

3.4 Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti denzitometricky

Na základě výsledků získaných pomocí ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením byly sestaveny koncentrační řady vzorků hyaluronanu s přídatkem tenzidu CAE. Tyto vzorky byly proměřeny na denzitometru DSA 5 000 M, který je vyráběn firmou Anton Paar. Tento přístroj disponuje velkou přesností při měření hustoty (šest desetinných míst) a zároveň také měří i ultrazvukovou rychlost (dvě desetinná místa). Měření probíhalo v režimu tabulkového skenu při teplotách 25 °C a 37 °C. Z každého jednoho aplikovaného vzorku do přístroje byly tedy získány dvě hodnoty hustoty a dvě hodnoty ultrazvukové rychlosti. Hodnota hustoty byla měřena pro výpočet stlačitelnosti vzorků, která se spočítá z ultrazvukové rychlosti a hustoty.

Nejprve bylo nutné přístroj promýt vzorkem, který bude v přístroji poté analyzován (1 ml). Toto bylo provedeno vždy, aby se v přístroji nenacházely částice z předešlého měření. Následně byl ještě přístroj profouknut proudem vzduchu. Poté došlo k vstříknutí přibližně 4 ml vzorku do přístroje pomocí injekční stříkačky. Bylo nutné dbát na dokonalé odplynění vpraveného vzorku. Tento fakt byl zajištěn pomocí podtlaku ve stříkačce. Pokud by nedošlo k dokonalému odplynění, přístroj by automaticky v průběhu experimentu upozornil uživatele na chybný nástřik vzorku. Jedno měření probíhalo přibližně 20 minut. Po úspěšném měření se nechal přístroj chladit (z 37 °C na 25 °C) a postup byl znovu opakován pro další vzorek z koncentrační řady.

V mé experimentální části byly změřeny hodnoty všech koncentračních řad definovaných molekulových hmotností hyaluronanu s tenzidem CAE ve vodě i v 0,15 M NaCl. Koncentrace jednotlivých vzorků byla volena tak, aby zlom, který se vyskytoval ve výsledcích z titračního měření na ultrazvukovém spektroskopu, byl viditelný i na výsledcích získaných z denzitometru.



Obrázek 18: Denzitometr DSA 5000 M.

3.5 Měření povrchového napětí

Měření bylo prováděno na tenziometru KSV Sigma 700. Pro měření povrchového napětí pomocí kroužku je potřeba ke každému měření disponovat alespoň 15 ml vzorku. Před započítím měření je nutné kalibrovat závaží, které je připevněno na háček pomocí pinzety. Po této rutinní kalibraci se připevní měřící kroužek a přístroj je připraven k měření. Přístroj je přímo kontrolován pomocí počítače a data jsou ukládána na pevný disk. Tento tenziometr umožňuje měřit v několika režimech měření, avšak v tomto případě byla studována pouze kritická micelární koncentrace.



Obrázek 19: KSV Sigma 700 tenziometr.

3.6 Stanovení molekulové hmotnosti CAE

Pro určení molekulové hmotnosti tenzidu CAE byla použita technika SEC-MALS-dRI. Měření bylo třikrát opakováno. Objem nástřiku jednoho vzorku do přístroje bylo vždy 100 mikrolitrů. Použitou mobilní fází pro tento typ měření molekulové hmotnosti byl 0,1 M NaNO₃. K těmto účelům byla použita kolona PL aquagel-OH 20 (vhodná pro měření molekulové hmotnosti v rozsahu 100 Da až 20 000 Da). SEC-MALS kolona byla vyrobena firmou Agilent Technologies (USA). Předseparované frakce analyzovaných vzorků následně vstupují do jednotlivých detektorů. V rámci měření byl použit MALS detektor (DAWN HELEOS II) a diferenční refraktometr (OPTILAB T-rEX), které jsou dodávány firmou Wyatt Technology (USA). Odběr vzorku a aplikace do přístroje byla zabezpečena pomocí automatického dávkovače (autosampler). Jako vzorek byl použit roztok CAE o koncentraci 20 mg/ml rozpuštěn v ultračisté deionizované vodě. Dalším důležitým faktorem pro tento typ měření je hodnota inkrementu indexu lomu (dn/dc), která byla stanovena na 0,085 ml/g.

3.7 Okometrické pozorování interakce hyaluronan-CAE

Při okometrickém měření byl titrační nádstavec pro titrační měření na ultrazvukovém spektrometru našroubován po závitě na vialku o objemu 5 mililitrů. Do vialky bylo vloženo míchadlo a 2 mililitry roztoku k titrování. Takto připravená aparatura byla umístěna na magnetickou míchačku. V počítači byl zvolen titrační režim, kdy po každých 40 sekundách bylo přidáno 10 mikrolitrů CAE o koncentraci 20 mg/ml rozpuštěné v ultračisté deionizované vodě. Obdobně tomu bylo, pokud byla titrována látka rozpuštěná v 0,15 M NaCl, poté byl použit CAE rozpuštěn v NaCl. Během přestávky mezi jednotlivými přídávky bylo vždy automaticky spuštěno horní míchání a manuálně spuštěna magnetická míchačka na dobu deset sekund. Po vypnutí míchání byla pořízena fotografie aktuálního stavu. Tento proces byl opakován šedesátkrát pro každý vzorek.

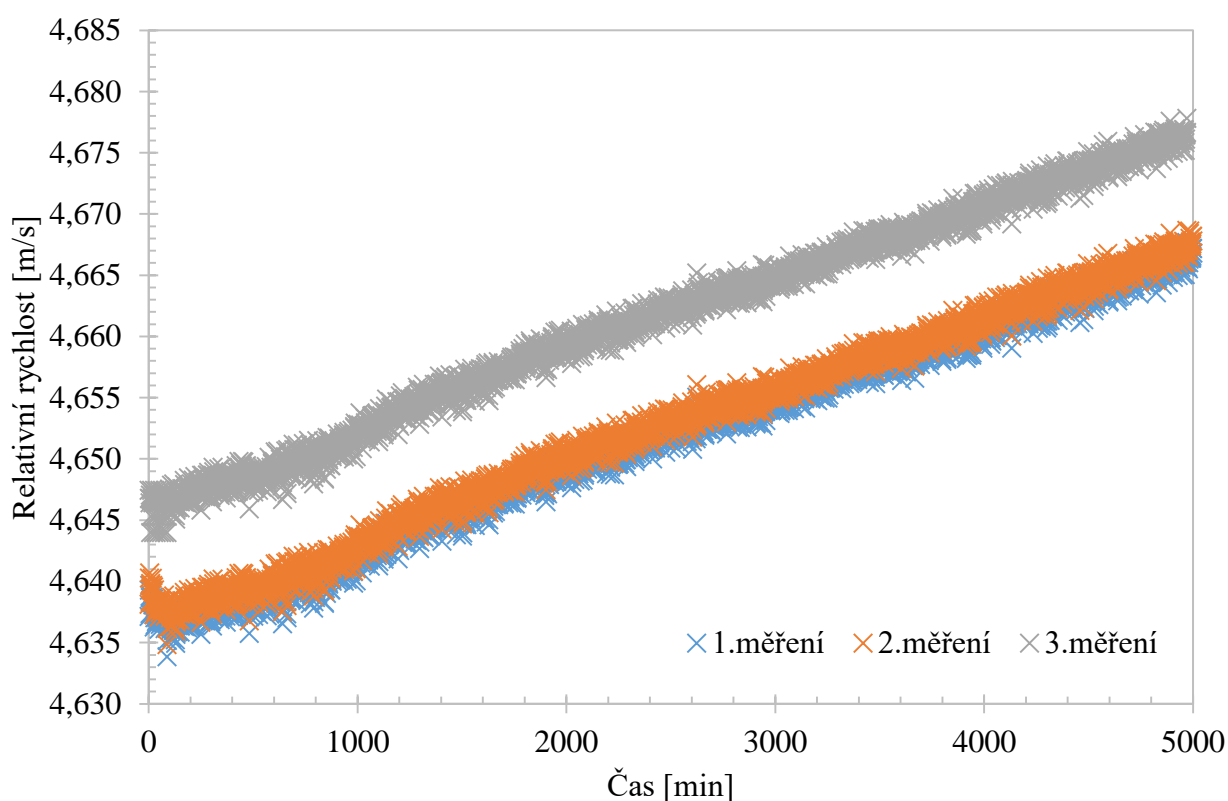
Fotografie byly následně kompletovány a vždy byly vybrány reprezentativní fotografie pro kolekci přehledného dění v roztoku. Okometrické titrace byly provedeny pro kritickou micelární koncentraci CAE ve vodě a pro interakce hyaluronanu s tenzidem CAE o molekulových hmotnostech hyaluronanu 13 kDa a 1 400–1 600 kDa. Interakce byly pozorovány jak v prostředí ultračisté deionizované vody, tak v prostředí 0,15 M NaCl.

3.8 Vyhodnocení dat a diskuze

3.8.1 Stabilita roztoku CAE pomocí ultrazvukového spektrometru

Na přístroji HRUS 102 bylo provedeno třikrát měření stability roztoku CAE o koncentraci 20 mg/ml. Pro tento typ měření byl do měřicí cely aplikován vždy 1 ml vzorku. Při vyhodnocení tohoto typu měření byly do grafu vyneseny hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí všech tří měření v závislosti na čase. Experiment byl proveden pro CAE rozpuštěné v ultračisté deionizované vodě a v prostředí 0,15 M NaCl. Vyhodnoceny byly vždy hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti pro pík s charakteristickým číslem 93,9.

3.8.1.1 Ultrazvuková rychlost CAE ve vodě

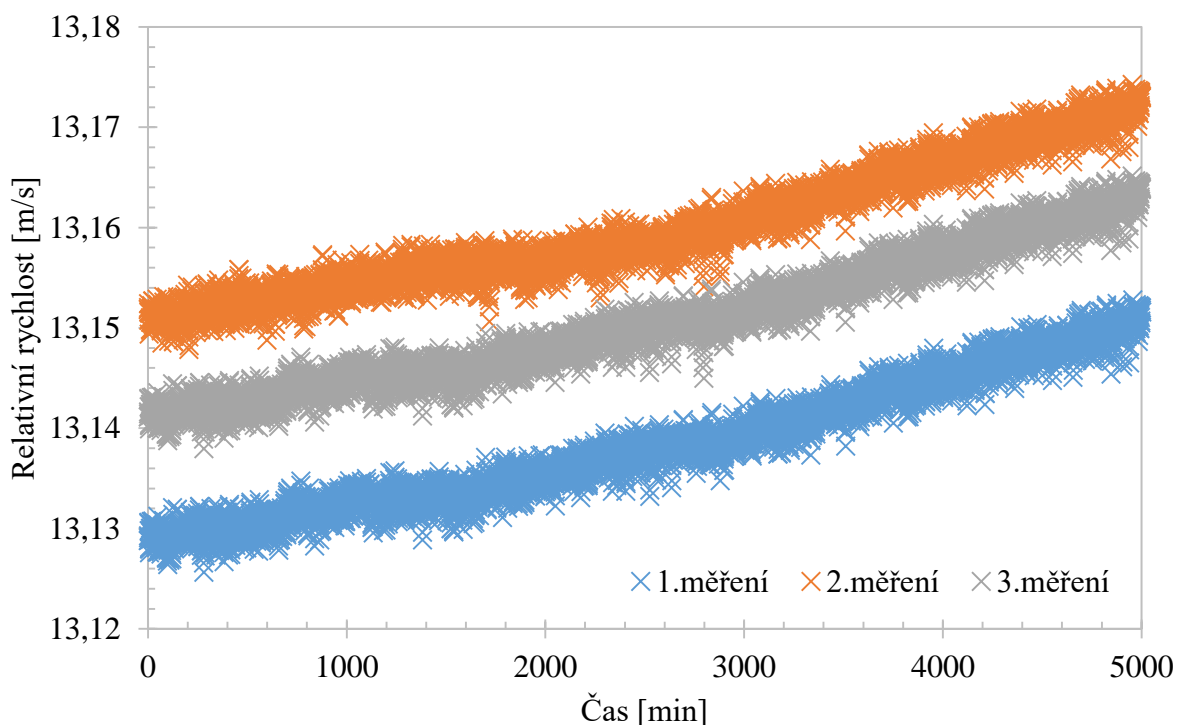


Graf 1: Graf znázorňující závislost ultrazvukové rychlosti roztoku CAE o koncentraci 20 mg/ml ve vodě na čase.

Graf 1 popisuje závislost relativní ultrazvukové rychlosti procházející vzorkem (což je rychlost zvuku procházející vzorkem, od které se odečítá ultrazvuková rychlost procházející referenční celou), v závislosti na čase, po který experiment probíhal. Každé měření ultrazvukové rychlosti probíhalo po dobu 5000 minut při 25 °C. Z hodnot relativní ultrazvukové rychlosti můžeme usoudit, že u všech tří měření docházelo ke zvýšení této rychlosti s postupujícím časem. Může za to pravděpodobně vypadávání tenzidu CAE zpět do roztoku. Při vyšší koncentraci tenzidu, než je 20 mg/ml, dochází k vypadávání CAE do roztoku podstatně rychleji, jak je možné vidět v kapitole 3.2.4.

Graf X 1 znázorňuje závislost průměrné ultrazvukové rychlosti těchto tří měření. Nejnižší průměrná hodnota relativní ultrazvukové rychlosti je 4,638 m/s po 87 minutách od spuštění experimentu a nejvyšší hodnota ultrazvukové rychlosti činila 4,671 m/s po 5 000 minutách. Rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší průměrnou hodnotou relativní rychlosti je tedy 0,033 m/s.

3.8.1.2 Ultrazvuková rychlost CAE v 0,15 M NaCl



Graf 2: Závislost relativní rychlosti na době měření pro vzorky CAE rozpuštěné v 0,15 M NaCl o koncentraci 20 mg/ml.

V **Grafu 2** je znázorněna závislost relativní ultrazvukové rychlosti na čase u tří vzorků CAE v 0,15 M NaCl o koncentraci 20 mg/ml. V **Grafu X 2** je možné vidět průměrné hodnoty ultrazvukové rychlosti ze tří měření včetně chybových úseček. Nejnižší průměrné relativní rychlosti (13,138 m/s) bylo dosaženo po 280 minutách. Naopak nejvyšší hodnota průměrné relativní rychlosti (13,165 m/s) byla naměřena po 4 990 minutách.

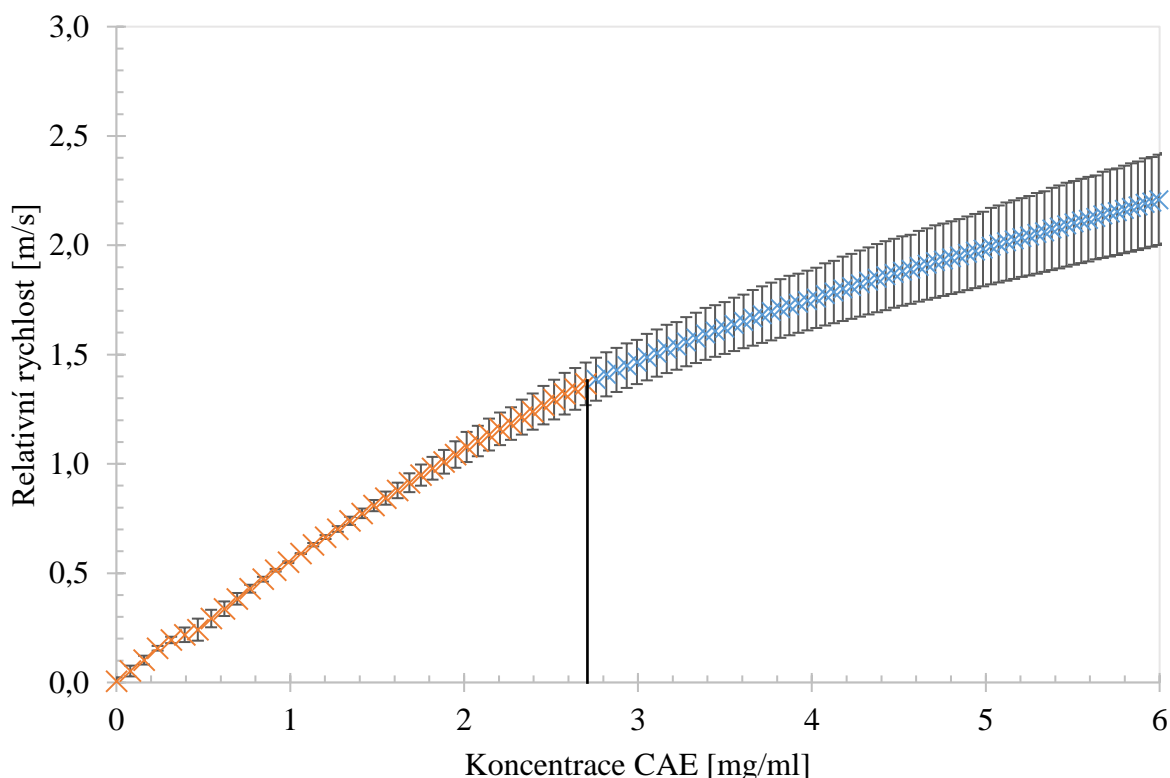
Při porovnání výsledků měření v obou rozpouštědlech usuzují, že více stabilnější je roztok CAE, pokud je rozpuštěno v 0,15 M NaCl. Rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou rychlosti je po 5 000 minutách nižší (0,027 m/s) než je tomu v případě, kdy je CAE rozpuštěno ve vodě (0,033 m/s).

3.8.2 Titrace na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením

Na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením byly prováděny titrace tenzidu CAE do ultračisté deionizované vody a do roztoku 0,15 M NaCl. Cílem tohoto experimentu bylo určení kritické micelární koncentrace (CMC) tenzidu v obou prostředích.

3.8.2.1 Určení kritické micelární koncentrace CAE ve vodě

Při určení kritické micelární koncentrace bylo titrován CAE do vody při 25 °C. Průměrné hodnoty ultrazvukové rychlosti je možné vidět v **Grafu 3**. Červená datová řada v tomto grafu znázorňuje body před CMC, zatímco modrá odpovídá hodnotám rychlosti po dosažení CMC. V grafu jsou též vyneseny chybové úsečky na základě směrodatné odchylky dvou měření. Změna v trendu ultrazvukové rychlosti není jednoznačně rozpoznatelná, ale po detailní analýze dat byla CMC při 25 °C ve vodě určena na koncentraci CAE 2,82 mg/ml. Tato hodnota po přepočítání na molární koncentraci odpovídá 7,06 mmol/l. Přepočítání bylo provedeno na základě hodnoty naměřené molekulové hmotnosti. Ultrazvukové zeslabení se v průběhu určení kritické micelární koncentrace výrazně neměnilo, proto do grafu není implementováno.

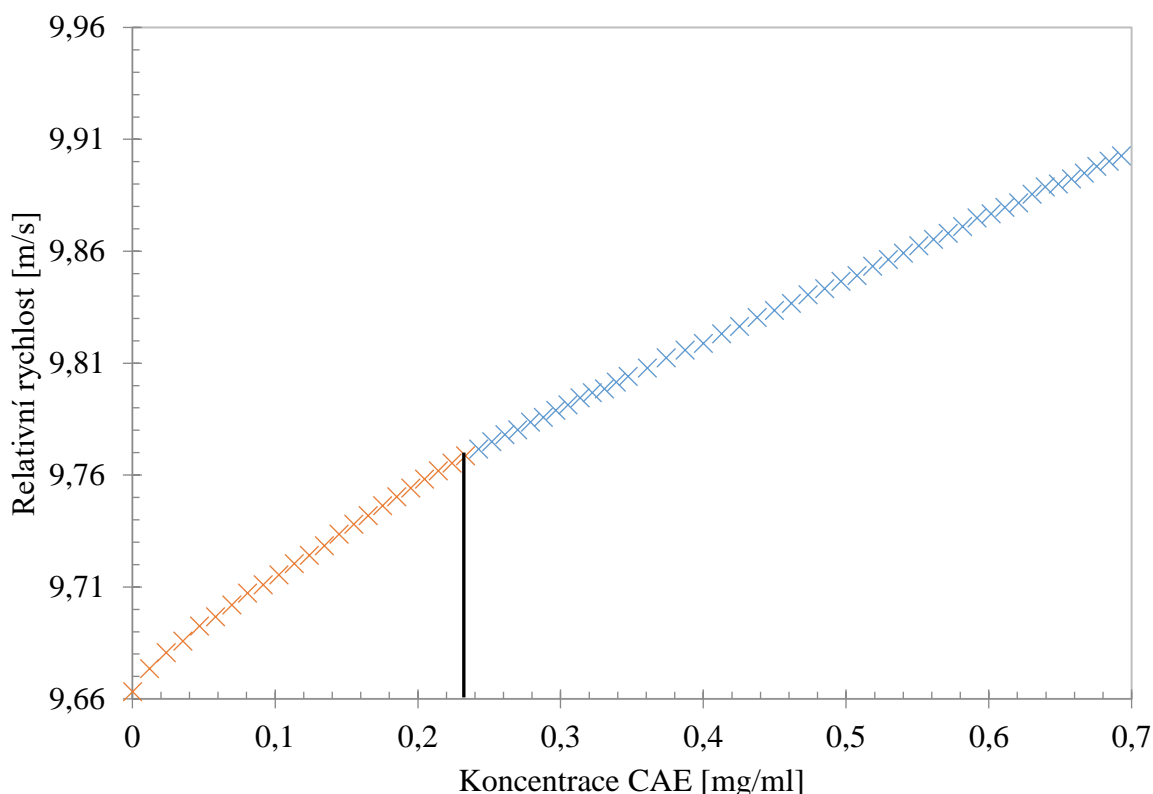


Graf 3: Závislost průměrné relativní rychlosti na koncentraci CAE v měřící cele při 25 °C ve vodě. Kritická micelární koncentrace je označena svislou čarou při hodnotě koncentrace 2,82 mg/ml.

V *Grafu X 3* je průměrná relativní rychlost vztažena na koncentraci CAE při 37 °C ve vodě a určení CMC, která je v tomto případě ještě méně zřetelná. Hodnota CMC ze čtyř sérií těchto měření byla stanovena při koncentraci 1,69 mg/ml. Mezi hodnotou kritické micelární koncentrace při 25 °C a 37 °C je značný rozdíl, což může být způsobeno rozdílným chováním tenzidu CAE při změně teploty. Tento rozdíl není tak markantní při změně teploty u již dříve zkoumaných kationtových tenzidů.

3.8.2.2 Určení kritické micelární koncentrace v 0,15 M NaCl

Při určení kritické micelární koncentrace v prostředí 0,15 M NaCl bylo CAE naředěno na koncentraci 2 mg/ml. Předpokládal jsem, že kritická micelární koncentrace v prostředí NaCl by měla být desetkrát nižší, než je tomu v případě CMC ve vodě. Tudíž bylo nutné použít menší přídavky nebo roztok CAE adekvátně naředit. CMC při 25 °C v prostředí 0,15 M NaCl byla nakonec určena na 0,23 mg/ml. Změnu v trendu ultrazvukové rychlosti je možné vidět v *Grafu 4*. V tomto grafu odpovídá červená datová řada bodům před dosažením CMC, zatímco modrá odpovídá hodnotám rychlosti po dosažení CMC.



Graf 4: Závislost průměrné relativní rychlosti na koncentraci CAE v měřící cele při 25 °C v 0,15 M NaCl. Kritická micelární označena svislou čarou při koncentraci 0,23 mg/ml.

V příloze se nachází **Graf X 4**, který zobrazuje průběh titrace CAE o koncentraci 20 mg/ml do 0,15 M NaCl při 37 °C. Z něj není patrný žádný zlom v trendu relativní rychlosti, tudíž nebylo možné určit CMC. Do grafů pro určení CMC nejsou zaneseny hodnoty ultrazvukového zeslabení z důvodu přehlednosti jednotlivých datových řad. Ultrazvukové zeslabení nedalo také žádný výrazný podnět pro zlom, a tedy pro určení CMC.

3.8.3 Interakce hyaluronan-CAE ultrazvukovou spektroskopii

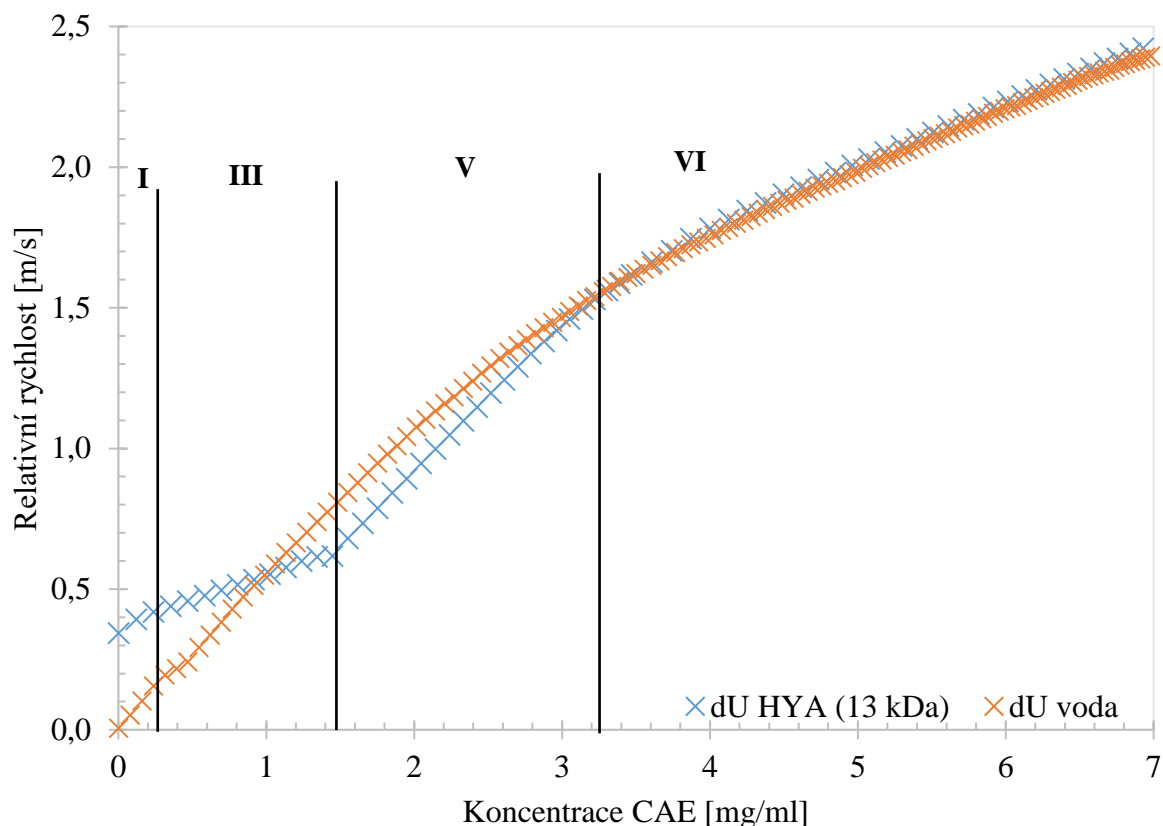
Měření ultrazvukové rychlosti a zeslabení na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením v titračním režimu byla zaznamenáno tvorba interakcí mezi tenzidem CAE a hyaluronanem. Byly proměřeny interakce mezi tímto tenzidem a hyaluronanem, o čtyřech různých molekulových hmotnostech. Měření byla prováděna jak v ultračisté deionizované vodě, tak v roztoku 0,15 M NaCl.

3.8.3.1 Interakce hyaluronan-CAE ve vodném prostředí

V **Grafu 5** je možno vidět porovnání vývoje ultrazvukové rychlosti při titračním měření u do vody a do roztoku hyaluronanu (13 kDa) při 25 °C ve vodném prostředí. Z hodnot ultrazvukové rychlosti je možné vidět, že se relativní ultrazvuková rychlost mění v závislosti na koncentraci tenzidu ve třech bodech. Jedná se o koncentrace 0,237 1 mg/ml, 1,447 1 mg/ml a 3,388 7 mg/ml. Můžeme tedy v tomto titračním profilu rozpoznat čtyři oblasti, kdy dochází k tvorbě interakcí. Titrační křivka hyaluronanu s CAE byla rozdělena pro lepší popsání do několika částí. Číslování těchto částí je stejné jako v článku *A. Kargerová a spol.* [38]. V této práci byl popsán systém hyalurona-TTAB a hyaluronan-CTAB. Každý tenzid měl titrační křivku odlišnou, proto i číslování v grafech neobsahuje vždy všechna čísla od I do VI.

V první oblasti titrační křivky (I) v **Grafu 5**, není pozorován žádný efekt hyaluronanu a jeho vazby s molekulami tenzidu. Jedinou změnou proti titraci do vody je to, že hodnoty relativní rychlosti v roztoku hyaluronanu jsou vyšší oproti samotné vodě. V druhé části se zvyšování hodnot ultrazvukové rychlosti téměř zastaví, dokonce dochází k mírnému poklesu těchto hodnot, jako tomu bylo v systému hyaluronan-TTAB. Tuto oblast však při interakcích hyaluronan-CAE neregistrujeme. Ve třetím regionu dochází ke zvýšení hodnot rychlosti se zvyšující koncentrací tenzidu. Ve čtvrté oblasti, která je viditelná v **Grafu 7** a **Grafu X 5**, pozorujeme snížení hodnot ultrazvukové rychlosti, tento trend je více strmý než ve druhé oblasti. Tato část se nevyskytuje při titraci CAE do hyaluronanu o molekulové hmotnosti 13 kDa. Část V je charakteristická pro interakce micel s dříve vytvořenými komplexy hyaluronan-CAE. Dochází zde k rozpouštění makroskopických částic a tvoří se zde zřejmě více rigidní struktury, proto také dochází ke zvýšení rychlosti ultrazvukové vlny. Po ukončení těchto

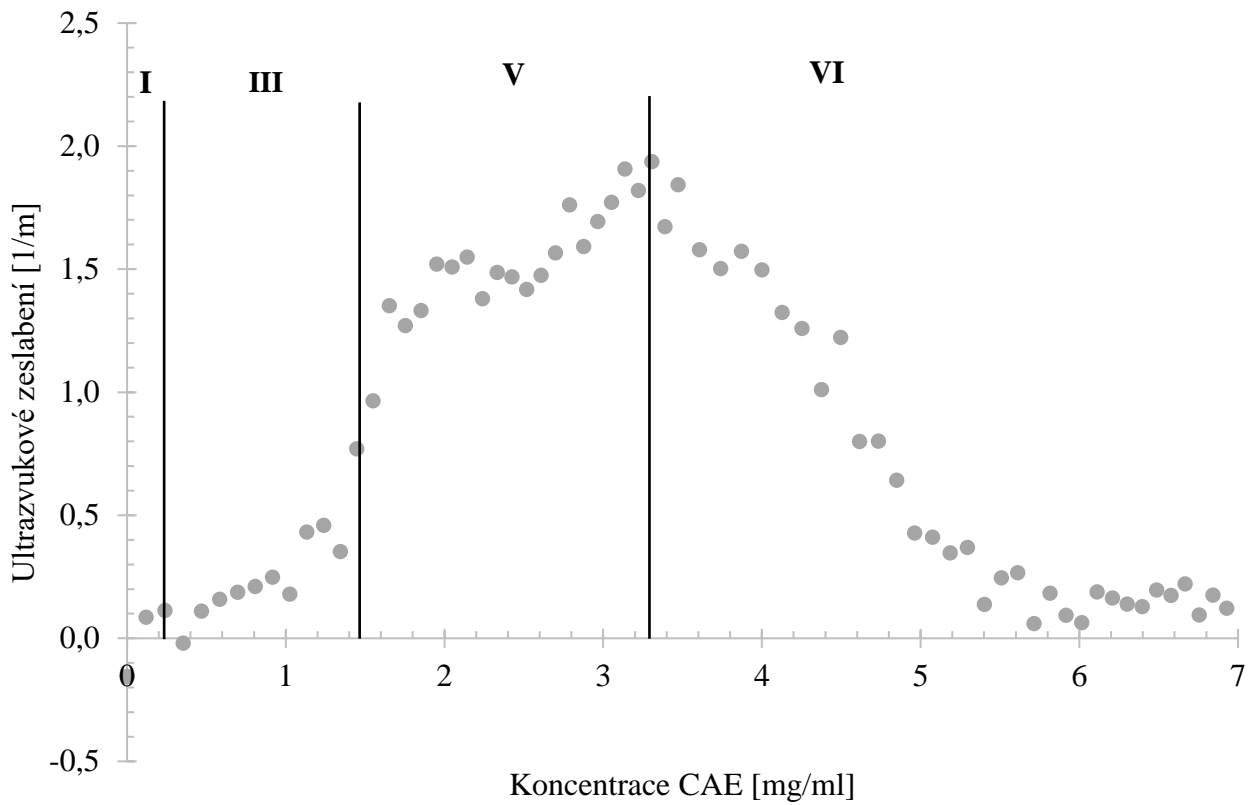
interakcí přechází vzorek do části VI, kdy se vytvářejí volné micely. V části VI se hodnoty relativní rychlosti v roztoku hyaluronanu téměř shodují s hodnotami při titraci do vody.



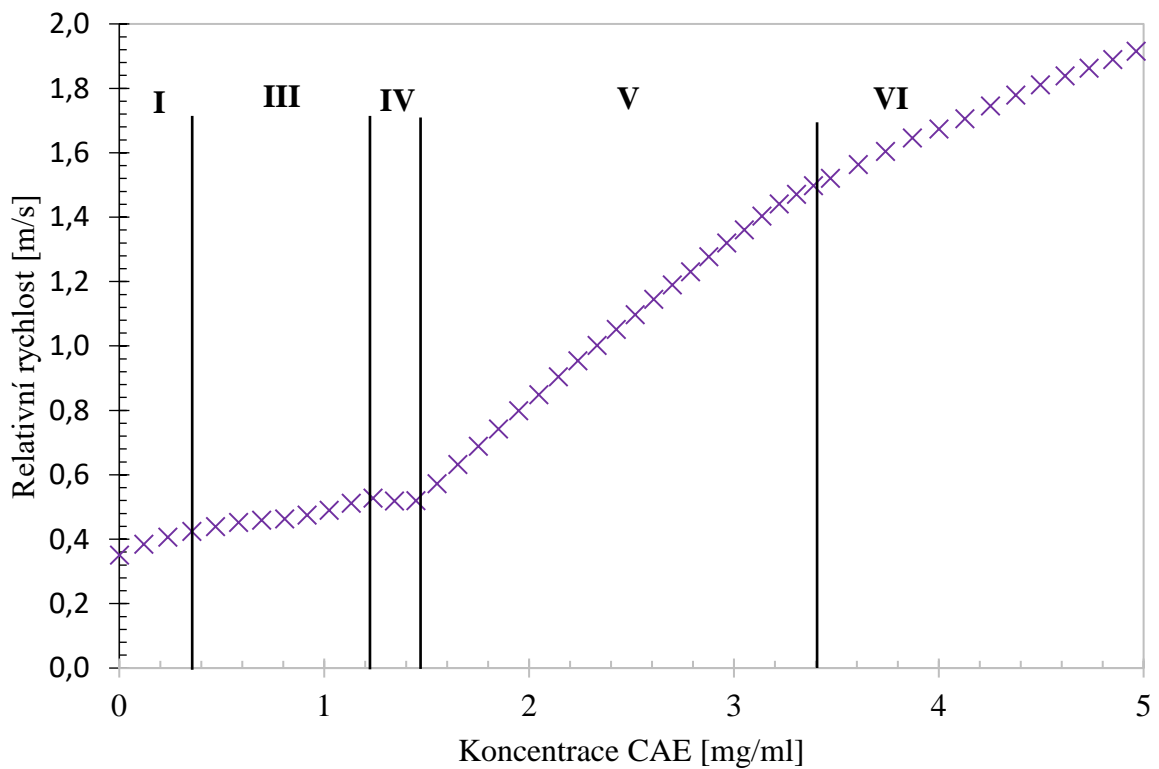
Graf 5: Porovnání ultrazvukových rychlostí při určování CMC a vzorku hyaluronanu (13 kDa) v závislosti na koncentraci CAE při 25 °C ve vodě.

Z hodnot ultrazvukového zeslabení pro vzorek hyaluronanu (13 kDa) ve vodě je však možné rozpoznat více oblastí, kde dochází k interakcím. Závislost ultrazvukového zeslabení na koncentraci tenzidu je vyobrazena v **Grafu 6**. Z grafu je vidět, že ultrazvukové zeslabení reaguje na tvorbu interakcí citlivěji, než je tomu u hodnot relativní ultrazvukové rychlosti.

V **Grafu 7** je titrační profil systému hyaluronan-CAE při 25 °C ve vodě. Na tomto grafu je viditelná jedna oblast (IV) navíc oproti hyaluronanu o molekulové hmotnosti 13 kDa. Tato oblast se vyskytuje i u titračních profilů zbylých dvou hyaluronanů (80–130 kDa, 250–450 kDa), viz. **Graf X 5**.



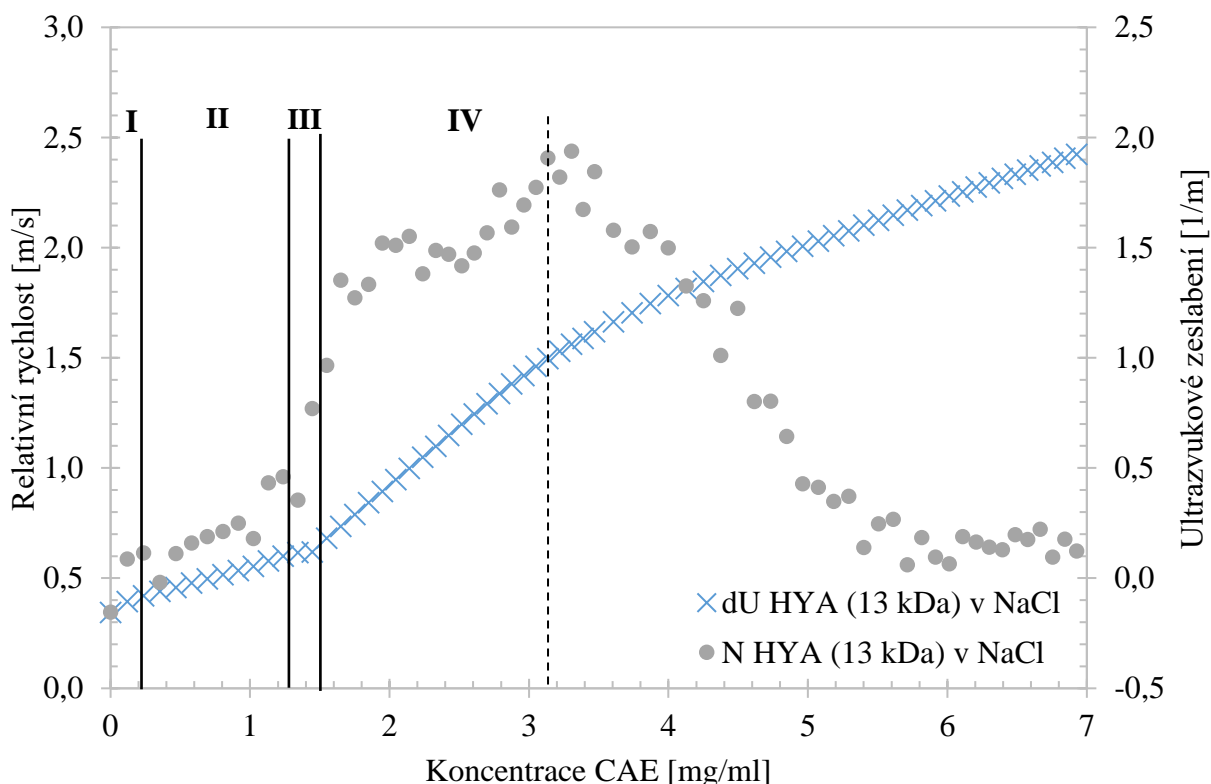
Graf 6: Hodnoty ultrazvukového zeslabení v titračním profilu hyaluronanu (13 kDa) ve vodě při 25 °C.



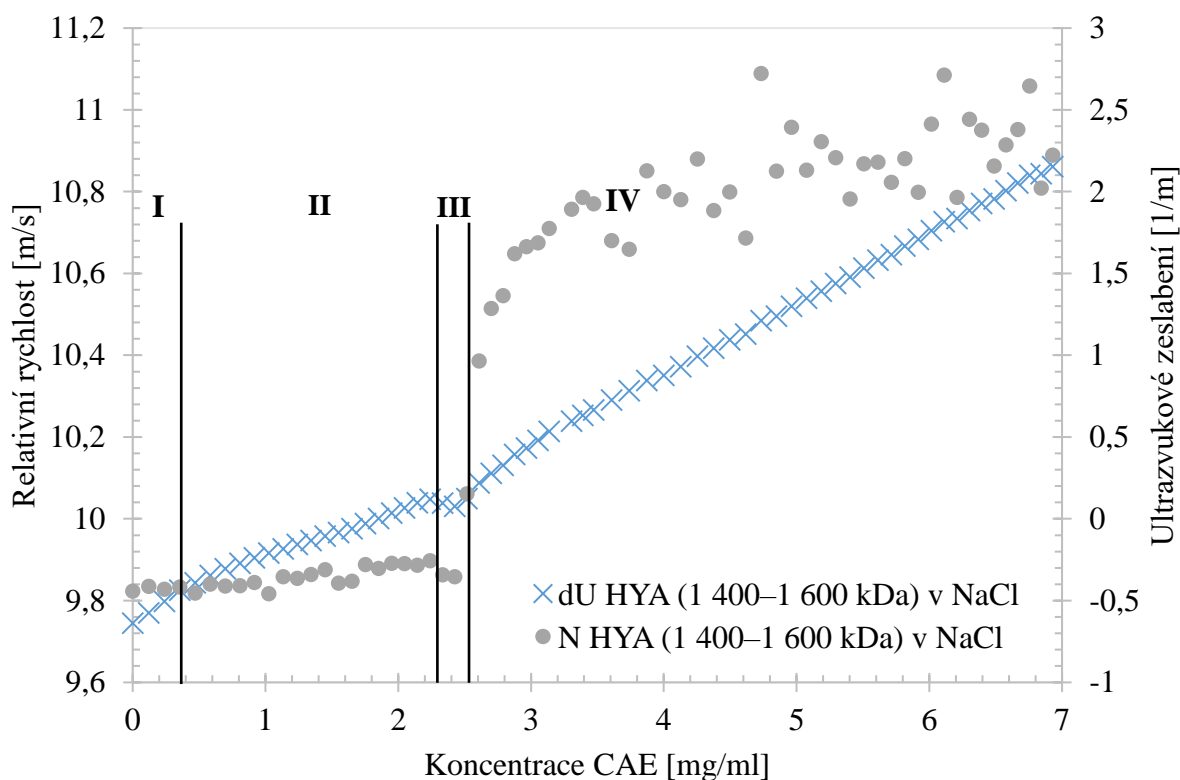
Graf 7: Titrační profil relativní rychlosti hyaluronanu (1 400–1 600 kDa) ve vodě při 25 °C.

3.8.3.2 Interakce v prostředí 0,15 M NaCl

Při titraci CAE v prostředí 0,15 M NaCl jsou na titračním profilu znatelné jiné změny v relativní rychlosti, než tomu bylo při titracích do vody. V části I je při nízké koncentraci tenzidu znatelný lineární nárůst ultrazvukové rychlosti. V následující oblasti II dochází k mírnějšímu zvyšování hodnot rychlosti. Třetí část (III) titračního profilu je charakterizována konstantními nebo dokonce mírně klesajícími hodnotami relativní rychlosti. U hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti, než je 250–450 kDa, je tato oblast velmi obtížně postřehnutelná, což je možné vidět v **Grafu 8**. V poslední části (IV) dochází k výraznému nárůstu v ultrazvukové rychlosti. V **Grafu 8** je možné zaznamenat ještě jeden zlom, je v tomto grafu označen přerušovanou čarou. Tento zlom je zřetelný při koncentraci 3,14 mg/ml. Avšak tato změna v relativní ultrazvukové rychlosti se projevila pouze u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 13 kDa (pouze jednou ze dvou měření). Z tohoto důvodu je zde tento zlom označen pouze přerušovanou čarou a není uveden v **Tabulce 4**. V **Grafu 9** vidíme titrační profil CAE do hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 400–1 600 kDa. V tomto grafu je možné zaznamenat třetí oblast (III), kdy dochází k poklesu relativní rychlosti.



Graf 8: Titrační profil relativní rychlosti (dU) a zeslabení (N) hyaluronanu (13 kDa) v 0,15 M NaCl při 25 °C.



Graf 9: Titrační profil relativní rychlosti (dU) a zeslabení (N) hyaluronanu (1 400–1 600 kDa) v 0,15 M NaCl při 25 °C.

3.8.3.3 Porovnání výsledků pro obě rozpouštědla

V **Tabulka 3** je možno vidět hodnoty koncentrace CAE, při kterých docházelo ke změně průběhu relativních rychlostí v titračním režimu pro systémy hyaluronan-CAE ve vodném prostředí při teplotách 25 °C a 37 °C. Trend v posun koncentrací, při kterých docházelo ke zlomu není naprosto zřejmý. U oblastí III, IV a V dochází s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu zpravidla k posunu koncentrace, při níž dochází ke zlomu, k nižším hodnotám. Při porovnání dvou teplot bylo zjištěno, že zlom ohraničující oblast I při 37 °C je vždy při nižší koncentraci než tomu bylo při teplotě 25 °C.

V prostředí 0,15 M NaCl byly zjištěny jiné zlomy, než tomu bylo v ultračisté deionizované vodě, viz. **Tabulka 4**. V této tabulce jsou rovněž hodnoty zlomů pro obě teploty. V tomto rozpouštědle bylo velmi náročné přesně určit koncentrace, při kterých dochází ke změně v trendu ultrazvukové rychlosti. Znatelnější byly zlomy při nižší teplotě (25 °C), a především u hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti (250–450 kDa, 1 400–1 600 kDa). Z výsledků pro 37 °C je zajímavý trend při posunu koncentrací, kdy dochází ke zlomu II a III. Zatímco u hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti (13 kDa, 80–130 kDa) dochází k těmto zlomům při výrazně vyšších koncentracích CAE, při vyšší molekulové hmotnosti (250–450 kDa, 1 400–1 600 kDa) se hodnoty oproti teplotě 25 °C markantně neliší.

Tabulka 3: Tabulka zlomů v titračních profilech (prostředí – ultračistá deionizovaná voda).

M _w [kDa]	Prostředí	Voda	
	Teplota	25 °C	37 °C
	Oblast	Koncentrace CAE [mg/ml]	Koncentrace CAE [mg/ml]
13	I	0,24	0,12
	III	1,48	1,54
	IV	-	-
	V	3,22	2,87
80–130	I	0,24	0,12
	III	1,34	1,55
	IV	1,65	1,65
	V	3,33	3,31
250–450	I	0,24	0,12
	III	1,34	1,55
	IV	1,65	1,65
	V	3,38	3,31
1400–1600	I	0,35	0,35
	III	1,24	1,34
	IV	1,45	1,45
	V	3,39	3,39

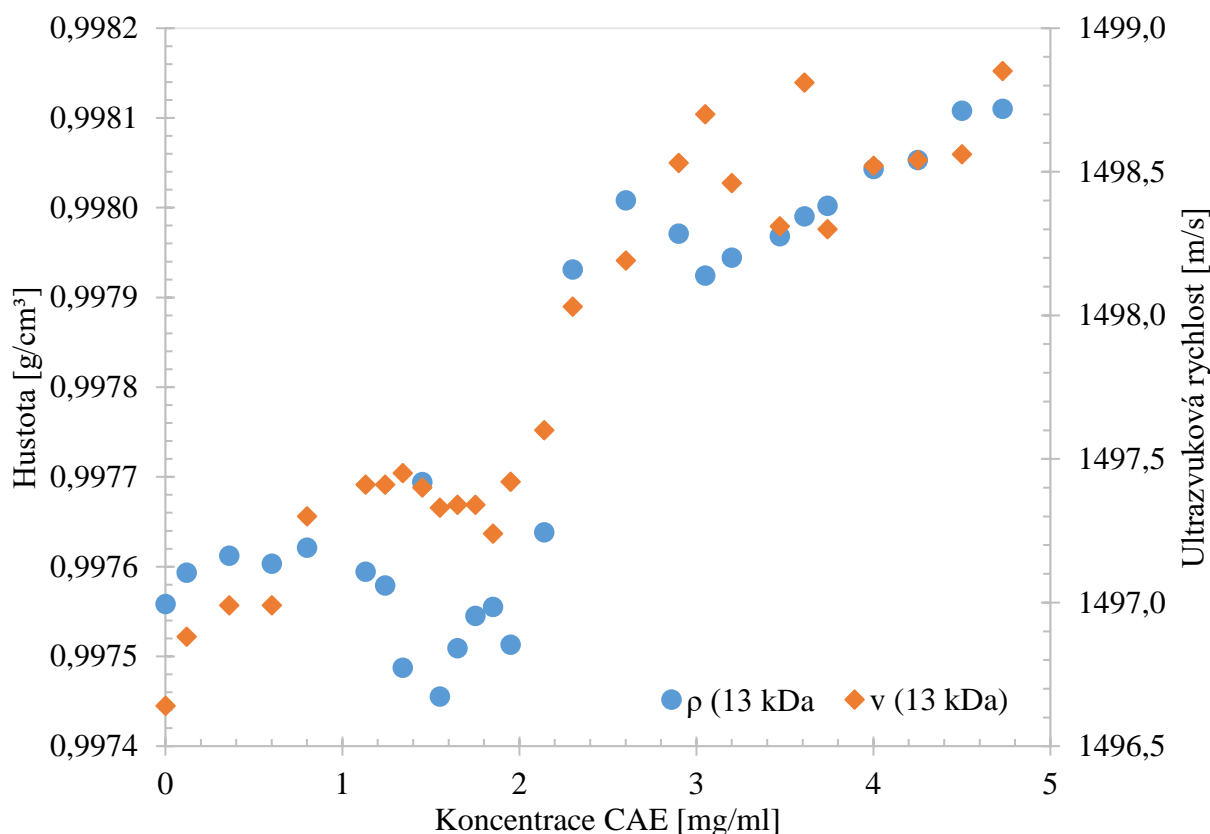
Tabulka 4: Tabulka zlomů v titračních profilech (prostředí - 0,15 M NaCl).

M _w [kDa]	Prostředí	NaCl	
	Teplota	25 °C	37 °C
	Oblast	Koncentrace CAE [mg/ml]	Koncentrace CAE [mg/ml]
13	I	0,24	0,24
	II	1,34	3,47
	III	1,44	3,87
80–130	I	0,35	0,35
	II	1,02	4,13
	III	1,94	4,25
250–450	I	0,24	0,24
	II	2,14	1,85
	III	2,61	2,24
1400–1600	I	0,35	0,47
	II	2,33	2,24
	III	2,43	2,43

3.8.4 Charakterizace interakcí denzitometrií

3.8.4.1 Denzitometrické měření pro systém hyaluronan-CAE

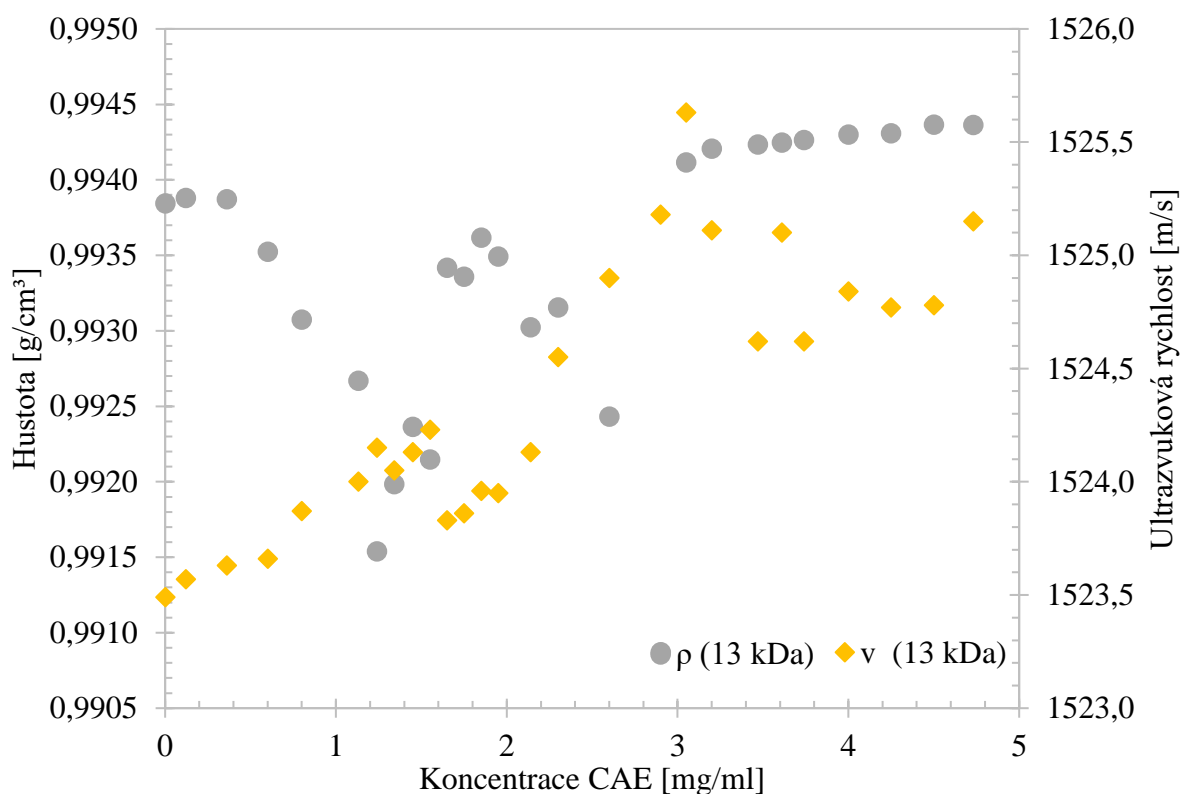
Měření na hustoměru bylo prováděno pro roztoky o různých koncentracích tenzidu CAE v systému hyaluronan-CAE pro teploty 25 °C a 37 °C. V této práci jsou pouze výsledky tohoto měření pouze pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 13 kDa a 1 400–1 600 kDa.



Graf 10: Hodnoty ultrazvukové rychlosti a hustoty pro CAE v hyaluronanu (13 kDa) při 25 °C v prostředí ultračisté deionizované vody.

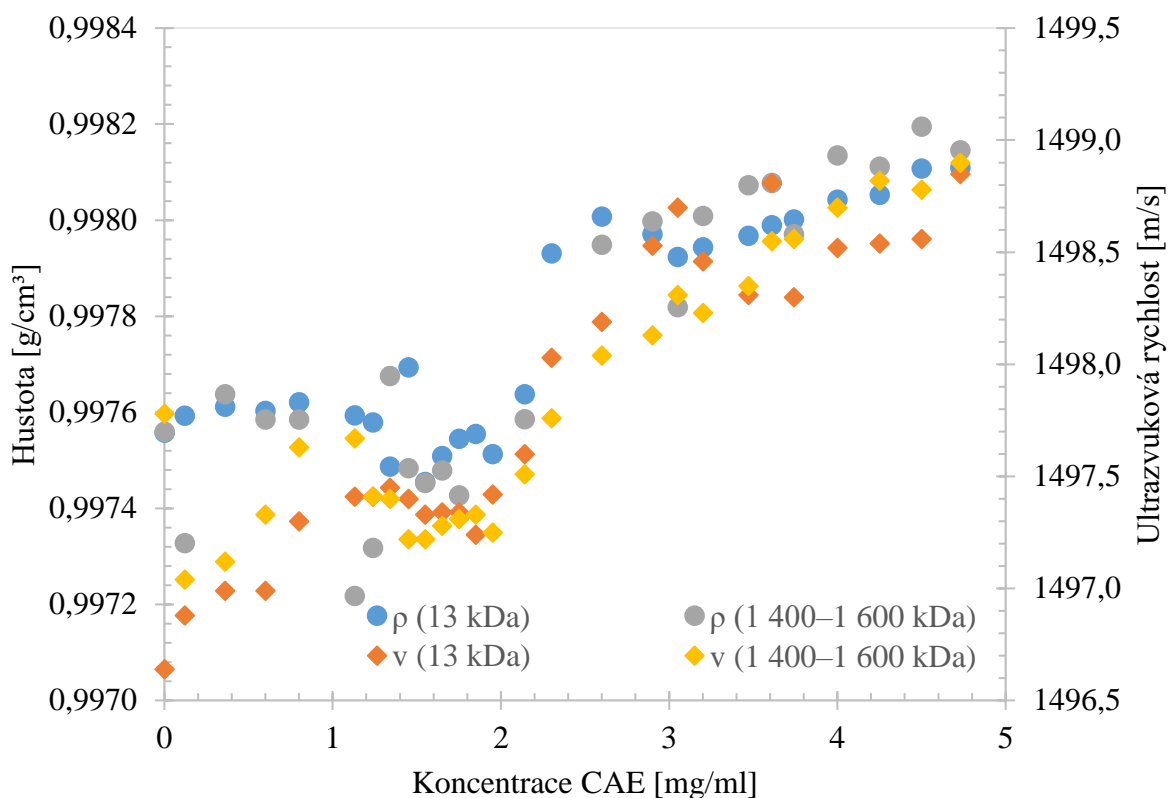
V **Grafu 10** jsou znatelné změny v ultrazvukové rychlosti i hustotě předem připravených roztoků o různých koncentracích tenzidu. K těmto změnám dochází při koncentracích, které byly zjištěny pomocí titračního měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením. Koncentrace byly voleny tak, aby byla oblast, kde dochází k interakcím viditelná i na výsledcích z denzitometrie.

Výsledky pro 37 °C jsou zobrazeny v **Grafu 11**. Z výsledků je patrné, že hodnoty ultrazvukové rychlosti jsou při vyšší teplotě taktéž vyšší, na rozdíl od hustoty, která je při vyšší teplotě nižší. Při koncentraci 0 mg/ml CAE má čistý hyaluronan hustotu 0,997 6 g/cm³ (25 °C) a 0,993 8 g/cm³ (37 °C). Hodnoty ultrazvukové rychlosti pro tuto koncentraci jsou 1496,64 m/s (25 °C) a 1523,49 m/s (37 °C). Pro přímé porovnání ultrazvukových rychlostí a hodnot hustoty se v příloze nachází **Graf X 6**.



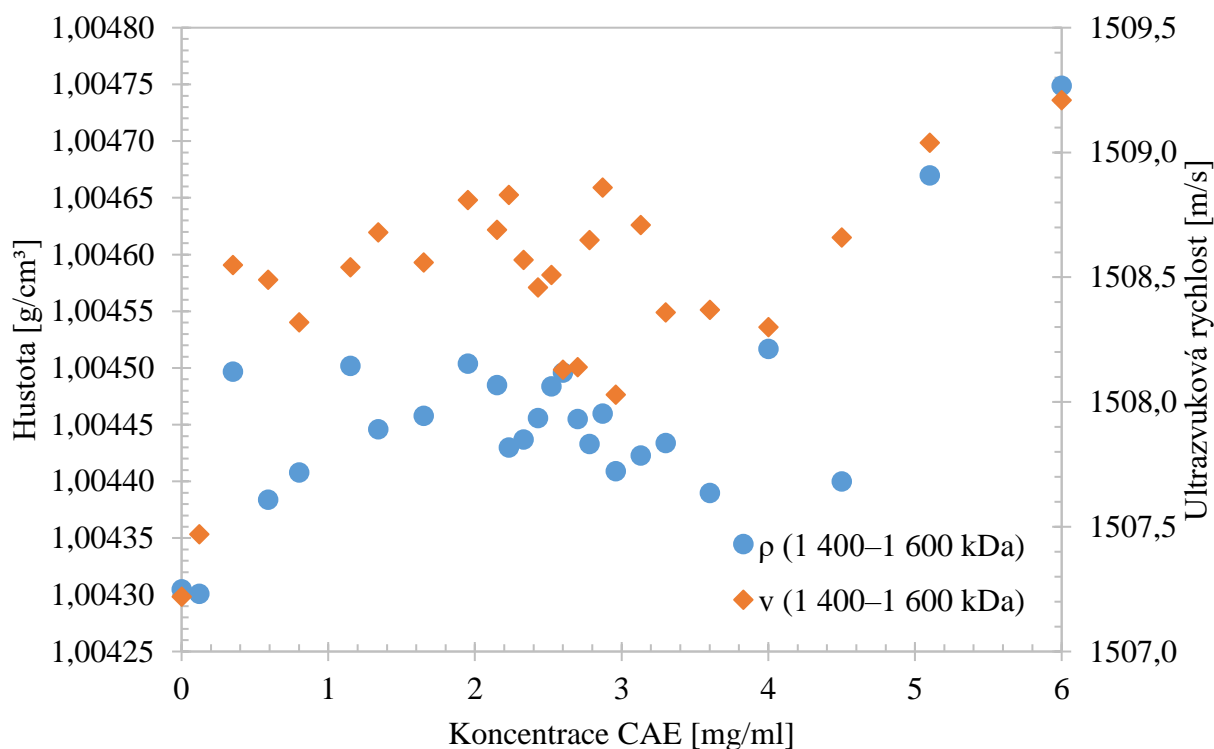
Graf 11: Hodnoty ultrazvukové rychlosti a hustoty pro CAE v hyaluronanu (13 kDa) při 37 °C v prostředí ultračisté deionizované vody.

Při porovnání dvou molekulových hmotností hyaluronanu (13 kDa a 1 400-1 600 kDa), jak je možné vidět v **Grafu 12**, bylo dokázáno, že hodnoty ultrazvukových rychlostí a hustoty se pro danou koncentraci CAE zásadním způsobem neliší. Z hodnot ultrazvukové rychlosti a hustoty lze rozpoznat, kdy dochází ke zlomu. Pro tyto dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu v systému hyaluronan-CAE je v následující kapitole **3.8.4.2** vypočtena stlačitelnost.



Graf 12: Denzitometrické porovnání dvou molekulových hmotností hyaluronanu v systému hyaluronan-CAE při 25 °C ve vodě.

V prostředí 0,15 M NaCl je z výsledků pro hyaluronan (1 400–1 600 kDa) zřejmé, že hodnoty ultrazvukové rychlosti i hustoty jsou vyšší, než tomu bylo ve vodném prostředí. Závislost ultrazvukové rychlosti a hustoty na koncentraci pro tento případ znázorňuje **Graf 13**. Roztok hyaluronanu (1 400–1 600 kDa) ve vodě bez přídavku CAE vykazoval hustotu 0,997 6, zatímco v prostředí 0,15 M je hodnota hustoty pro čistý hyaluronan 1,004 3 g/cm³.



Graf 13: Hodnoty ultrazvukové rychlosti a hustoty pro koncentraci CAE v hyaluronanu (1 400–1 600 kDa) při 25 °C v prostředí 0,15 M NaCl.

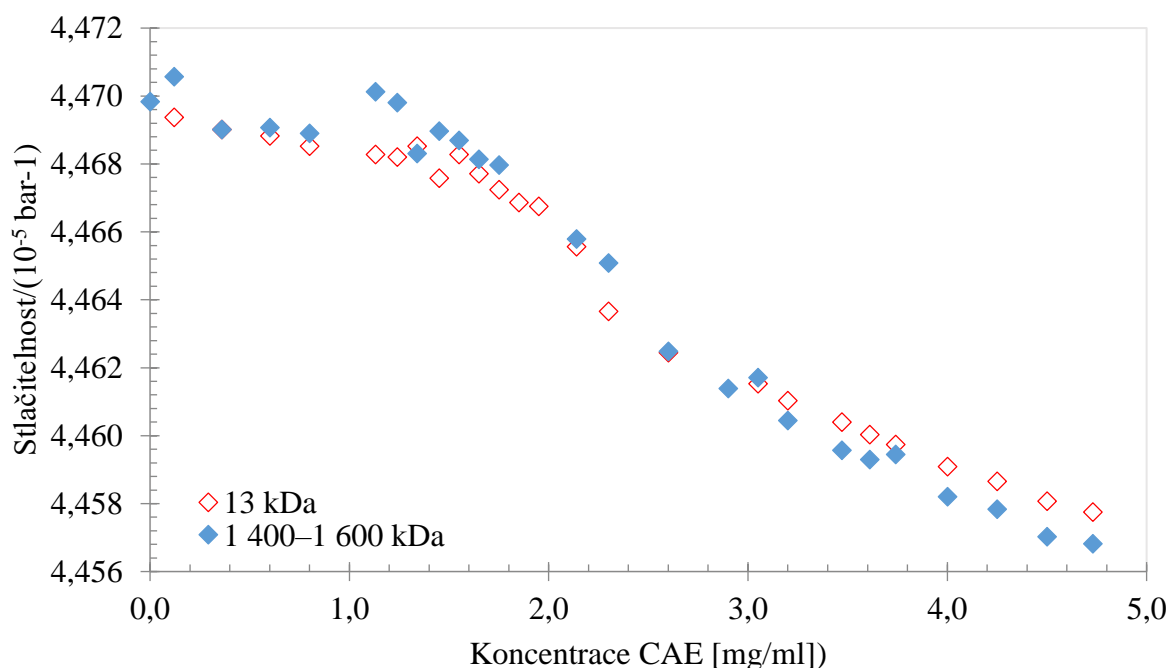
3.8.4.2 Výpočet stlačitelnosti

Stlačitelnost byla vypočítána na základě hodnot ultrazvukové rychlosti, které byly získány měřeními na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením, a hodnot hustoty z denzitometrického měření. K ultrazvukové rychlosti použité z ultrazvukového měření na HRUSu musela být vždy připočtena tabelovaná hodnota ultrazvukové rychlosti, která je charakteristická pro ultračistou deionizovanou vodu, jenž činí 1 497,22 m/s. Výpočet byl realizován na základě vztahu:

$$u = \frac{1}{\sqrt{\beta\rho}}$$

V tomto vztahu vystupuje u (ultrazvuková rychlost), ρ (hustota) a β (stlačitelnost).

Na základě vypočtených hodnot byl sestrojen **Graf 14**, kde je znázorněna závislost stlačitelnosti na koncentraci CAE ve vodě. Tento graf je zároveň i porovnáním stlačitelností pro dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu (13 kDa a 1 400–1 600 kDa). Ve vodném prostředí se hodnoty stlačitelnosti pro tyto dvě molekulové hmotnosti příliš neliší, ale nepatrně větší hodnoty stlačitelnosti vykazuje hyaluronan o vyšší molekulové hmotnosti.



Graf 14: Závislost vypočtené stlačitelnosti na koncentraci CAE při 25 °C ve vodném prostředí.

Hodnoty jednotlivých vypočtených stlačitelností jsou součástí přílohy (**Tabulka X 1**, **Tabulka X 2**). **Tabulka X 1** shrnuje hodnoty stlačitelnosti pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 400–1 600 kDa, zatímco **Tabulka X 2** reprezentuje výsledky stlačitelnosti pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 13 kDa. V obou zmíněných tabulkách se vyskytují hodnoty jak pro vodné prostředí, tak pro 0,15 M NaCl. V příloze se taktéž nachází **Graf X 7**, kde je znázorněna závislost stlačitelnosti na koncentraci tenzidu v prostředí 0,15 M NaCl. Zde je rozdíl mezi zkoumaným hyaluronanem o dvou molekulových hmotnostech výrazný. Například pro koncentraci CAE 3,6 mg/ml je pro 13 kDa hyaluronan tato hodnota $4,41 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ a pro hyaluronan o vyšší molekulové hmotnosti činí $3,38 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.

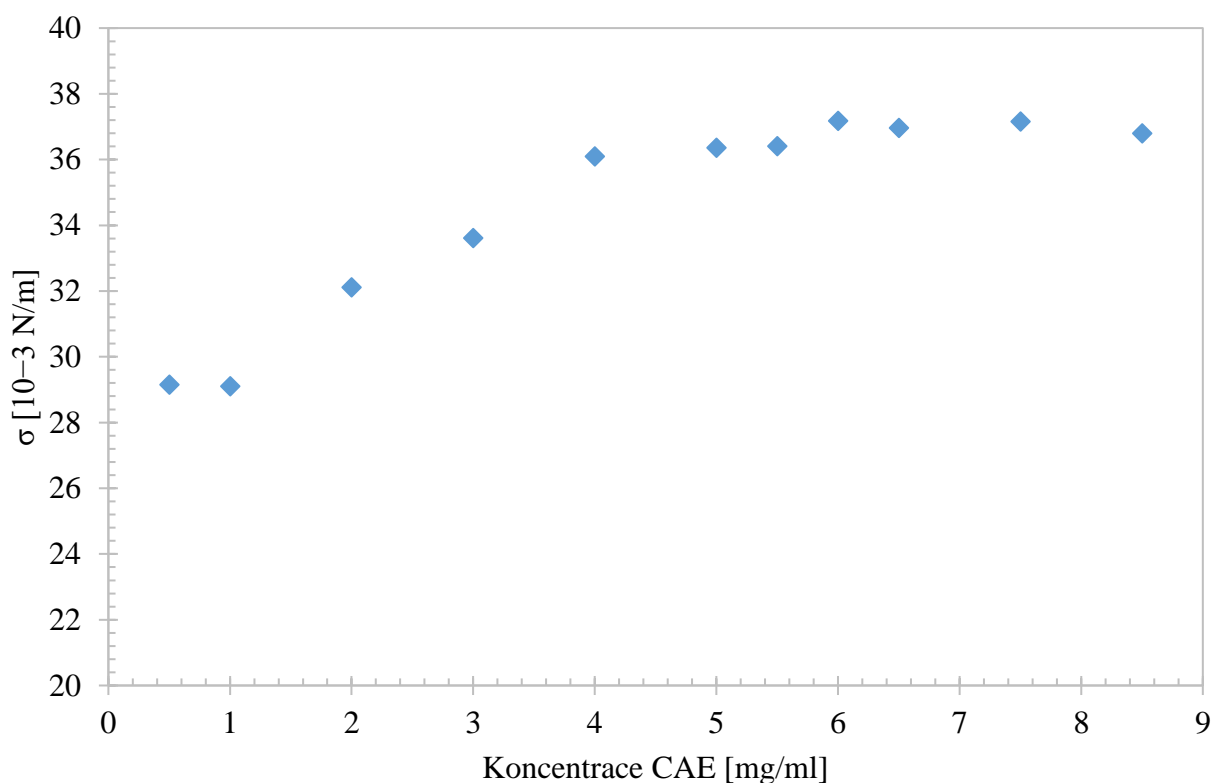
3.8.5 Měření povrchového napětí pro určení CMC

Byly připraveny roztoky o koncentracích, které jsou uvedeny v **Tabulce 5** a byly naměřeny hodnoty povrchového napětí na tenziometru, které jsou taktéž součástí této tabulky. Měření pro každý vzorek bylo provedeno třikrát a poté tato data byla zprůměrována. Nejdříve bylo změřeno povrchové napětí ultračisté deionizované vody, jejíž hodnota takřka odpovídá tabelované hodnotě. Tato hodnota činila $72,74 \times 10^{-3} \text{ N/m}$. Tabelovaná hodnota pro vodu při teplotě 25 °C je $71,97 \times 10^{-3} \text{ N/m}$.

Tabulka 5: Tabulka koncentrací připravených roztoků a naměřené hodnoty povrchového napětí.

Koncentrace CAE [mg/ml]	σ [10^{-3} N/m]
0,5	29,154
1	29,107
2	35,676
3	33,614
4	36,103
5	36,358
5,5	36,408
6	37,184
6,5	36,965
7,5	37,164
8,5	36,798

V **Grafu 15** závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu CAE. Z těchto výsledků není možné tenziometrickou metodou určit kritickou micelární koncentraci. Tato metoda pravděpodobně není vhodná pro určení CMC tohoto tenzidu. Usuzuji, že CAE pravděpodobně není pouze čistým tenzidem, ale jedná se o směs látek, které tvoří micely jinak, než tomu je u již zkoumaných tenzidů, u kterých na základě této metody byla určena CMC spolehlivě. Tyto připravené roztoky byly podrobeny také měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením (viz. **Graf X 8**) a denzitometrickému měření na hustoměru DSA 5000 M (viz. **Graf X 9**). Ani tato dodatečná měření připravených roztoků neprokázaly zlom, který by mohl být označen jako kritická micelární koncentrace. Jako doplňková technika pro stanovení kritické micelární koncentrace byla použita metoda ITC, jejíž výstup je součástí přílohy (**Graf X 10**). Z této metody byla stanovena kritická micelární koncentrace tenzidu na hodnotu koncentrace CAE 3,64 mmol/l. Tento výsledek ovšem nekoresponduje s výsledkem měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením, kde byla CMC při 25 °C určena při 7,06 mmol/l koncentrace CAE.

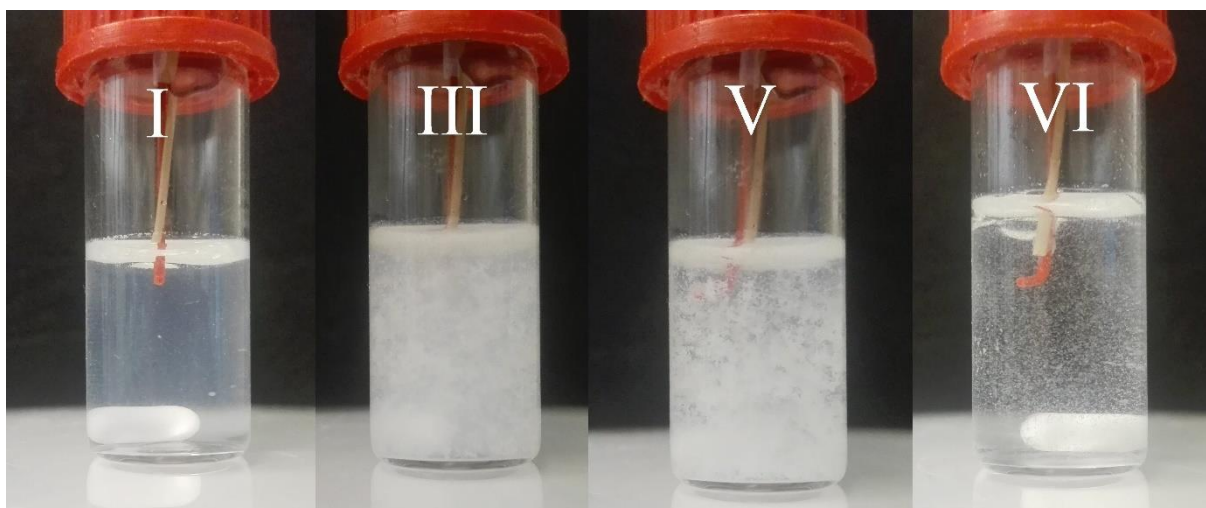


Graf 15: Hodnoty povrchového napětí vztažené na koncentraci tenzidu CAE.

3.8.6 Okometrické pozorování titrací CAE

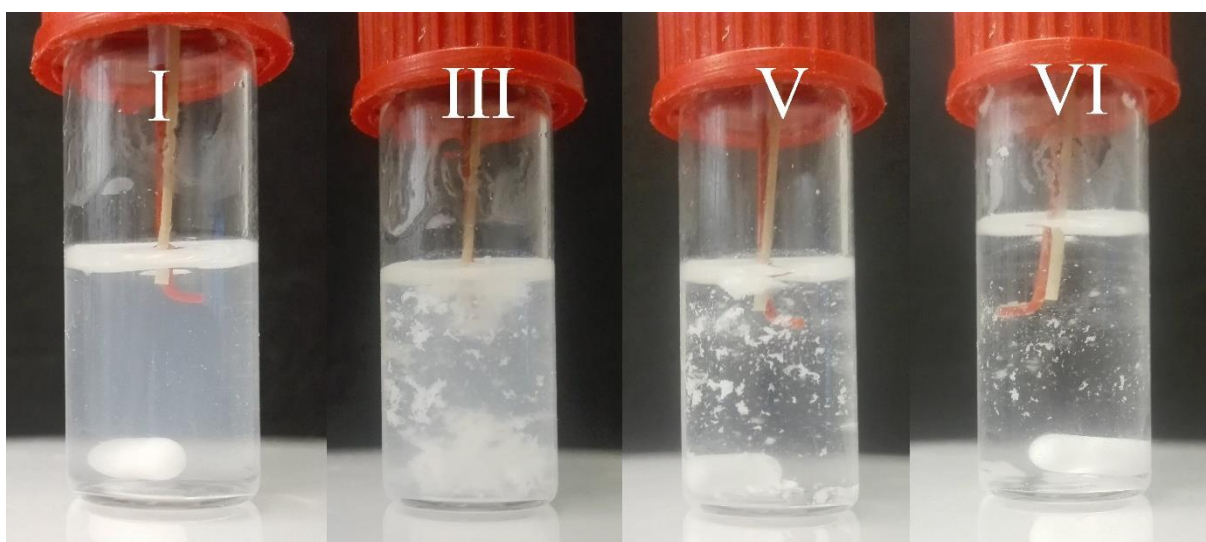
Při okometrickém pozorování titrace byl nejdříve titrován roztok CAE ve vodě do ultračisté deionizované vody. Tento experiment byl proveden pro ověření, zda se nedějí vizuální změny po dosažení CMC. Při tomto experimentu však k žádným změnám nedocházelo, roztok po celou dobu titrace zůstal čirý (viz. **Obrázek X 1**).

Poté byly provedeny titrace do roztoků hyaluronanu (13 kDa a 1 400–1 600 kDa) rozpuštěného ve vodě a v 0,15 M NaCl. Při titraci docházelo k vizuální změně po dosažení koncentrací, které vymezují definované oblasti, viz. kapitola 3.8.3.3. Na **Obrázku 20** vidíme čtyři fotografie roztoků hyaluronanu (13 kDa) se zvyšující se koncentrací CAE. Každá fotografie je označena číslem oblasti, ve které se roztok právě nachází (na základě koncentrace CAE v roztoku). Dochází zde k postupnému zakalení a poté dochází ke vzniku agregátů. Ke konci titrace dochází k rozpuštění větších agregátů a v roztoku zůstávají pouze drobné částice.



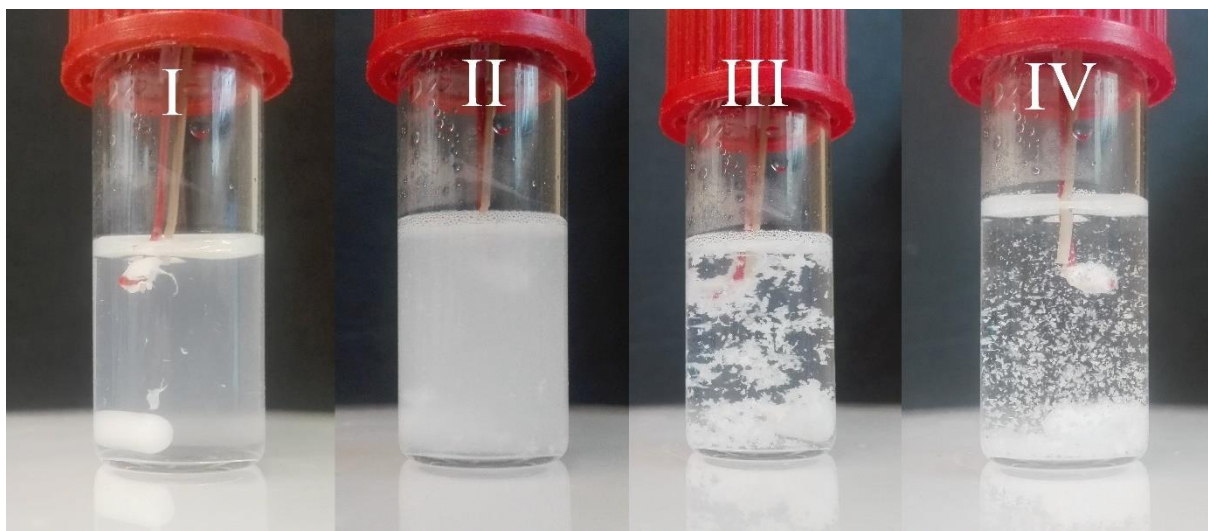
Obrázek 20: Fotografie s vyznačenými oblastmi (I, III, V, VI) pro systém hyaluronan-CAE. Molekulová hmotnost hyaluronanu je 13 kDa a je rozpuštěn ve vodném prostředí.

Na **Obrázku 21** jsou vybrány fotografie z titrace tenzidu CAE do vodného roztoku hyaluronanu (1 400–1 600 kDa). V první části (I) této fotografie je možné vidět mírné zakalení, které je způsobeno zvyšující se koncentrací tenzidu. Probíhají zde pravděpodobně slabé interakce mezi hyaluronanem a tenzidem CAE. V oblasti III dochází k tvorbě větších agregátů. Oblast V je poté charakteristická částečným rozpouštěním těchto makroskopických útvarů. Dochází zde pravděpodobně k interakcím mezi micelami a dříve vytvořenými komplexy hyaluronan-CAE. V poslední části (VI) je možné vidět roztok, kdy se pravděpodobně tvoří pouze volné micely.



Obrázek 21: Fotografie s vyznačenými oblastmi (I, III, V, VI) pro systém hyaluronan-CAE. Molekulová hmotnost hyaluronanu rozpuštěného ve vodě je 1 400–1 600 kDa.

Obrázek 22 představuje spojení čtyř fotografií při titraci CAE do hyaluronanu rozpuštěného v 0,15 M NaCl (1 400–1 600 kDa). V tomto obrázku jsou zvýrazněny oblasti ve kterých se, dle koncentrace CAE, roztok hyaluronan-CAE právě nachází. V první oblasti (I) došlo ke vzniku sraženiny na míchadélku. Poté byl roztok s rostoucí koncentrací stále více zakalený (oblast II). Ve třetí oblasti (III) došlo ke vzniku větších agregátů, které se ve v poslední části (IV) postupně rozpouštěly.



Obrázek 22: Fotografie s vyznačenými oblastmi (I, II, III, IV) pro systém hyaluronan-CAE. Molekulová hmotnost hyaluronanu rozpuštěného v 0,15 M NaCl je 1 400–1 600 kDa.

Při titraci tenzidu do roztoku hyaluronanu (13 kDa) rozpuštěného v 0,15 M NaCl docházelo k prvním dvou oblastech (I, II) k zakalení. V následujících oblastech (III, IV) vznikaly menší agregáty, které po skončení titrace zůstaly nerozpuštěny. Tuto titraci zachycuje **Obrázek X 2**, který se nachází v příloze této diplomové práce.

Z pozorování těchto čtyř rozdílných titrací lze usoudit, že větší agregáty tvoří především hyaluronan o vyšších molekulových hmotnostech. Jednotlivé koncentrace roztoků, při kterých byly fotografie pořízeny, jsou součástí přílohy (viz. **Tabulka X 3**).

3.8.7 Určení molekulové hmotnosti CAE

Při měření molekulové hmotnosti CAE byl použit roztok o koncentraci 20 mg/ml. Měření bylo pětkrát opakováno. Chromatogram získaný pomocí metody SEC-MALS-dRI je vidět na **Obrázku X 3**. V **Tabulce 6** jsou zaznamenány výsledky jednotlivých měření molekulové hmotnosti CAE a odpovídající polydisperzita. Dále je v této tabulce uveden průměr ze všech měření a směrodatná odchylka. Průměrná molekulová hmotnost CAE je tedy 390,0 Da, což odpovídá podstatně menší molekule, než jakou je například nejnižší použitá molekulová hmotnost hyaluronanu (13 000 Da). U kationtového tenzidu CTAB je molekulová hmotnost 364,45 Da [54].

Tabulka 6: Tabulka výsledků měření molekulové hmotnosti CAE.

Číslo měření	Molekulová hmotnost	Polydisperzita
	M_w [Da]	(M_w/M_n)
1	345,2	1,05
2	384,9	1,19
3	362,0	1,02
4	375,6	1,07
5	482,1	1,18
Průměr	390,0	1,10
Odchylka	53,6	0,08

4 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala interakcemi mezi kationtovým tenzidem CAE a hyaluronanem ve dvou rozpouštědlech (voda; 0,15 M NaCl). V této práci byla jako hlavní metoda použita ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením v titračním režimu, u které je možné tyto interakce velmi detailně pozorovat. Jako doplňkové metody pro studium těchto interakcí byla použita denzitometrie, kde byla měřena hustota a ultrazvuková rychlost. Pro určení kritické micelární koncentrace tenzidu CAE byly použity metody HRUS, tenziometrie a isothermální kalorimetrie. K porovnání stability tenzidu ve vodě a v 0,15 M NaCl byla využita citlivá metoda ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. Hodnota molekulové hmotnosti tenzidu byla stanovena pomocí techniky SEC-MALS-dRI. Při okometrickém pozorování průběhu titrací, bylo pomocí automatického titrátoru dávkován tenzid do roztoku hyaluronanu a při vizuálních změnách byly pořízeny fotografie.

U ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením byla vždy vyhodnocována data ultrazvukového zeslabení a relativní ultrazvukové rychlosti. Při měření v titračním režimu byl, pomocí automatického titrátoru, přikapáván tenzid o koncentraci 20 mg/ml. Roztoky tenzidu při vyšší koncentraci (40 mg/ml) nebyly homogenní a bylo tedy nutné zvolit koncentraci CAE 20 mg/ml.

Při měření na ultrazvukovém spektrometru v kinetickém režimu bylo studováno chování tenzidu ve dvou různých rozpouštědlech po dobu 5 000 minut. Z výsledků lze usoudit, že tenzid je stabilnější v prostředí 0,15 M NaCl, kdy rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou relativní ultrazvukové rychlosti byl menší než v případě, kdy byl tenzid rozpuštěn v ultračisté deionizované vodě.

Pro určení kritické micelární koncentrace tenzidu ve vodě bylo použito více metod. Ovšem výsledky z ITC neodpovídají výsledkům získaných z ultrazvukového spektrometru v titračním režimu. V případě použití denzitometrické metody také nebyla hodnota kritické micelární koncentrace určena. Pravděpodobně tento tenzid není vhodný pro určení CMC pomocí této metody, jelikož výsledné hodnoty povrchového napětí měly naprosto odlišný trend v porovnání s jinými tenzidy, u kterých byla CMC určena touto technikou jednoznačně. Připravené vzorky použité pro měření povrchového napětí byly proměřeny také denzitometricky a pomocí metody HRUS v kinetickém režimu. Z hodnot relativní rychlosti z metody HRUS lze očekávat CMC v rozmezí 2–3 mg/ml. Nejpresnější metodou pro stanovení kritické micelární koncentrace byla technika HRUS v titračním režimu. Zde trend relativní rychlosti neprokázal naprostou stagnaci po dosažení CMC, ale došlo ke zpomalení růstu těchto hodnot. Kritická micelární koncentrace

tenzidu ve vodě byla určena při koncentraci CAE na 2,82 mg/ml při 25 °C, v případě prostředí 0,15 M NaCl byla tato hodnota 0,23 mg/ml. Při 37 °C byla ve vodě zaznamenána změna v ultrazvukové rychlosti při koncentraci 1,69 mg/ml. Hodnoty CMC při 25 °C a 37 °C ve vodném prostředí se velmi výrazně liší, což může být způsobeno tím, že použitý tensid není čistý, ale jedná se o směs látek, které podléhají strukturním změnám při změně teploty. Kritickou micelární koncentraci se nepovedlo určit pouze při teplotě 37 °C v prostředí chloridu sodného, kdy nebyla zaznamenána žádná změna v trendu relativní rychlosti. Dokonce ani hodnoty ultrazvukového zeslabení nezaznamenaly žádný zřetelný zlom.

Hyaluronan-CAE interakce studované ve vodném prostředí byly zřetelnější než v případě prostředí 0,15 M NaCl. Pokud byl hyaluronan rozpuštěn ve vodě, bylo možné pozorovat až 5 oblastí, kdy docházelo ke změnám v relativní rychlosti a také v zeslabení. V prostředí 0,15 M NaCl byly identifikovány pouze čtyři oblasti. Lépe postřehnutelné byly zlomy u hyaluronanu o vyšších molekulových hmotnostech. Poté byly připraveny roztoky o koncentracích, kdy docházelo k přechodům z jednotlivých oblastí a tyto vzorky byly proměřeny na denzitometru. Z výsledků je patrné, že zlomy byly rozpoznány i pomocí této techniky. Z hodnot relativní ultrazvukové rychlosti (HRUS) a hustoty (denzitometr) byla následně vypočítána stlačitelnost těchto vzorků. Následně byly provedeny okometrické titrace hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech. Z okometrického pozorování je zřejmé, že hyaluronan o vyšší molekulové hmotnosti tvoří větší agregáty, které se při rostoucí koncentraci tenzidu ve vzorku rozpouští.

Molekulová hmotnost byla stanovena jako průměr z pěti měření, kdy výsledná hodnota činila 390 Da, což je podobná hodnota, jakou vykazuje tensid CTAB (364,45 Da).

V této diplomové práci bylo úspěšně dosaženo předem vytyčených cílů. Bylo změřeno a částečně popsáno chování systému hyaluronan-CAE pomocí ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením a denzitometru ve dvou různých rozpouštědlech. Byla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace tohoto tenzidu ve vodném prostředí při dvou teplotách a při jedné teplotě v prostředí chloridu sodného. Ovšem kalorimetricky a denzitometricky nebyla stanovena žádná hodnota kritické micelární koncentrace.

Pro budoucí práci s tenzidem CAE je nutné určit kritickou micelární koncentraci více metodami. Především by bylo vhodné provést znovu kalorimetrické titrace, které jsou pro určení CMC tenzidu vhodnou technikou. CAE je slibným kationtovým tenzidem, který je na trhu již několik let. Tato povrchově aktivní látka vykazuje biodegradabilní charakter, a proto by mohla být vhodná pro cílenou distribuci léčiv.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATY

- [1] DALMEDICO, Michel Marcos, Marineli Joaquim MEIER, Jorge Vinícius Cestari FELIX, Franciele Soares POTT, Francislene de Fátima Cordeiro PETZ a Michelle Caroline SANTOS. Hyaluronic acid covers in burn treatment: a systematic review. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2016, 50(3), 522-528. DOI: 10.1590/S0080-623420160000400020. ISSN 0080-6234.
- [2] NECAS, J., BARTOSIKOVA L., BRAUNER, P., KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 2008. s. 397–407.
- [3] Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlycoForum: Science of Hyaluronan* [online]. 1997 [cit. 2017-01-26].
Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [4] Laurent, Torvard C.; Fraser, J. Robert E. . Hyaluronan. *The FASEB Journal*. 1992, no. 6, pp. 2397 - 2404.
- [5] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3527302301.
- [6] LAPČÍK, Lubomír, Lubomír LAPČÍK, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, issue 8, s. 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr941199z>
- [7] CONTIPRO. Kyselina hyaluronová [online]. Dolní Dobrouč, 2006 [cit. 2017-04-05].
Dostupné z: <http://www.contipro.cz/o-contipru/kyselina-hyaluronova>
- [8] KUO, J. W., SWANN, D. A., PRESTWICH, G. D. *Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides*. 2. vydání. *Bioconjugate Chemistry*, 1991. s. 232.
- [9] KOGAN, Grigorij, ŠOLTÉS, Ladislav, STERN, Robert, GEMEINER, Peter. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters* [online]. 2006-12-8, roč. 29, č. 1, s. 17–25 [cit. 2018-01-02].
Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10529-006-9219-z>
- [10] Prestwich, G. D., and Vercruyse, K. P. (1998) Profiles Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives, *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1, 42-43.

- [11] BERRY, M. G., NAVSARIA, H. A., PRICE, R. D. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery* [online]. 2007, roč. 60, č. 10 [cit. 2017-04-03].
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748681507001805>
- [12] Entwistle, J. , Hall, C. L. and Turley, E. A. (1996), HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.*, 61: 569-577. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<569::AID-JCB10>3.0.CO;2-B
- [13] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU MAGAZINE of MEDICINE (NEUMM)* [online]. 2009, roč. 4, č. 1-2, s. 75-79 [cit. 2017-06-06].
Dostupné z: http://www.neumm.cz/public/img/neumm_09_1-2/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf
- [14] Stern, R.: Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancerbiology. *Pathologie Biologie*, 2005, roč. 53, č. 7, s. 372-382. ISSN 03698114.
- [15] Lebel, L.: Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, roč. 7, č. 2, s. 221-235, ISSN 0169409x
- [16] Scott, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 2018-01-28].
Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [17] *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2005, 19(3) [cit. 2018-01-28]. ISSN 0926-9959.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>
- [18] Kogan, G., Šoltés, S., Stern, R., Gemeiner, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, no. 1, pp. 17-25. ISSN 0141-5492
- [19] Svanovský, E.: Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a Slovenská farmacie*, 2007, roč. 56, č. 6., s. 264-268. ISSN 1210-7816
- [20] Rah, M.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry*, 2011, roč. 82, č. 1, s. 38–43.

- [21] Frontiers in Physiology [online]. 2016, 7 [cit. 2018-04-28]. ISSN 1664-042X.
Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00341/abstract>
- [22] Gold MH. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(3):369-376.
- [23] Kolarz, G., Kotz, R., Hochmayer, I.: Long-term benefits and repeated treatment cycles of intra-articular sodium hyaluronate (Hyalgan) in patients with osteoarthritis of the knee. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2003, roč. 32, č. 5, s. 310-319.
- [24] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [25] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [26] SCHRAMM, Laurier L., Elaine N. STASIUK a D. Gerrard MARANGONI. 2 Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem* [online]. 2003, **99**, 3-48 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1039/B208499F. ISSN 0260-1826.
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B208499F>
- [27] Surfactants. www.sciencelearn.org.nz [online]. 2012 [cit. 2018-02-01].
Dostupné z: <http://www.sciencelearn.org.nz/Science-Stories/Where-Land-Meets-Sea/SciMedia/Images/Surfactants>
- [28] CHEVALIER, Y, T ZEMB, Avinoam BEN-SHAUL, William M. GELBART, J. ROUCH, P. CHABRAT, P. TARTAGLIA, D. LANGEVIN. The structure of micelles and microemulsions: Structure and phase transitions in micelle solutions. *Reports on Progress in Physics*. 1990, vol. 53, issue 3, pp. 327-349.
- [29] RANGEL-YAGUI Carlota Oliveira, Adalberto PESSOA, Leoberto Costa TAVARES. Micelle solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, vol. 8, pp. 147-163.
- [30] Jones, M., Leroux, J.: Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1999, č. 48, s.101–111.
- [31] CAE: Amino Acid Based Cationic Surfactant. Tokyo, Japonsko, 2016.

Dostupné z: http://www.aminoscience.com.br/cosmeticos/tensoativos/CAE-E-160201_nomark.pdf

- [32] Thalberg, K.; Lindman, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 1478–1483.
- [33] Thalberg, K.; Lindman, B.; Karlstroem, G. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 4289–4295.
- [34] Thalberg, K.; Lindman, B.; Karlstroem, G. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 3370–3376.
- [35] Kayitmazer, A. B.; Seyrek, E.; Dubin, P. L.; Staggemeier, B. A. Influence of chain stiffness on the interaction of polyelectrolytes with oppositely charged micelles and proteins. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 8158–8165.
- [36] Lapitsky, Y.; Parikh, M.; Kaler, E. W. Calorimetric determination of surfactant/polyelectrolyte binding isotherms. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 8379–8387.
- [37] Bao, H.; Li, L.; Gan, L. H.; Zhang, H. Interactions between ionic surfactants and polysaccharides in aqueous solutions. *Macromolecules* 2008, 41, 9406–9412.
- [38] KARGEROVÁ, Andrea a Miloslav PEKAŘ. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir*. 2014, 30(40), 11866-11872. DOI: 10.1021/la501852a. ISSN 0743-7463.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la501852a>
- [39] Introduction: High resolution ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2018-02-16].
Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20intro.htm>
- [40] PEKAŘ M., J. KUČERÍK, D. ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii, *CheMagazín* 2005, vol. 1, pp. 12-14.
- [41] S.C. SCHNEIDER, M. LEVY, B.R. MCAVOY, EDITORS, S.C. Schneider, M. Levy, B.R. McAvoy, editors a *Ferroelectrics SPONSORED BY THE ULTRASONICS*. 1998 *IEEE Ultrasonics Symposium: proceedings : an international symposium : October 5-8,*

- 1998, Hotel Metropolitan Sendai, Sendai, Miyagi, Japan. Piscataway, N.J: IEEE, 1999. ISBN 07-803-4095-7.
- [42] POVEY, M. J. W. *Ultrasonic techniques for fluids characterization*. San Diego: Academic Press, c1997. ISBN 01-256-3730-6.
- [43] The Ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. Ultrasonic Scientific: The wave of the future [online]. 2007 [cit. 2018-02-14].
Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20principles.htm>
- [44] BUCKIN, Vitaly, KUDRYASHOV, Eugeny; O'DRISCOLL Breda. High-resolution ultrasonic spectroscopy for material analysis. *Spectroscopy perspectives*. 2002, č. 28, s. 28-31.
- [45] O'DRISCOLL, B., C. SMYTH, A.C. ALTING, R.W. VISSCHER a V. BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, s. 54-57
- [46] BUCKIN, Vitaly, Eugeny KUDRYASHOV a Breda O'DRISCOLL. An Alternative Spectroscopy Technique for Biopharmaceutical Applications. *Pharmaceutical technology Europe*. Chester, UK: Advanstar Pub., 2002, (December). ISSN 1753-7967
- [47] O'DRISCOLL, B., C. SMYTH, A.C. ALTING, R.W. VISSCHER a V. BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, s. 54-57.
- [48] TRTEK, J. Charakterizace pektinu ultrazvukovou spektroskopií. Brno, 2016. Bakalářská práce. Vysoké učení technické. Vedoucí práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D
- [49] BROWN, Tracey. The Development of Hyaluronan as a Drug Transporter and Excipient for Chemotherapeutic Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, 9(4), 253-260. DOI: 10.2174/138920108785161514. ISSN 13892010.
- [50] Halasová, T., Krouská, J., Mravec, F., Pekař, M.: Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, roč. 391, č. 1–3, s. 25–31.

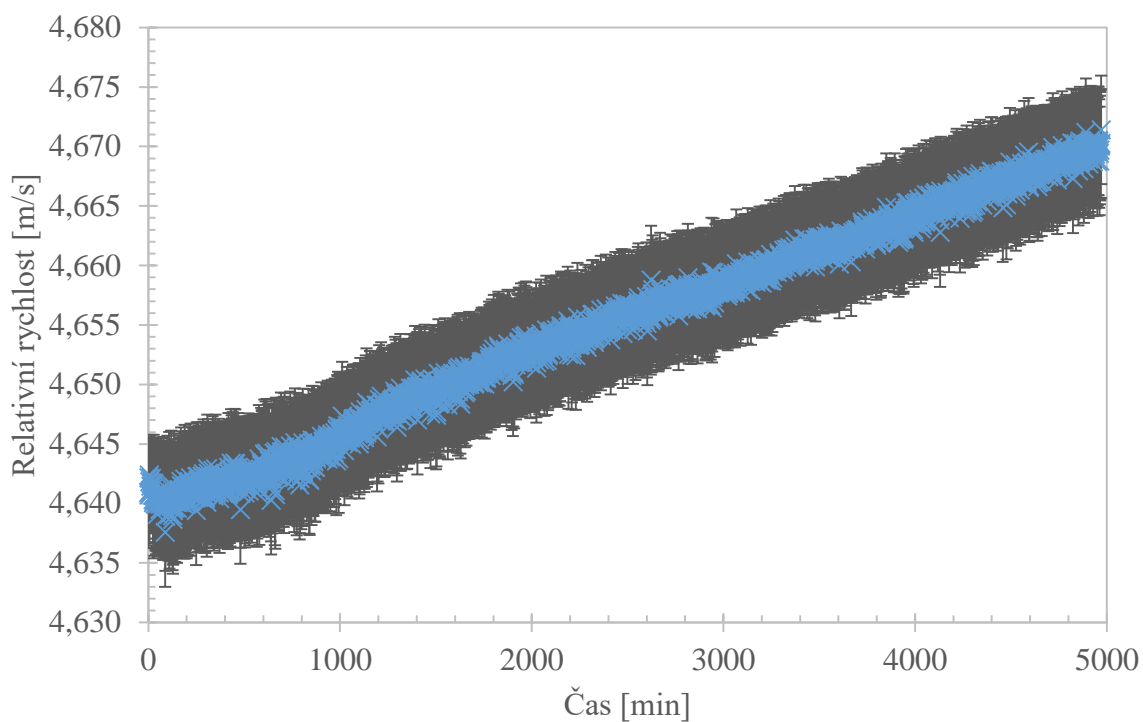
- [51] HALASOVÁ, T. Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 160 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [52] JARÁBKOVÁ, S. Hydrogely na bázi kladně nabitých polyelektrolytů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 91 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [53] MONDEK, J. Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 162 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [54] Cetyltrimethylammonium bromide. *ChemSpider* [online]. [cit. 2018-05-05].
Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5754.html>

6 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

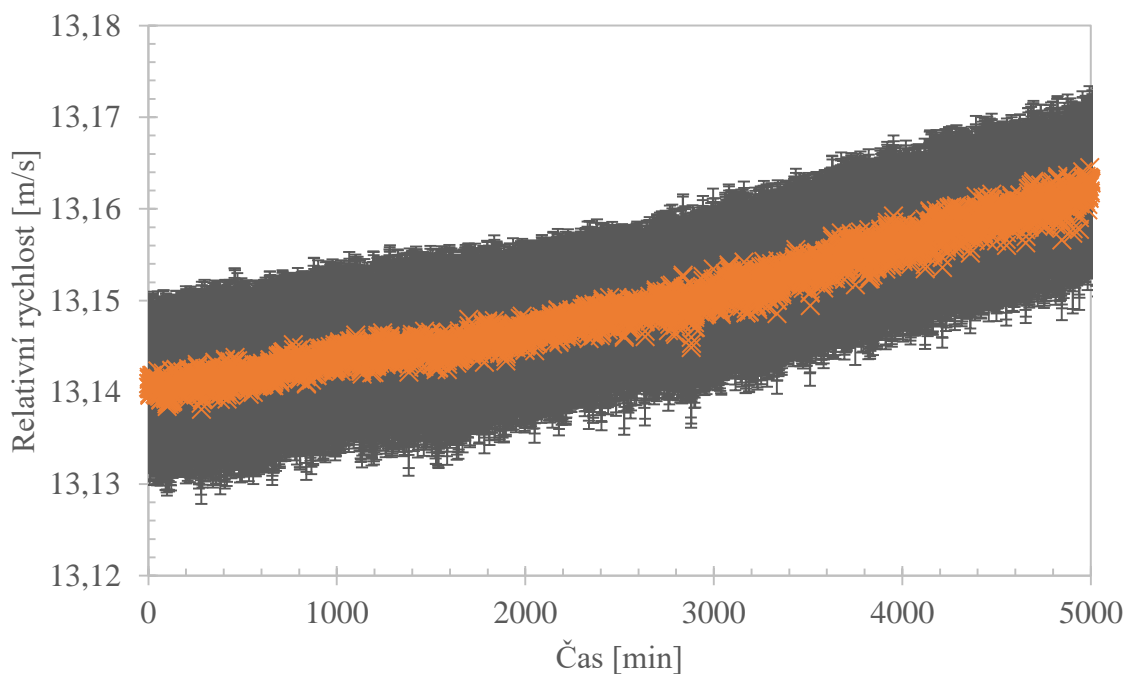
Da	Dalton, 1 Da = 1 g/mol, jednotka molekulové hmotnosti
HYA	Hyaluronan
kDa, MDa	Kilodalton (1kDa = 1000 Da), Megadalton (1MDa = 1 000 000 Da) Jednotky molekulové hmotnosti
Hz	Hertz, jednotka frekvence
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
M_w	Molekulová hmotnost, z anglického molecular weight
ot/min	Jednotka rychlosti, udává počet otáček za minutu.
č. p.	Číslo píku
CTAB, TTAB	Kationaktivní tenzidy (Cetyltrimethylammonium bromid, tetradecyltrimethylammonium bromid)
SDS, SDBS	Anionaktivní tenzidy (Dodecylsulfát sodný, Dodecylbenzensulfonát sodný)
CMC	Kritická micelární koncentrace (koncentrace, při níž dochází v roztoku k tvorbě micel)
g/cm³	Gram na centimetr krychlový, jednotka hustoty
dU	Relativní ultrazvuková rychlost
N	Relativní ultrazvukové zeslabení
°C	Vedlejší jednotka teploty, stupeň Celsia
v	Ultrazvuková rychlost
ρ	Hustota
CAE	Označení tenzidu použitého v experimentální části
HRUS	Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (high resolution ultrasonic spectroscopy)
M	Mol na litr, jednotka molární koncentrace
σ	Označení povrchového napětí
N/m	Jednotka povrchového napětí, Newton na metr
SEC–MALS–dRI	Metoda pro určení molekulové hmotnosti
HAS1, HAS2, HAS3	Označení regulačních enzymů pro tvorbu hyaluronanu
GAG	Označení glykosaminoglykanů
UDP	Označení uridindifosfátu

PAL	Označení pro povrchově aktivní látky
NMR	Nukleární magnetická rezonance
E575	Označení glukonolaktonu jako potravinářského aditiva
CD44	Receptor na hyaluronan vyskytující se u savců
bar⁻¹	Jednotka stlačitelnosti, bar
PBS	Označení pro pufr o pH 7,4
m/s	Jednotka rychlosti, metr za sekundu
min	Jednotka času, minuta
mg/ml	Jednotka koncentrace, miligram na mililitr
M_w/M_n	Označení polydisperzity
ITC	Isotermální titrační kalorimetrie

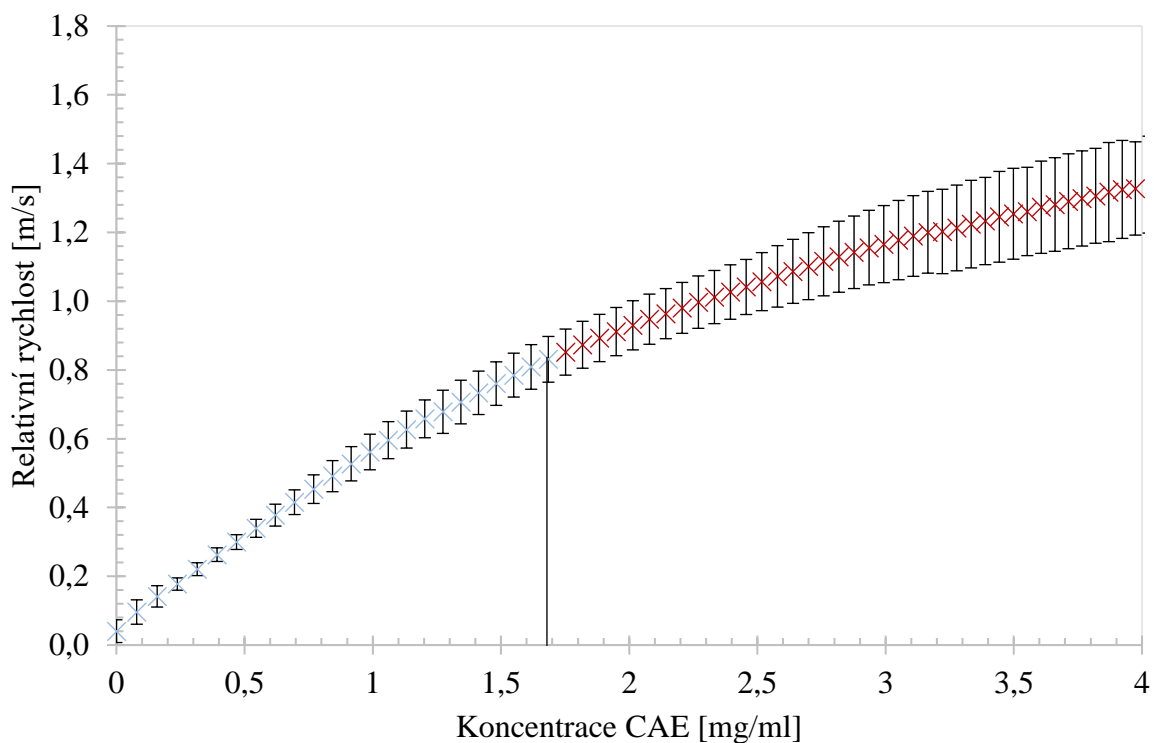
7 PŘÍLOHY



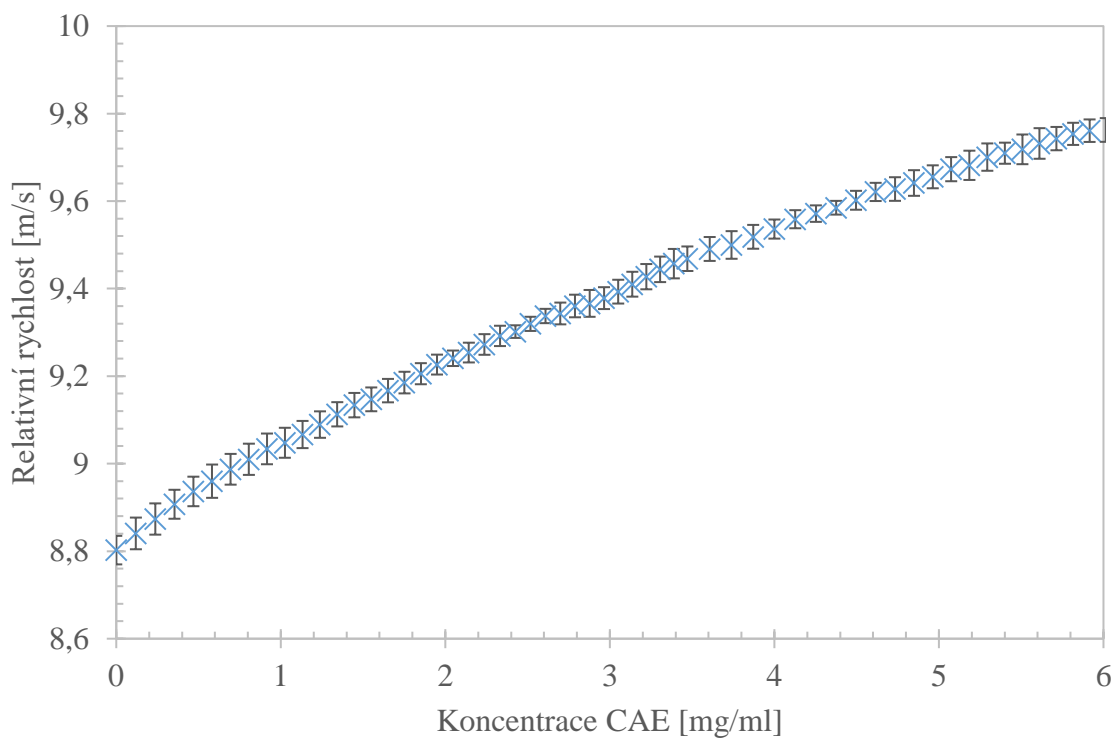
Graf X 1: Průměrné hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na čase pro vzorek 20mg/ml CAE ve vodě včetně chybových úseček.



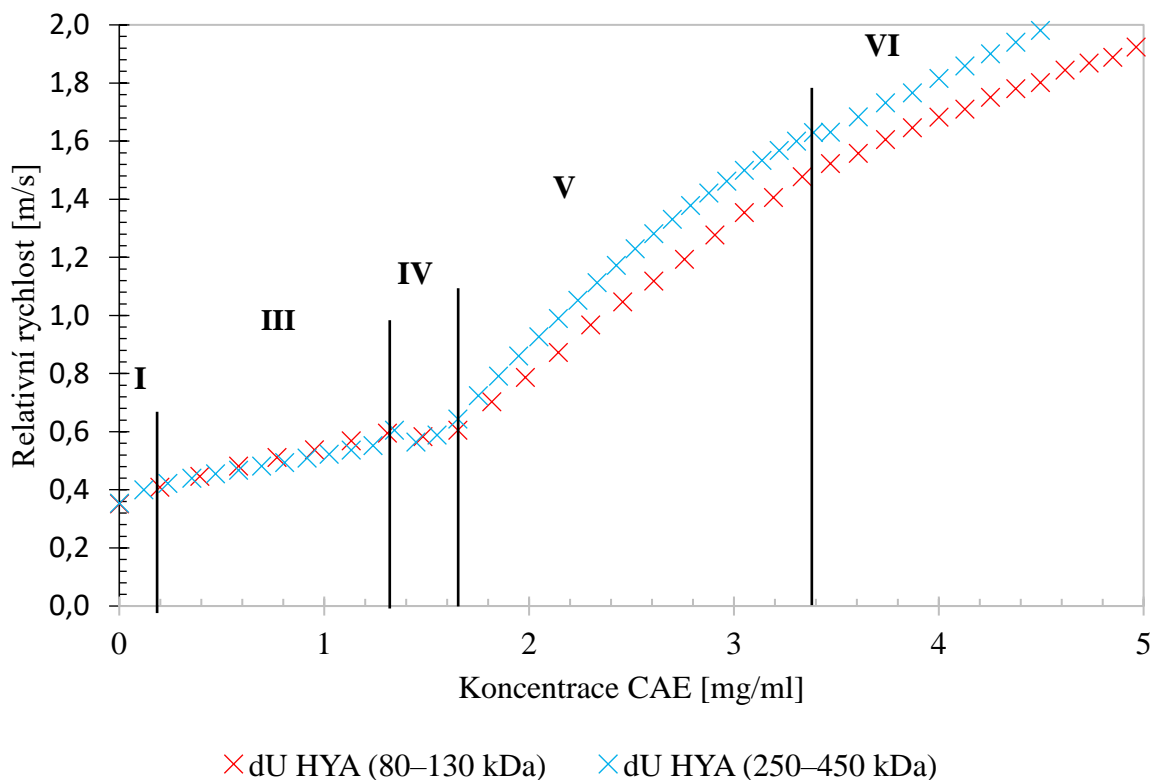
Graf X 2: Graf znázorňující závislost velikosti ultrazvukové rychlosti na čase v roztoku CAE o koncentraci 20 mg/ml v 0,15 M NaCl v závislosti na čase.



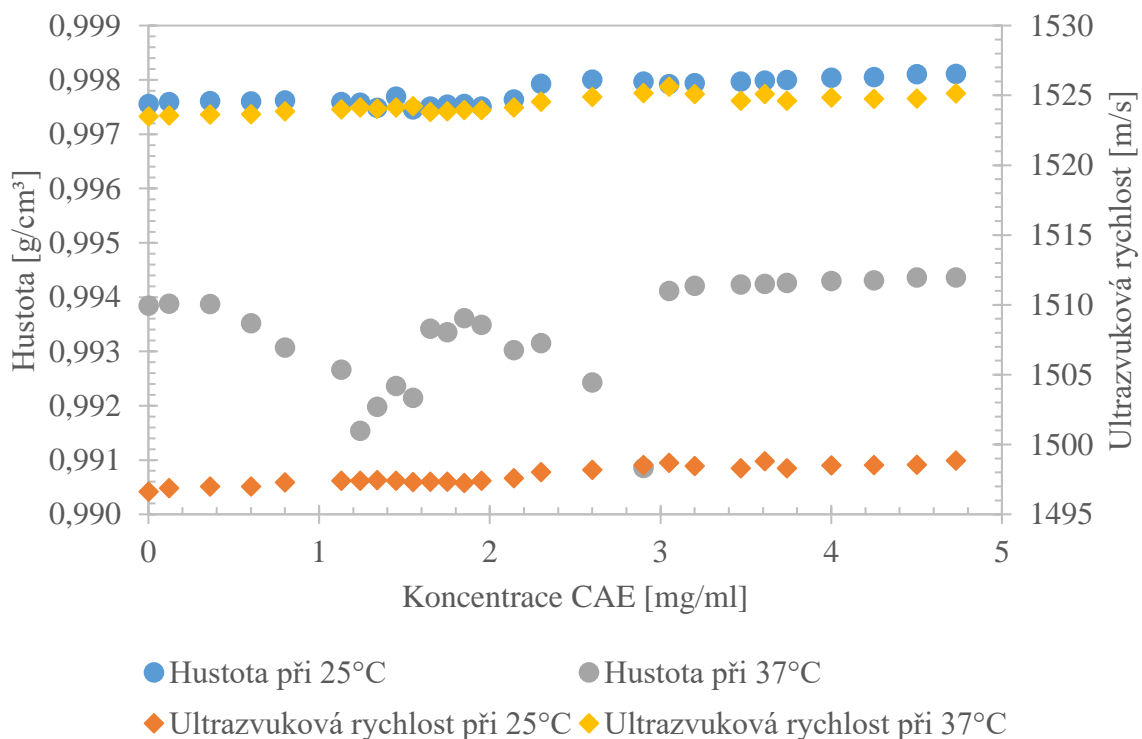
Graf X 3: Graf znázorňující závislost relativní rychlosti na koncentraci CAE při 37 °C ve vodě. CMC byla určena na hodnotu koncentrace 1,69 mg/ml.



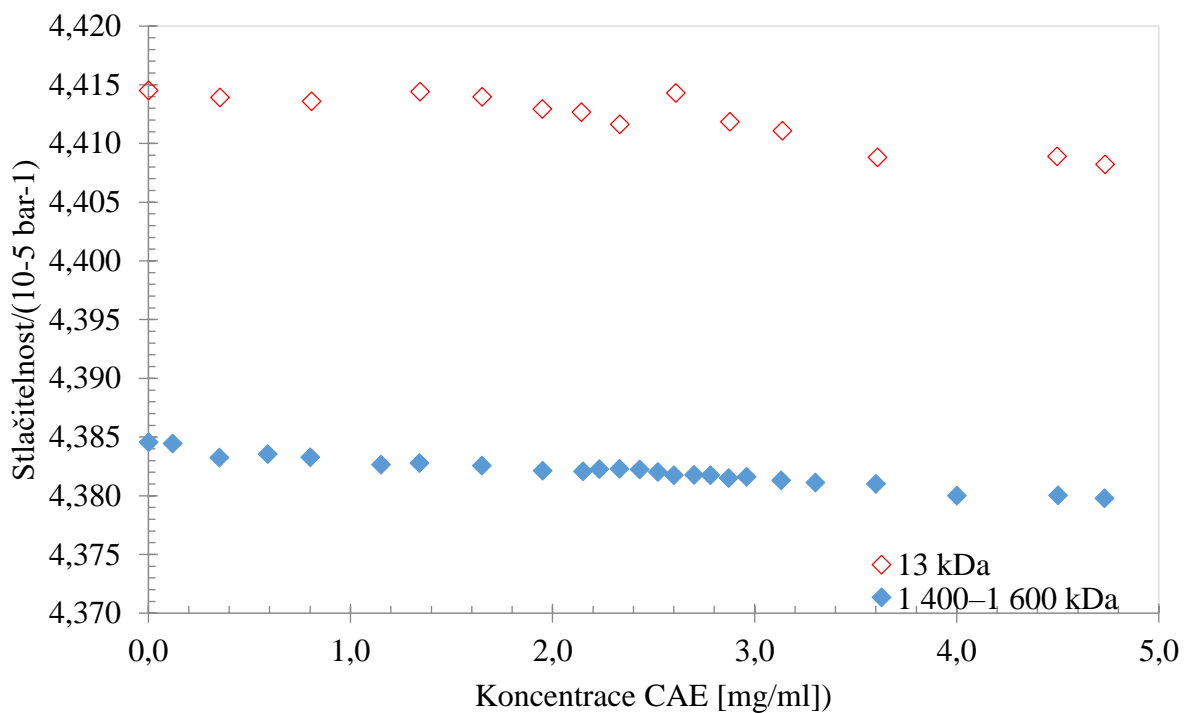
Graf X 4: Závislost průměrné relativní rychlosti na koncentraci při určení CMC v 0,15 M NaCl.



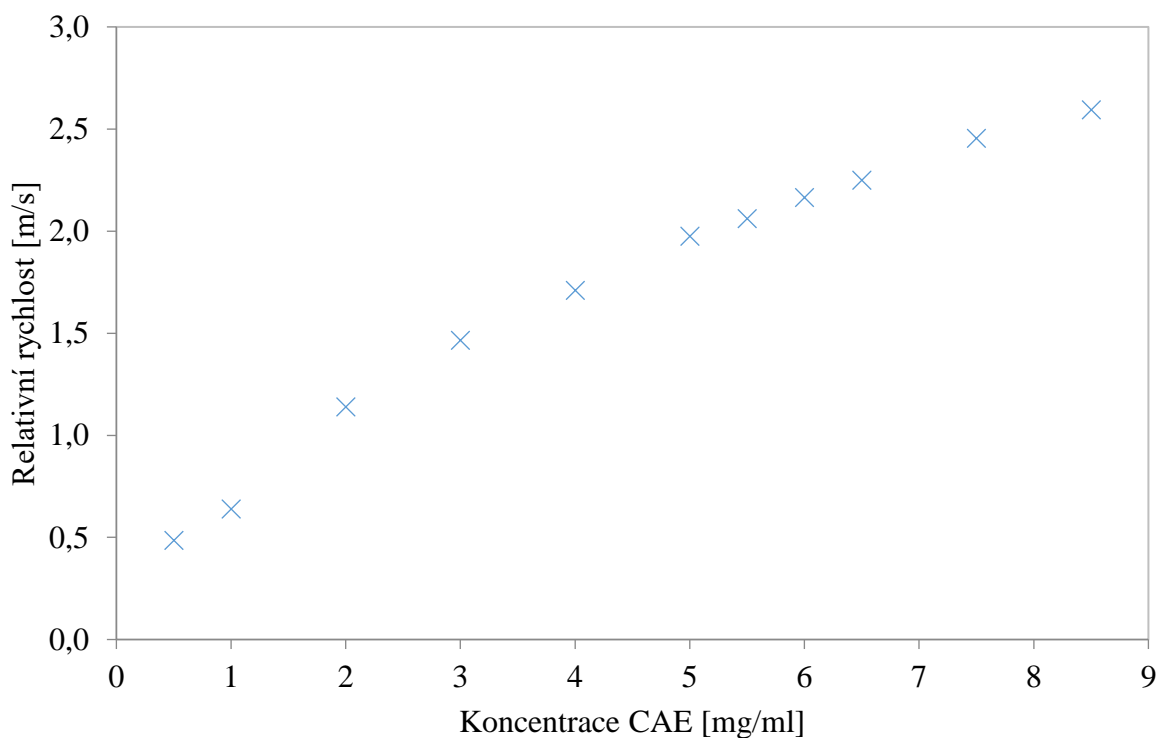
Graf X 5: Porovnání titračních profilů hyaluronanu (80–130 kDa a 250–450 kDa) při 25 °C ve vodě.



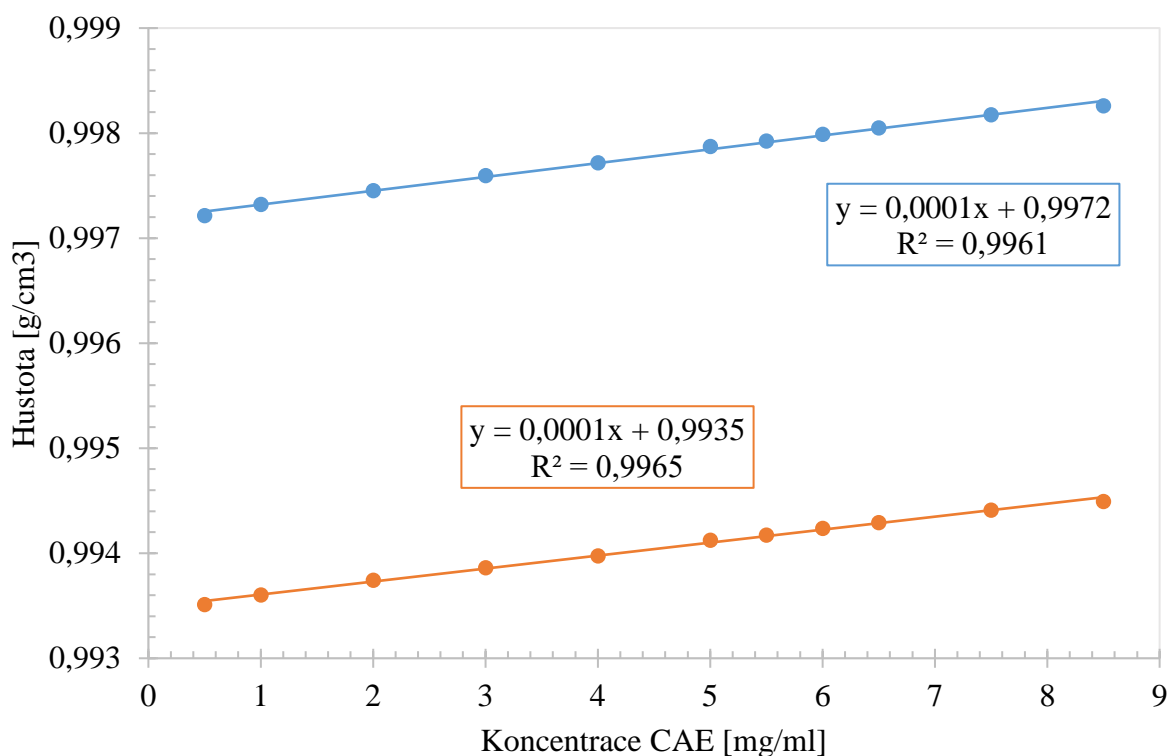
Graf X 6: Porovnání denzitometrických výsledků hyaluronan-CAE pro 25 °C a 37 °C. Molekulová hmotnost hyaluronanu je v tomto případě 13 kDa.



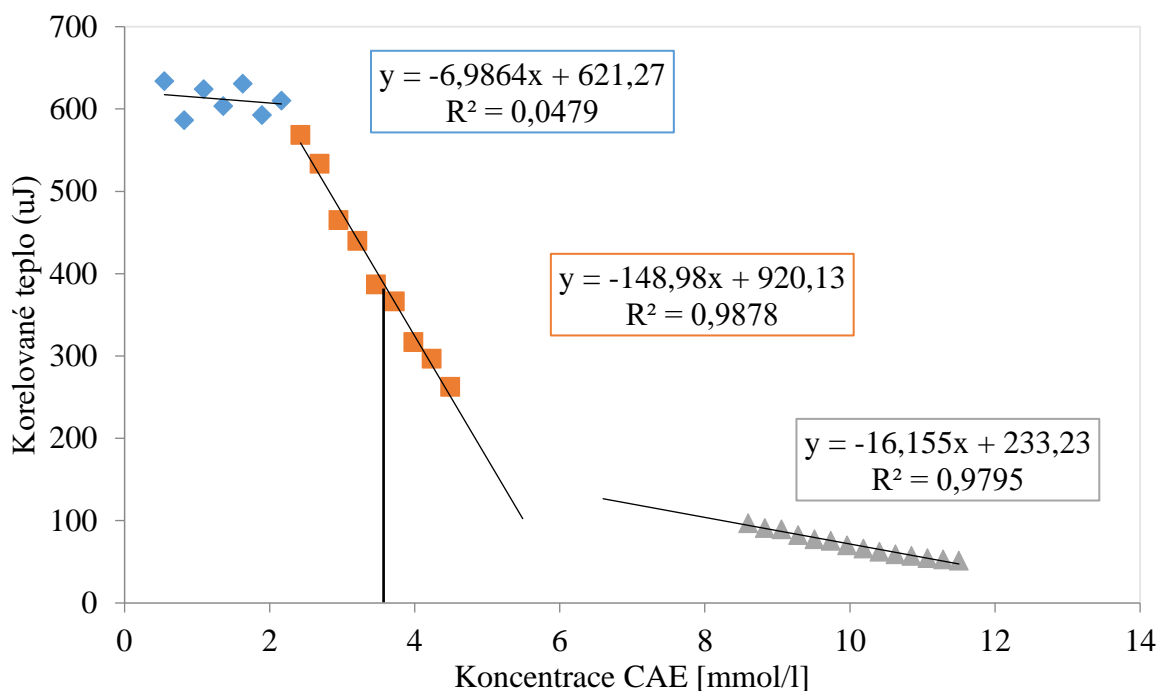
Graf X 7: Závislost vypočtené stlačitelnosti na koncentraci CAE při 25 °C v prostředí 0,15 M NaCl.



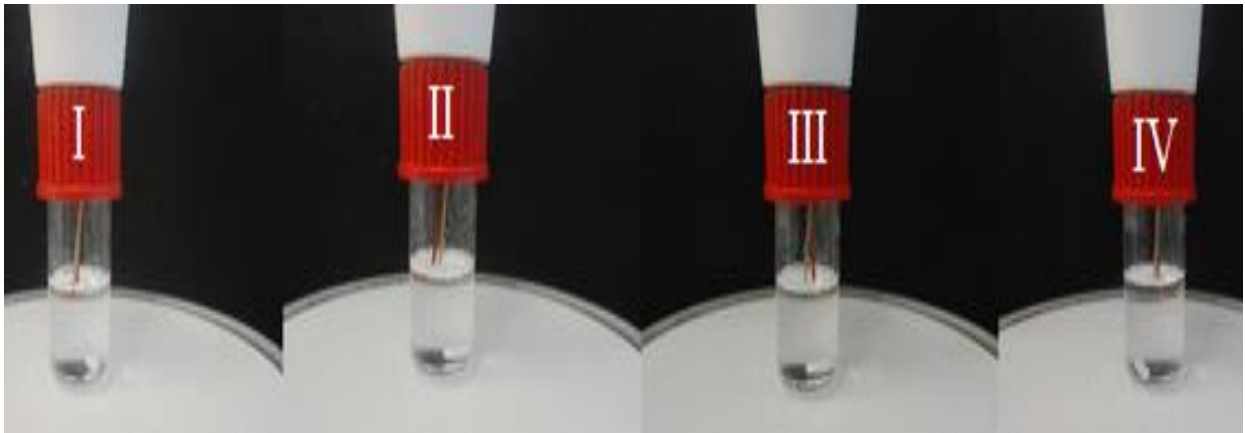
Graf X 8: Závislost relativní rychlosti na koncentraci CAE pro vybrané vzorky použité k měření povrchového napětí.



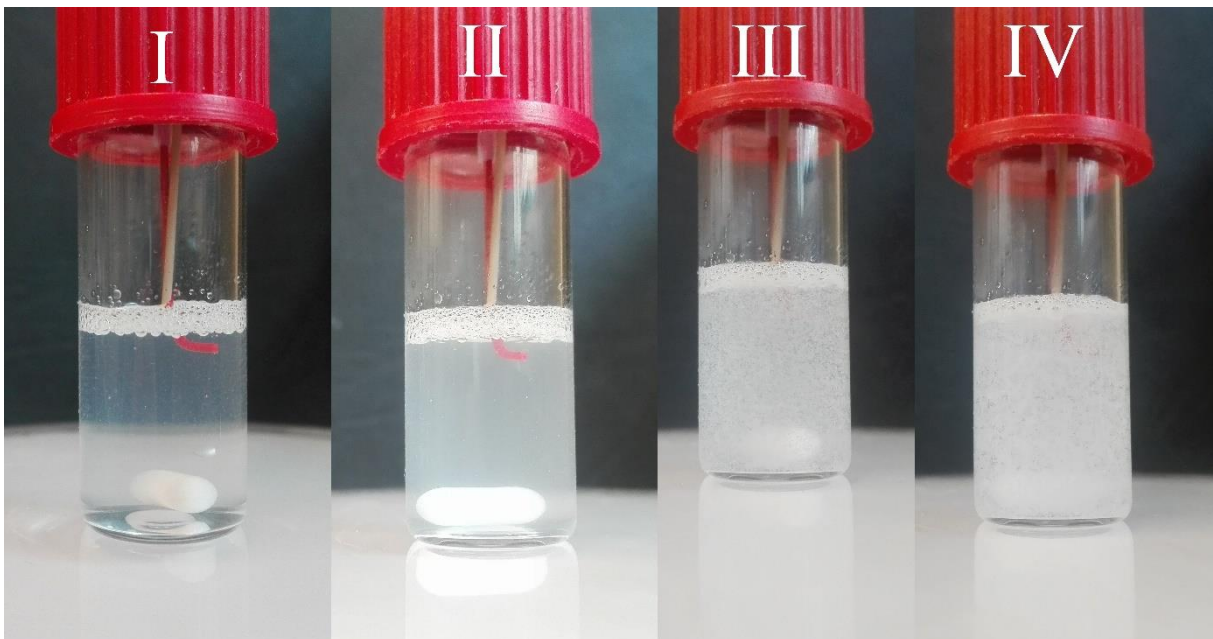
Graf X 9: Závislost hustoty na koncentraci CAE pro vybrané vzorky použité pro měření povrchového napětí.



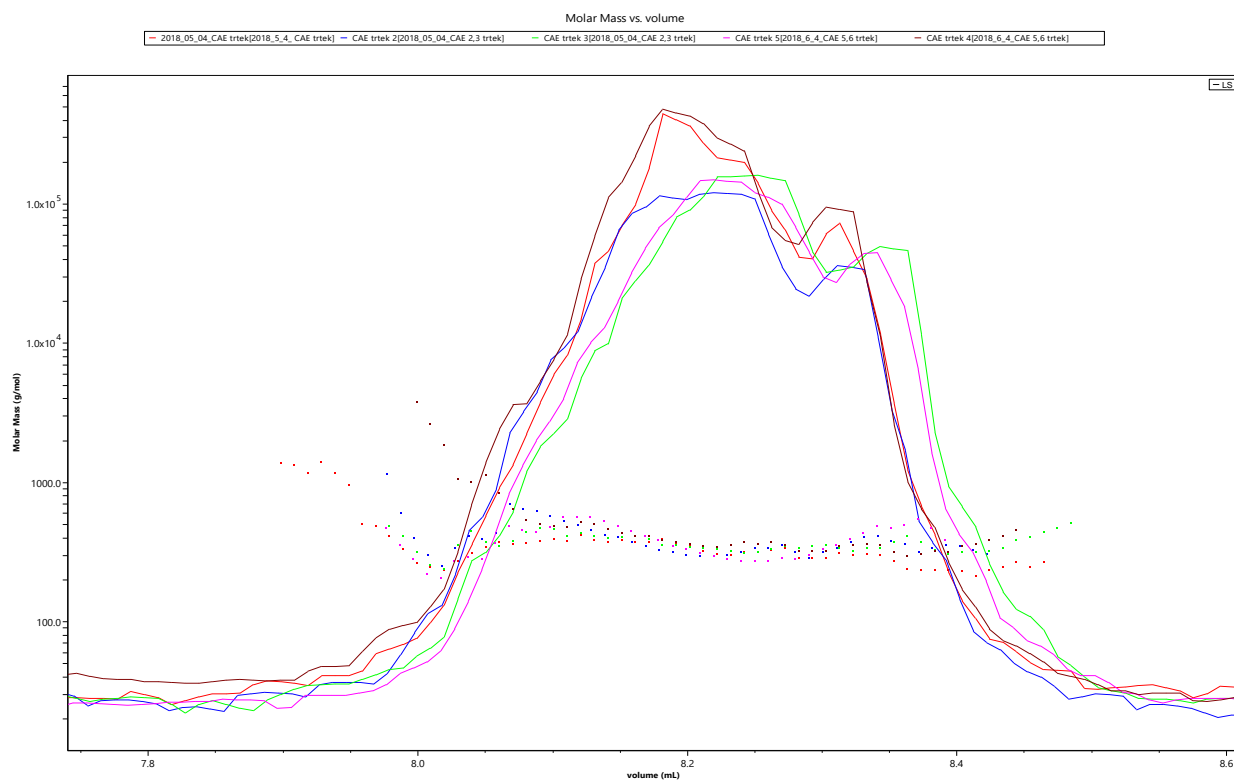
Graf X 10: Výsledný graf kalorimetrického měření kritické micelární koncentrace tenzidu CAE ve vodném prostředí při 25 °C. Kritická micelární koncentrace je při koncentraci 3,64 mmol/l.



Obrázek X 1: Sloučené fotografie při titraci pro určení CMC tenzidu ve vodě. Při postupném zvyšování koncentrace tenzidu ve vialce. Koncentrace CAE jsou I = 0,3 mg/ml; II = 2,6 mg/ml; III = 3,1 mg/ml; IV = 5,8 mg/ml.



Obrázek X 2: Fotografie s vyznačenými oblastmi (I, II, III, IV) pro systém hyaluronan-CAE. Molekulová hmotnost hyaluronanu rozpuštěného v 0,15 M NaCl je 13 kDa.



Obrázek X 3: Chromatogram, kde je závislost molární hmotnosti na objemu. Tento chromatogram byl získán na základě měření molekulové hmotnosti CAE.

Tabulka X 1: Tabulka hodnot stlačitelnosti pro hyaluronan (1 400–1 600 kDa) ve dvou rozpouštědlech.

Prostředí	Voda	0,15 M NaCl
Koncentrace CAE [mg/ml]	β [10^{-5} bar $^{-1}$]	β [10^{-5} bar $^{-1}$]
0	4,470	4,385
0,12	4,471	4,384
0,35	4,469	4,383
0,59	4,469	4,384
0,8	4,469	4,383
1,15	4,470	4,383
1,24	4,470	-
1,34	4,468	4,383
1,45	4,469	-
1,55	4,469	-
1,65	4,468	4,383
1,75	4,468	-
1,95	-	4,382
2,15	4,466	4,382
2,23	-	4,382
2,33	4,465	4,382
2,43	-	4,382
2,52	-	4,382
2,6	4,462	4,382
2,7	-	4,382
2,78	-	4,382
2,87	4,461	4,382
2,96	-	4,382
3,05	4,462	-
3,13	-	4,381
3,3	4,460	4,381
3,6	4,460	4,381
3,61	4,459	-
3,74	4,459	-
4	4,458	4,380
4,5	4,457	4,380
4,73	4,457	4,380
5,1	-	4,378

Tabulka X 2: Tabulka hodnot stlačitelnosti pro hyaluronan (13 kDa) ve dvou rozpouštědlech.

Prostředí	Voda	0,15 M NaCl
Koncentrace CAE [mg/ml]	β [10^{-5} bar $^{-1}$]	β [10^{-5} bar $^{-1}$]
0	-	4,415
0,12	4,469	-
0,36	4,469	4,414
0,6	4,469	-
0,8	4,469	4,414
1,13	4,468	-
1,24	4,468	-
1,34	4,469	4,414
1,45	4,468	-
1,55	4,468	-
1,65	4,468	4,414
1,75	4,467	-
1,85	4,467	-
1,95	4,467	4,413
2,14	4,466	4,413
2,3	4,464	4,412
2,6	4,462	4,414
2,87	-	4,412
3,05	4,462	-
3,13	-	4,411
3,2	4,461	-
3,47	4,460	-
3,61	4,460	4,409
3,74	4,460	-
4	4,459	-
4,25	4,459	-
4,5	4,458	4,409
4,73	4,458	4,408
6		4,405

Tabulka X 3: Tabulka koncentrací a příslušných oblastí při okometrických titracích.

Hyaluronan	Koncentrace CAE [mg/ml]	Oblast
13 kDa v H ₂ O	0,29	I
	1,26	III
	2,91	V
	5,34	VI
1 400–1 600 kDa v H ₂ O	0,29	I
	1,07	III
	2,04	V
	3,79	VI
13 kDa v 0,15 M NaCl	0,29	I
	1,36	III
	2,82	III
	4,47	IV
1 400–1 600 kDa v H ₂ O	0,29	I
	2,33	II
	2,52	III
	4,76	IV