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

FYZIKÁLNÍ HYDROGELY NA BÁZI BIOPOLYMERŮ A TENZIDŮ
PHYSICAL HYDROGELS BASED ON BIOPOLYMERS AND SURFACTANTS

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Ing. Tomáš Velcer

ŠKOLITEL
SUPERVISOR
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání dizertační práce

Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	Akademický rok:	2020/21
Student:	**Ing. Tomáš Velcer**		
Studijní program:	Fyzikální chemie		
Studijní obor:	Fyzikální chemie		
Vedoucí práce:	**prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**		

Název dizertační práce:

Fyzikální hydrogely na bázi biopolymerů a tenzidů

Zadání dizertační práce:

Studium zvolených vlastností hydrogelů tvořených interakcemi opačně nabitého biopolymeru a tenzidu, konkrétně hyaluronanu a tzv. septonexu. Soustředit se zejména na reologické vlastnosti a jejich ovlivnění způsobem přípravy, teplotou. Jako doplněk se věnovat analytickým metodám stanovení složení gelů (supernatantu) a antimikrobiálním vlastnostem.

Termín odevzdání dizertační práce: 15.4.2021:

Ing. Tomáš Velcer student(ka)	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 1.9.2020

ABSTRAKT

Tato dizertační práce zkoumá vlastnosti a chování fázově separovaných hydrogelů. Ty mohou být připraveny interakcí polyelektrolytů s opačně nabitými tenzidy. Pro tuto roli byli vybráni záporně nabitý polysacharid hyaluronan a kationtový tenzid karbethopendeciniumbromid (Septonex), jejichž vlastnosti, chování a využití jsou popsány v prvních kapitolách teoretické části. Hyaluronan se přirozeně vyskytuje v živých organismech a je znám pro svou schopnost cílení k nádorovým buňkám pomocí specifických receptorů. Septonex se používá pro své antiseptické a dezinfekční účinky. Experimentální část se zaměřuje na důkladné studium chování těchto typů hydrogelů, zejména z reologického pohledu. Stanovení mechanických vlastností a jejich modulovatelnosti v závislosti na podmínkách přípravy, jako např. složení, teplota prostředí nebo vliv rozpouštědla, je esenciální pro designování podrobnějších studií. Strukturní analýza za pomoci ATR-FTIR, iontové chromatografie či ICP-OES přispěla ke stanovení obsahu jednotlivých složek ve výsledném hydrogelu. Antimikrobiální aktivitě hydrogelů je věnována závěrečná část práce. Výsledky této práce naznačují možné potenciální užití daných typů hydrogelů na poli medicínských aplikací.

ABSTRACT

This doctoral thesis studies the properties and behaviour of phase-separated hydrogels. These can be prepared by interaction of polyelectrolytes with oppositely charged surfactants. Negatively charged polysaccharide hyaluronan and cationic surfactant carbethopendecinium bromide (Septonex), whose properties, behaviour and utilization are described in the first two chapters of theoretical part, were selected for this role. Hyaluronan is naturally-occuring in living organisms and is known for his specific targeting to the tumour cells. Septonex is used as antiseptic and disinfectant. Experimental part of this work is focused on examination of the structure and behaviour of these types of hydrogels especially from rheological point of view. The crucial part of this study was to establish mechanical properties and their dependence on environment. This led to design further studies. Structural analysis was held using the methods of ATR-FTIR, ionic chromatography and ICP-OES helping to measure the inner content of entry materials in the gels and supernatants respectively. The last chapter deals with antimicrobial activity. The results of this study indicate a potential usage of these substances in the field of medical applications.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzidy, karbethopendeciniumbromid, hydrogely, reologie, ATR-FTIR, IC, ICP-OES, antimikrobiální aktivita

KEYWORDS

hyaluronan, surfactants, carbethopendecinium bromide, hydrogels, rheology, ATR-FTIR, IC, ICP-OES, antimicrobial activity

VELCER, T. *Fyzikální hydrogely na bázi biopolymerů a tenzidů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021. 126 s. (přílohy 38 s.). Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tato práce byla podpořena projektem z ***Centra materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně*** *– udržitelnost a rozvoj, r.č.* ***LO1211****, za finanční podpory Národního programu udržitelnosti I (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy) a projektem č.* ***16-12477S****, podpořeným Grantovou agenturou České republiky.*

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé dizertační práce, prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., za jeho odborné vedení, cenné rady a především čas, který mi věnoval při konzultacích.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za rozsáhlou spolupráci a užitečné rady při diskutování výsledků metody reologie.

Neméně důležité poděkování patří také Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za spolupráci při realizaci analytické metody ATR-FTIR, dále Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D. za pomoc při analytickém stanovení iontů a Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za realizaci a vyhodnocení antimikrobiálních testů.

Speciální poděkování patří mé rodině a přátelům za podporu nejen při studiu.

OBSAH

1 **ÚVOD** ... 10

2 **TEORETICKÁ ČÁST** ... 11

2.1 Hyaluronan ... 11

2.1.1 Struktura ... 11

2.1.2 Síťování ... 13

2.1.3 Syntéza ... 14

2.1.4 Metabolismus ... 14

2.1.5 Výskyt a význam v organismu ... 15

2.1.6 Využití ... 15

2.2 Asociativní koloidy ... 16

2.2.1 Tvorba micel ... 18

2.2.2 Velikost a tvar micel ... 19

2.2.3 Solubilizace ... 21

2.2.4 Inerakce polymer-tenzid ... 22

2.2.5 Interakce hyaluronanu s kationtovými tenzidy ... 23

2.2.6 Karbethopendeciniumbromid ... 24

2.3 Gely ... 24

2.3.1 Vznik ... 24

2.3.2 Vlastnosti ... 25

2.3.3 Hydrogely ... 26

2.3.4 Využití ... 27

2.4 Reologie ... 27

2.4.1 Hookův zákon ... 28

2.4.2 Newtonův zákon ... 28

2.4.3 Viskoelasticita ... 31

2.4.4 Měřicí systémy a metody charakterizace viskoelastických látek ... 32

3 **SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY** ... 36

3.1 Hyaluronan v cílené distribuci ... 36

3.2 Interakce hyaluronan-tenzid ... 37

3.3 Hyaluronové hydrogely v medicínských aplikacích ... 39

4 **CÍLE PRÁCE** ... 42

5 **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST** ... 43

5.1 Materiály ... 43

5.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků hydrogelů ... 43

5.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl ... 43
5.2.2 Příprava zásobních roztoků pufrů ... 44
5.2.3 Příprava zásobních roztoků rozdílného iontového složení ... 44
5.2.4 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu ... 44
5.2.5 Příprava zásobního roztoku Septonexu ... 44
5.2.6 Příprava vzorků hydrogelů ... 44
5.2.7 Příprava zásobního roztoku kyseliny pikrové ... 46
5.3 Metody měření a standardní vyhodnocení dat ... 46
5.3.1 Reologie – oscilační testy ... 46
5.3.2 Reologie – tokové testy ... 47
5.3.3 Infračervená spektroskopie ... 47
5.3.4 Modifikovaná Mahrousova metoda ... 48
5.3.5 Stanovení anorganických iontů ... 49
5.3.6 Antimikrobiální testy ... 51
6 **VÝSLEDKY A DISKUZE** ... 53
6.1 Reologická část ... 53
6.1.1 Vliv metody přípravy ... 53
6.1.2 Vliv složení gelů ... 58
6.1.3 Vliv iontové síly prostředí ... 66
6.1.4 Vliv teploty ... 70
6.1.5 Vliv pH prostředí ... 73
6.1.6 Vliv přidaných vícemocných iontů ... 79
6.2 Analytická část ... 85
6.2.1 Infračervená spektroskopie ... 85
6.2.2 Modifikovaná Mahrousova metoda ... 90
6.2.3 Stanovení anorganických iontů ... 93
6.3 Antimikrobiální testy ... 100
7 **ZÁVĚR** ... 106
8 **POUŽITÁ LITERATURA** ... 110
9 **SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ** ... 120
9.1 Seznam zkratek ... 120
9.2 Seznam symbolů ... 120
10 **ŽIVOTOPIS** ... 122
11 **VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST** ... 124
11.1 Impaktované publikace ... 124

11.2 Konferenční příspěvky 124
11.2.1 Abstrakty a postery na mezinárodních konferencích 124
11.2.2 Příspěvky ve sborníku 125
11.2.3 Přednášky 125
11.3 Účast na projektech 125
11.4 Vedení studentských prací a projektů 126
11.5 Absolvované kurzy a stáže 126
12 **PŘÍLOHY** 127

1 ÚVOD

Pro spoustu vědeckých týmů po celém světě je již delší dobu interakce polymeru s tenzidem předmětem hlavního zájmu. Použitím vhodných typů látek, koncentrací a správnou volbou prostředí lze metodou fázové separace připravit fyzikální hydrogely. Díky svým unikátním viskoelastickým vlastnostem a schopnosti pojmout velké množství vody roste význam hydrogelů nejen v oblasti průmyslu či potravinářství, ale zejména v medicínských aplikacích. V kosmetologii či dermatologii jsou úspěšně využívány, díky své hydrofilní povaze, pro hydrataci a regeneraci pokožky či k vyhlazování vrásek. Použití nacházejí i jako nosiče neboli *scaffoldy* pro tkáňové inženýrství, v oftalmologii nebo k výrobě nových typů obvazů pro tzv. mokré hojení.

Největší snaha je však použití hydrogelů v oblasti cílené distribuce léčiv, jejíž myšlenkou je uzavření, většinou nepolárního, léčiva do určitého typu nosiče, který je schopný toto léčivo dopravit až do postižené tkáně, čímž zamezí působení cytostatických účinků léčiva na zdravou tkáň. Nosič by měl také zaručit prodlouženou cirkulaci léčiva v oběhu a použití nižší účinné koncentrace. Cílená distribuce léčiv nachází uplatnění u řady nemocí, nejvíc se s ní však počítá pro použití v oblasti nádorových onemocnění. Je zkoumána řada látek použitelných jako nosiče založených na liposomech, dendrimerech, polymerních micelách nebo právě hydrogelech. Ty, kvůli jejich specifické struktuře, uvolňují léčiva pozvolněji a pomaleji. Jejich porozita také umožňuje prostupu kyslíku a živin. Tím však nároky na nosič nekončí. Látky musí být biokompatibilní a biodegradabilní, netoxické a o vhodných fyzikálních a chemických vlastnostech. Jako jeden z vhodných uchazečů na post nosiče se jeví aniontový polysacharid hyaluronan.

Jedná se o hydrofilní, tělu vlastní látku, schopnou silně vázat vodu. Nachází se např. v očním sklivci nebo v synoviální tekutině, kde, díky svým viskoelastickým vlastnostem, plní nezaměnitelnou funkci. V závislosti na své molekulové hmotnosti plní řadu odlišných funkcí, kdy funguje jako přirozené mazadlo všech kloubů či ovlivňuje mobilitu buněk. Po svém objevení byl hyaluronan postupně uplatňován v celé řadě odvětví jako v oftalmologii, kosmetologii a posléze až v hojení ran. Zjistilo se však, že má unikátní citlivost na receptory CD44 a RHAMM, které jsou součástí mnoha typů nádorových onemocnění (mozku, prsu, tlustého střeva, ledvin, prostaty, aj.). Tohoto faktu je možno využít právě pro cílenou distribuci léčiv. Nicméně nemodifikovaný hyaluronan je jen těžko schopen rozpustit nepolární látky. Proto je třeba použít chemických modifikací, kterých je několik typů. Může se jednat o ligandy navázané na esterovou nebo karbamovou vazbu. Jedna z možností je také využití již zmíněné elektrostatické interakce s kationtovými látkami, nejčastěji tenzidy, k vytvoření fázově separovaného hydrogelu. Použitím tenzidů lze navíc získat hydrogel vykazující antimikrobiální aktivitu.

Jedním z takových je i kationtový karbethopendeciniumbromid, který se v České republice vyrábí pod názvem Septonex či Otipur. Pro své dezinfekční a antiseptické vlastnosti je základem očních kapek Ophtalmo-Septonex.

Tato práce se zabývá experimenty, jejichž cílem je charakterizovat přípravu a vlastnosti gelů vzniklých na bázi hyaluronanu a kationtového tenzidu karbethopendeciniumbromidu, a to hlavně z reologického pohledu. Stanovení viskoelastických a tokových vlastností, a zejména jejich srovnání za laboratorních podmínek a v prostředí o pH a teplotě lidského těla, je klíčové pro zvažování těchto typů hydrogelů pro medicínské aplikace. Doplňkovým experimentům, realizovaným na jiných pracovištích Fakulty chemické VUT v Brně, zejména antimikrobiálním a analytickým testům, je pak věnována nezanedbatelná část práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan

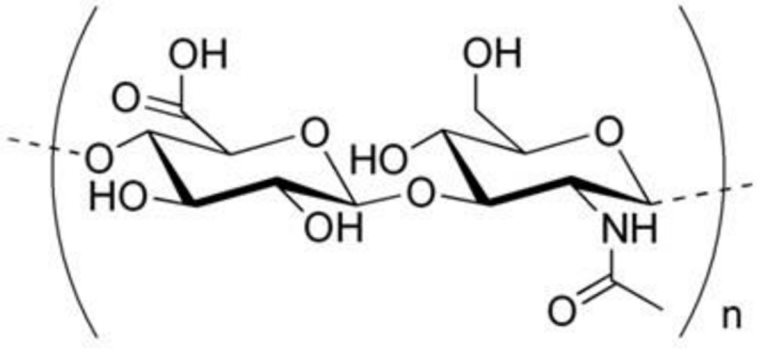
Hyaluronan patří do skupiny mukopolysacharidů, neboli glykosaminoglykanů (GAG), které se přirozeně vyskytují ve všech živých organismech. Je považován za nejjednodušší z GAG, jelikož narozdíl od ostatních zástupců této třídy polysacharidů neobsahuje sulfátovou skupinu.

Hyaluronan byl objeven v roce 1934 na univerzitě v New Yorku, a to Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem, kteří ho izolovali z hovězího sklivce. Podařilo se jim také částečně určit strukturu, která však byla plně objasněna až za dalších 20 let. Novou neznámou látku nazvali kyselina hyaluronová, jež odvodili ze slov *hyaloid*, což řecky znamená „skelný“, a *uronové kyseliny*, jakožto jedné z předpokládaných stavebních jednotek. Následně se podařilo hyaluronan izolovat také z očního sklivce prasat, roztoků hovězí krve, bakterií streptokoků nebo kohoutích hřebínků. Posledních dvou zmíněných se užívá pro syntézu dodnes, přičemž právě izolací z kohoutích hřebínků je možné získat nejvyšší molekulovou hmotnost hyaluronanu, a to 3,5–4 MDa.

V organismu se kyselina hyaluronová vyskytuje ve formě disociovaného polyaniontu jako sodná nebo draselná sůl a ne jako protonovaná kyselina. Proto byl v roce 1986 přijat dodnes používaný název hyaluronan [1, 2, 3].

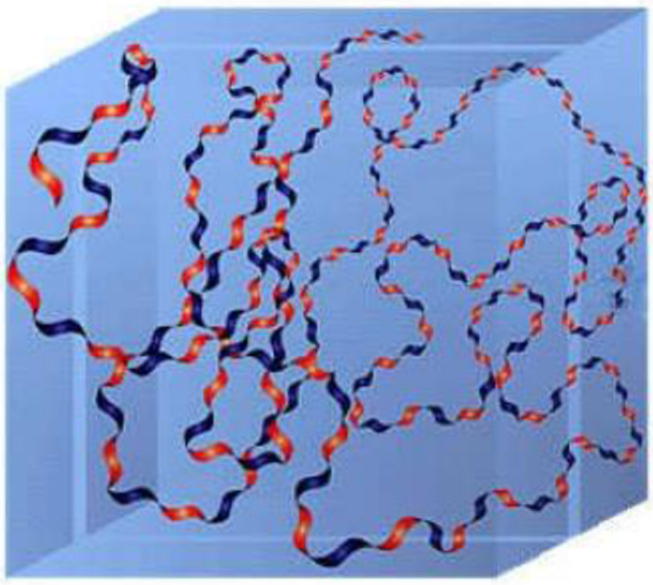
2.1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová je lineární nerozvětvený polysacharid s pravidelně se opakující disacharidovou jednotkou. Strukturně se jedná o D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin, které jsou spojeny β-1,3 glykosidickými vazbami. Samotné disacharidové jednotky navzájem pojí β-1,4 glykosidické vazby. Tyto vazby jsou navíc stabilizovány vodíkovými můstky [2].



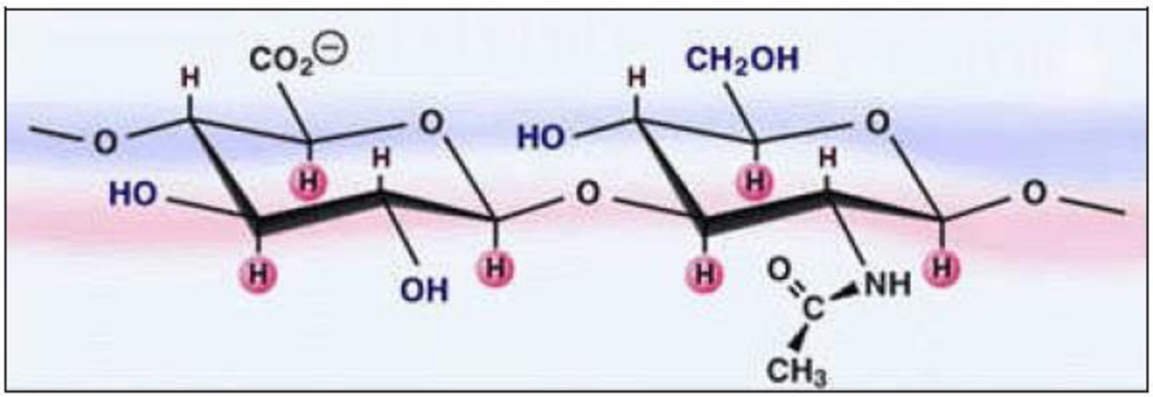
Obr. 1: Struktura kyseliny hyaluronové [1]

Struktura disacharidové jednotky je, díky svému výhodnému sterickému uspořádání, energeticky velmi stabilní. Z každého kyslíkového atomu obsaženého v daných glykosidických vazbách vychází dvě vazby připomínající svým sevřením tvar písmene „V“. Každá sacharidová jednotka nacházející se na konci této vazby může rotovat o 360°. Ze sterických důvodů však není tato rotace, s tak enormním množstvím možností, náhodná, ale každá disacharidová jednotka je pootočená o 180° vůči předchozí a následující. Dvě pootočení nám tak dávají původní konformaci. Toto uspořádání se nazývá *„two-fold helix“* neboli dvakrát stočená šroubovice [4]. Ve fyziologickém roztoku tvoří hyaluronan strukturu náhodně stočené stuhy tzv. *„random coil“*, jež je znázorněna na **obr. 2**.



Obr. 2: Struktura hyaluronanu v roztoku [4]

Glukóza v β-konfiguraci umožňuje objemnějším částem molekuly (část karboxylátu, hydroxyly, anomerní uhlík) přecházet do ekvatoriální polohy, kde tvoří polární část molekuly. Malé vodíkové atomy tvoří stericky méně příznivou axiální rovinu, která představuje nepolární oblast nazvanou jako *„hydrophobic patch"* [4]. Tyto hydrofobní oblasti se pravidelně střídají a umožňují agregaci s dalším antiparalelním řetězcem hyaluronanu, což má za následek rovnoměrný růst agregátů po obou stranách. Hydrophobic patches jsou poměrně objemné a obsahují asi 8 uhlíkových atomů. Díky nim lze hyaluronan považovat za amfifilní molekulu, která má sice vlastnosti silně hydrofilního materiálu, ale současně obsahuje hydrofobní oblasti charakteristické pro lipidy.



Obr. 3: Disacharidová jednotka hyaluronanu se znázorněnou oblastí axiálních vodíků [4]

Kvůli množství –OH skupin je hyaluronan silně hygroskopická látka, schopná pojmout až tisícinásobek hmotnosti vody [5]. Díky tomu tvoří hyaluronan v roztoku velkou oblast – doménu. V ní se řetězce hyaluronanu nepravidelně překrývají, propustné jsou pouze pro menší molekuly jako voda a elektrolyty, větší makromolekuly difundují s různou pravděpodobností odpovídající pohybu a překryvu sítí hyaluronanu. Tyto vodné roztoky hyaluronanu jsou

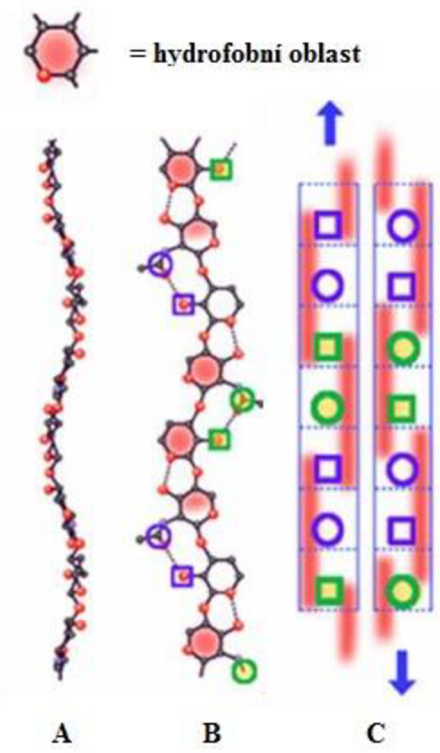
viskózní v závislosti na koncentraci a molekulové hmotnosti. Vysoká molekulová hmotnost má za příčinu tvorbu extrémně viskózních roztoků se specifickými reologickými vlastnostmi již při nízkých koncentracích.

V roztoku se hyaluronan chová jako polyanion, přičemž pH prostředí udává jeho chování [5, 6]. Dokončená molekula hyaluronanu může dosáhnout i více než 10 000 disacharidových jednotek. Molekulární hmotnost činí přibližně 4 miliony daltonů (přičemž disacharidová jednotka má molekulovou hmotnost přibližně 400 Da). Průměrná délka disacharidové jednotky dosahuje téměř 1 nm.

2.1.2 Síťování

Řetězce hyaluronanu mohou agregovat mezi sebou, a to díky přitažlivým silám jejich hydrofobních oblastí. Sekundární struktura má tvar ploché rovinné stuhy, jejíž konce jsou identické, avšak antiparalelní. Jedna strana stuhy běží v protisměru k druhé. To má za následek, že agregáty mohou růst v obou směrech – možnost stejných procesů na obou stranách.

Již při nízkých koncentracích dochází k tvorbě sítě, která se s rostoucí molekulovou hmotností stává pevnější a v podstatě nekonečnou. Každá molekula v síti je spojena s ostatními. Elektrostatické repulze mezi aniontovými skupinami hyaluronanu, které by mohly způsobit disociaci sítí, jsou převáženy hydrofobními interakcemi a také vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karbonylovou skupinou. Přesto jsou síly, které drží síť pohromadě poměrně slabé a v závislosti na okolních podmínkách, např. teplotě, dochází k neustálé disociaci a tvorbě těchto agregátů [4, 6].



Obr. 4: Síťová struktura hyaluronanu – A a B jsou zobrazení molekuly hyaluronanu s označenou hydrofobní oblastí řetězce, kruhy reprezentují acetamidovou skupinu a čtverce karboxylovou. Část C představuje schéma možné interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu. Molekuly jsou si navzájem antiparalelní. Sacharidová jednotka je ohraničena tečkovanou čarou. Zvýrazněné pásy značí hydrofobní místa, která přiléhají těsně k sobě [4]

2.1.3 Syntéza

V průběhu let od svého objevení byla kyselina hyaluronová izolována více či méně nákladnými technologiemi z různých zdrojů, jako je synoviální tekutina, oči tučňáků, pupeční šňůra, kůže, zejména žraločí, nebo kohoutí hřebínky. I přes vysoký obsah nečistot, jako jsou proteiny, bakteriální endotoxiny, nukleové kyseliny, chondroitin sulfát a další, a také fakt, že je tento proces velmi nákladný, byl pro prvotní aplikace hyaluronan izolován z lidské pupeční šňůry, následován izolací z kohoutích hřebínků, z nichž se dosahovalo hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti a čistotě [4]. Celý proces sestává z drcení a homogenizace tkáně, odstranění krve a sušení. Vysušené tkáně se nechají bobtnat a poté se přefiltrují, čím se odseparují proteiny, a dojde k uvolnění kyseliny hyaluronové.

Od roku 1980 se však využívá ekonomicky výhodnější fermentace bakterií kmene *Streptococcus* nebo *Pasteurella.* Jedná se o lidské, resp. zvířecí patogeny. Základem je fakt, že tyto bakterie si tvoří z hyaluronanu extracelulární kapsuly. Takto syntetizovaný hyaluronan je pro tělo obratlovce k nerozeznání od vlastního. To umožňuje bakteriím nepozorovaně napadnout hostitelský organismus a v něm bujet, aniž by byly ohroženy imunitním systémem daného organismu. Při genetické úpravě těchto bakterií na nepatogenní, lze takto získávat hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti, velmi vysoké čistotě a s mnohem větším výtěžkem než při extrakci z živočišných zdrojů. Po samotné fermentaci jsou bakterie odfiltrovány a kyselina hyaluronová se čistí ultrafiltrací. Získaný produkt se ještě několikrát přečistí srážením cetylpiridinium chloridem a ethanolem pro odstranění glykosaminoglykanů a živočišných proteinů, které jsou hlavní složkou nečistot. Krok přečištění se může opakovat dle potřeby, k dosažení požadované čistoty [7–10].

2.1.4 Metabolismus

Metabolismus hyaluronanu v organismech, včetně člověka, je velmi dynamický. Syntéza a degradace hyaluronanu se stále vyvažují pro udržení jeho koncentrace. Metabolická degradace se primárně uskutečňuje v játrech a v lymfatických uzlinách, kdy se jedná hlavně o intracelulární proces. Syntéza je většinou vyvážena rozkladem pro udržení konstantní koncentrace hyaluronanu v tkáních. Poločas rozpadu hyaluronanu v chrupavce, které ho aktivně syntetizují a katabolizují po celou dobu životnosti tkáně, je obvykle dva až tři týdny. V epidermis je poločas rozkladu méně než jeden den, v krvi je překvapivě krátký, jen několik málo minut. V některých případech, jmenovitě např. u keratinocytů, převládá syntéza nad rozkladem. Odhaduje se, že třetina celkového množství hyaluronanu v těle je metabolicky syntetizována a nahrazena během jednoho dne.

V organismu savců je kyselina hyaluronová syntetizována třemi různými enzymy, a to hyaluronansyntázami 1, 2 a 3 (HAS1, HAS2, HAS3). Jedná se o transmembránové proteiny, které jako jediné enzymy disponují více funkcemi. Každý z nich má jinou katalytickou aktivitu, potřebnou na přenos jednotek N-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny. HAS1 a HAS2 jsou nejméně aktivní a řídí syntézu vysokomolekulárního hyaluronanu. Naopak HAS3 je nejaktivnější, řídící syntézu velkého množství řetězců nízkomolekulárního hyaluronanu [11, 12].

Syntéza řetězce hyaluronanu obsahujícího velký počet disacharidových jednotek je pro buňky vysoce energeticky náročná, a proto je přísně regulována. Hyaluronan je nejjednodušší glykosaminoglykan lišící se od ostatních tím, že jako jediný není sulfonovaný a není kovalentně vázaný s proteiny. Samotný proces syntézy probíhá v plasmatické membráně buňky, čímž se také odlišuje od ostatních polymerů svého druhu, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu. Příslušný enzym v buněčné membráně střídavě váže k redukujícímu konci řetězce jednotlivé

monosacharidové jednotky a narůstající polymer je pak vytlačen do extracelulární matrice. Tam je schopen tvořit nadmolekulární komplexy s jinými látkami, např. proteiny. Ostatní glykosaminoglykany jsou naopak syntetizovány na neredukujícím konci jejich řetězců [4, 8].

Degradace pak probíhá díky třem typům enzymů: hyaluronidáza, β-D-glukuronidáza a β-N-acetyl-hexosaminidáza. Proces se skládá z oddělených kroků, kdy vznikají stále kratší řetězce s nižší molekulovou hmotností a odlišnou biologickou funkcí, přičemž hyaluronidáza štěpí vysokomolekulární hyaluronan na menší oligosacharidy a zbylé enzymy degradují vzniklé fragmenty. Produkty degradace jsou odpovědné za růst nových cév [2].

2.1.5 Výskyt a význam v organismu

Kyselina hyaluronová je přirozeně přítomná v tkáních všech obratlovců, jakožto součást extracelulární matrice, ve formě sodné a draselné soli. Lidské tělo obsahuje přibližně 15 g hyaluronanu, přičemž velký podíl této látky nalezneme v naší kůži. Slouží zde jako jakýsi organizátor tkáně a zajišťuje hydrataci, jelikož je schopen na sebe navázat až 1 000krát více vody než je jeho samotný objem. V některých tkáních tvoří hlavní komponentu, např. v očním sklivci, kde zajišťuje správnou optickou refrakci oka při zobrazování obrazu na sítnici. Ve formě velmi viskózních roztoků je důležitou součástí chrupavek. V synoviální tekutině snižuje tření a tlumí nárazy kloubů, v oocytech naopak ovlivňuje ovulaci. Vyskytuje se též v pupeční šňůře, plicích, ledvinách, mozku a svalech. Dále odhaluje aktivitu volných radikálů, podporuje buněčnou migraci, angiogenezi, hojení ran, a zejména produkci nové granulační tkáně během zánětu.

V extracelulární matrici tvoří hyaluronan supramolekulární proteoglykany a funguje jako signální molekula. Zejména migrace buněk je závislá na množství kyseliny hyaluronové, která aktivuje intracelulární signální kaskády prostřednictvím interakce s receptory hyaluronanu CD44 (povrchový glykoprotein – Cluster of Differentiation 44), ICAM-1 (Intra Cellular Adhesion Molecule 1) a RHAMM (Receptor for HA-Mediated Motility). Právě díky této unikátní citlivosti na buněčné receptory má hyaluronan velký vliv při karcinogenních procesech. Dnes je známo nejméně 14 typů karcinomů, u kterých byla zjištěna zvýšená koncentrace hyaluronanu, a to jak v buňkách samotných, tak i v mezibuněčném stromatu. Přitahování hyaluronanu nádorem je uskutečněno zejména pomocí receptorů CD44 a RHAMM. Hyaluronan funguje pro nádorové buňky jako výživa, ochrana před imunitním systémem, podobně jako u kapsulí mikroorganismů, nebo zprostředkovává buněčnou hybnost, a tím i tvorbu metastází. Je však snaha tohoto jevu využít záměrně při cílené distribuci léčiv, kdy by nádorem přitahovaný hyaluronan nesl do postižené oblasti i léčivo.

Biologická aktivita je závislá na molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové nebo jejích fragmentů. V organismu se hyaluronan vyskytuje v široké škále molekulových hmotností od desítek kDa až po jednotky MDa, přičemž jejich vlastnosti jsou velmi rozdílné. Vysokomolekulární hyaluronan má spíše lubrikační funkci a protizánětlivé vlastnosti, naproti tomu nízkomolekulární má funkci regulační a podporuje zánětlivé procesy v těle. Naopak také platí, že nízkomolekulární hyaluronan má protinádorové vlastnosti, kdežto vysokomolekulární hraje významnou roli při tvorbě metastází [7, 13, 14, 15].

2.1.6 Využití

V lékárenské a farmaceutické praxi má využití hyaluronanu obrovský potenciál. Jelikož se jedná o látku tělu vlastní, je jeho použití velmi šetrné. Není cytotoxický, teratogenní ani imunogenní. Naopak je dobře odbouratelný z organismu, přičemž i produkty jeho štěpení, tedy jednoduché cukry, jsou přirozeně biokompatibilní. V širokém měřítku se využívá jeho

viskoelastických a hydratačních vlastností na péči o pokožku a vyhlazování vrásek, jelikož s věkem obsah hyaluronanu v kůži klesá, a tím se ztrácí i její pružnost. Nejúčinnější je injekční aplikace přímo do kůže, ovšem naše tělo je schopné hyaluronan během šesti měsíců rozložit. Nechceme-li tedy, aby se nám vrásky vrátily, je třeba podat další injekci [16]. Tím, že váže vodu z okolí, a tím i živiny, se ve formě scaffoldů používá pro léčbu špatně hojitelných, zejména diabetických, ran a jizev. Tyto scaffoldy obvykle obsahují proteiny navázané na hyaluronan pro usnadnění migrace buněk.

První lékařská aplikace hyaluronanu však byla na konci 50. let minulého století v oftalmologii, kdy byl použit jako náhrada očního sklivce. Používá se také v očních kapkách pro zvlhčování oční sliznice nebo v roztocích pro péči o kontaktní čočky [15]. Zesíťovaný hyaluronan je používán jako doplněk kloubního mazu v přípravcích pro péči o chrupavky. Jedná se o injekční aplikaci, kdy hyaluronan zvyšuje viskozitu kloubní tekutiny, čímž zlepší promazání kloubu, zvýší odpružení a ve výsledku působí analgeticky [17, 18]. Bylo také zjištěno, že hyaluronan uvolňuje proteoglykany z extracelulární matrice do tkáně chrupavky, a tím potlačuje její další degradaci.

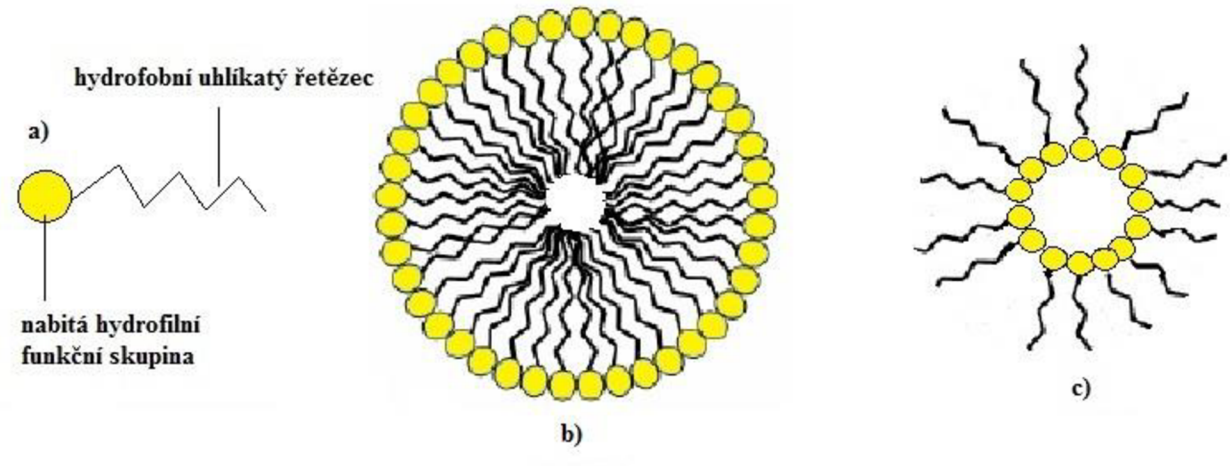
Jelikož je hyaluronan velmi dobře rozpustný a odbouratelný z organismu, nachází jeho použití v tkáňovém či bioinženýrství určitá omezení. Je nutno zavést derivatizace hyaluronanu ovlivňující jeho rozpustnost. Lze připravit deriváty s alkylovými zbytky navázané esterovou vazbou přes primární nebo sekundární –OH skupinu. Délkou navázaného řetězce lze také redukovat rozpustnost. Další možností je síťování hyaluronanu do formy hydrogelu. Hyaluronové hydrogely vykazují výborné výsledky v tkáňovém inženýrství chrupavek, kdy podporují diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a umožňují tak lepší tvorbu chrupavky [19, 20].

Výzkum nyní směřuje k používání hyaluronanu jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv. Tomu nahrává i fakt, že má vysokou afinitu k receptorům CD44, které jsou ve velké míře exprimovány nádorovou tkání. Současná chemoterapie je založena na vpravování cytostatik, tedy látek, které zabraňují buněčnému dělení, do těla. Zde však ovlivňují i zdravé buňky. Potenciální nosič by však léčivo nějakým způsobem uzavřel do sebe a bezpečně ho dopravil až do místa působení, kde by mohlo být na určitý podnět uvolněno a nepoškodila by se tak okolní zdravá tkáň. Hyaluronové nosiče mohou být připraveny z hydrofobně modifikovaného hyaluronanu, který tvoří micelám podobné útvary a je schopen nepolární léčivo solubilizovat ve svém jádře. Také nativní hyaluronan může být použit jako obalový materiál pro micely jiné látky, např. tenzidu, která pojme léčivo. Hyaluronan zde slouží pouze jako molekula schopná zacílit nádorovou tkáň díky již zmíněné interakci s nádorovými receptory [21].

2.2 Asociativní koloidy

Některé nízkomolekulární látky poskytují ve vhodném rozpouštědle a velkém zředění pravé roztoky, ale od určité koncentrace asociují do vzniku agregátů koloidních rozměrů. Tyto agregáty se nazývají **micely** a látky, které se chovají tímto způsobem, se nazývají **asociativní** nebo **micelární koloidy**. Z anglického *„surface active agent“* se zažil pojem **surfaktant** neboli **povrchově aktivní látka** (PAL), z němčiny naopak přišlo označení **tenzid**. Termín povrchově aktivní látka naznačuje, že se tyto již při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní a snižují mezifázovou energii (povrchové napětí). Popsaný jev je podmíněn jejich zvláštní strukturou. Tenzidy vykazují amfipatickou neboli amfifilní strukturu, kdy jejich molekuly obsahují skupinu, která má velkou afinitu k rozpouštědlu a nazývá se lyofilní (ve vodě hydrofilní) a skupiny, které jsou v daném prostředí prakticky nerozpustné a nazývají se lyofobní (ve vodě hydrofobní), přičemž hydrofilní skupina je většinou silně polární, např. –COOH nebo

$-SO_3H$, naopak hydrofobní skupiny představují nepolární dlouhé uhlovodíkové řetězce. Ty mohou být i rozvětvené, příp. mohou obsahovat i aromatická jádra. Ve většině případů se však jedná o lineární řetězec o délce 8–18 atomů uhlíku. Struktura tohoto typu se nazývá amfipatická nebo amfifilní. V nepolárním prostředí jsou hydrofilní části molekuly uschovány v jádře micely a hydrofobní skupiny tvoří vnější obal, vzniká tzv. inverzní micela. Tvorba těchto inverzních micel je obecně méně výhodná, protože může docházet k nežádoucím elektrostatickým interakcím mezi hydrofilními částmi molekul. V polárním prostředí je tomu naopak.



Obr. 5: a) struktura molekuly tenzidu, b) micela, c) inverzní micela

Tenzidy se dělí podle schopnosti disociovat v roztoku na **iontové** a **neiontové.** Neiontové tenzidy nedisociují, protože nemají výrazně lokalizovaný náboj. Polární skupiny tudíž tvoří např. větší počet kyslíkových atomů v molekule. Iontové tenzidy se dále dělí na kationtové, aniontové a amfoterní (zwitteriontové). U *kationtových tenzidů* dochází při disociaci k tvorbě povrchově aktivních kationtů. Velmi časté jsou sloučeniny na bázi dusíku, např. soli mastných kyselin, kvartérní amoniové soli nebo pyridinové sloučeniny substituované na atomech dusíku. *Aniontové tenzidy* disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Nejvýznamnějšími představiteli této skupiny jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin nebo soli alkylsulfonových kyselin. Současná přítomnost aniontových a kationtových PAL ve vodném roztoku obvykle není možná, neboť tyto vytváří velmi slabě disociující, prakticky nerozpustnou sůl. Aniontové tenzidy jsou častěji využívány než kationtové, kvůli jejich snadné a levné výrobě. *Amfoterní tenzidy* obsahují bazickou i kyselou funkční skupinu a vykazují aniontovou i kationtovou disociaci. Jejich náboj závisí na pH prostředí. Mezi amfoterní tenzidy patří jak syntetické produkty (betainy, sulfobetainy), tak přírodní látky (aminokyseliny, fosfolipidy) [22, 23, 24].

Obecně nalézají aniontové a kationtové tenzidy uplatnění v mnoha oborech, především v kosmetickém průmyslu jako součást baktericidních a antistatických přípravků, dále jako detergenty, což jsou tenzidy nebo směsi tenzidů s přídavnými látkami, které jsou určené přímo k mytí a čištění, v potravinářském průmyslu jako stabilizátory, v ropném průmyslu a zemědělství. Díky amfifilní struktuře nacházejí tyto látky také využití ve farmaceutickém průmyslu jako potenciální nosiče pro cílenou distribuci léčiv. Zejména se jedná o polymerní micely, liposomy, nano- a mikročástice či hydrogely.

Právě polymerní micely se od klasických micel tvořených nízkomolekulárními tenzidy liší především svou velikostí a zvýšenou stabilitou v krevním řečišti, proto jsou pro toto použití vhodnější. Micela může sloužit jako nosič špatně rozpustných léčiv, které solubilizuje ve svém nepolárním jádře. Povrch micely naopak léčivo chrání před kontaktem s vnějším prostředím. Povrchově aktivní chování látek pro cílenou distribuci léčiv může zlepšit řadu vlastností, jako je biokompatibilita nebo distribuce v organismu [25, 26, 27].

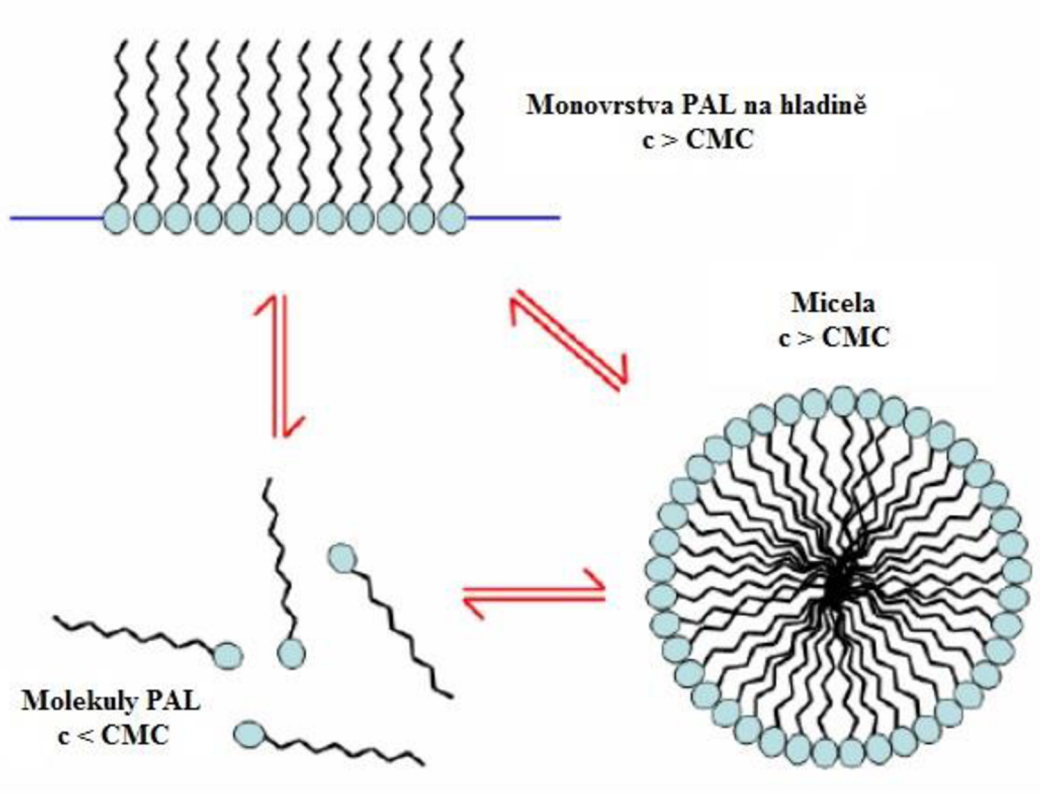
2.2.1 Tvorba micel

Amfifilní povaha molekul tenzidů má za následek jejich snahu minimalizovat styk jejich nepolárních částí s polárním prostředím a naopak polárních částí, nacházejí-li se v nepolárním prostředí. Ve velkých zředěních se PAL chovají jako pravé roztoky. Při vzrůstající koncentraci se nacházejí jako volné molekuly i v roztoku, ale ve velké míře se začnou hromadit na mezifázovém rozhraní, kde snižují povrchové napětí. Ve vodném prostředí se polární hlavy orientují dovnitř roztoku, zatímco hydrofobní alkylové řetězce vně. Při úplném nasycení povrchu kapaliny dochází k dosažení tzv. **kritické micelární koncentrace** (z anglického *„critical micelle concentration“* – **CMC**). Je to nejvyšší možná koncentrace, při které se PAL vyskytují v roztoku v molekulové formě. Po překročení této koncentrace začnou tenzidy asociovat do agregátů zvaných micely. Proces micelizace je znázorněn na **obr. 6**. Hnací silou agregace jsou hydrofobní interakce, které jsou spojeny s poměrně značným nárůstem entropie, který je zapříčiněn desolvatací hydrofobních alkylových řetězců. Změna entalpie se liší v závislosti na povaze tenzidů. U iontových typů tenzidů je proces agregace exotermní, v případě neiontových se jedná o proces endotermní.

Jádro micely tvoří propletené uhlovodíkové řetězce PAL, které se stále snaží minimalizovat styk s vnějším prostředím, a proto se orientují k sobě. Vnější povrch micely tvoří polární hlavy tenzidů. Pokud se jedná o iontové tenzidy, polární hlavy disociují a vznikají nabité micely obklopené dvojvrstvou tvořenou disociací vzniklými protiionty. V nevodném prostředí vznikají inverzní micely s nepolárními skupinami orientovanými na povrch micely a polárními hlavami tvořícími jádro micely.

Pro vznik micel je kromě dosažení potřebné koncentrace nutná také specifická teplota, která se nazývá **Krafftova teplota** a je pro každý tenzid unikátní. Při jejím dosažení se rozpustnost PAL rovná hodnotě CMC, v hodnotách nižších než Krafftova teplota se micely netvoří, naopak při vyšších teplotách rozpustnost PAL silně stoupá, právě díky tvorbě micel.

Hodnota CMC je ovlivněna jak strukturou tenzidu, tak i rozpouštědlem a látkami v něm rozpuštěnými. S rostoucí délkou řetězce tenzidu hodnota CMC klesá, v případech rozvětvených řetězců a přítomností nenasycených vazeb hodnota CMC roste. Při stejné délce řetězce je hodnota CMC nižší u neiontových tenzidů oproti iontovým. V případě obsahu jednoduchých anorganických elektrolytů v roztoku klesá hodnota CMC u iontových tenzidů z důvodu stínění nábojové repulze mezi nabitými hlavami tenzidu. Při přidání vhodné látky, např. polymerů, do roztoku PAL, může také dojít k agregaci i při nižší koncentraci než je CMC. Elektrostatickými a hydrofobními interakcemi interaguje tenzid s molekulami polymeru a dochází k vytvoření tzv. *„minimicel“* tenzidu na povrchu polymeru. Koncentrace, při níž se takto děje, se nazývá **kritická agregační koncentrace** (z anglického *„critical aggregation concentration“* – **CAC**). Tvorbu micel lze naopak i úplně potlačit přidáním silně polární látky např. močoviny [28–31].



Obr. 6: Existence jednotlivých fází povrchově aktivních látek v roztoku v závislosti na koncentraci – proces micelizace [32]

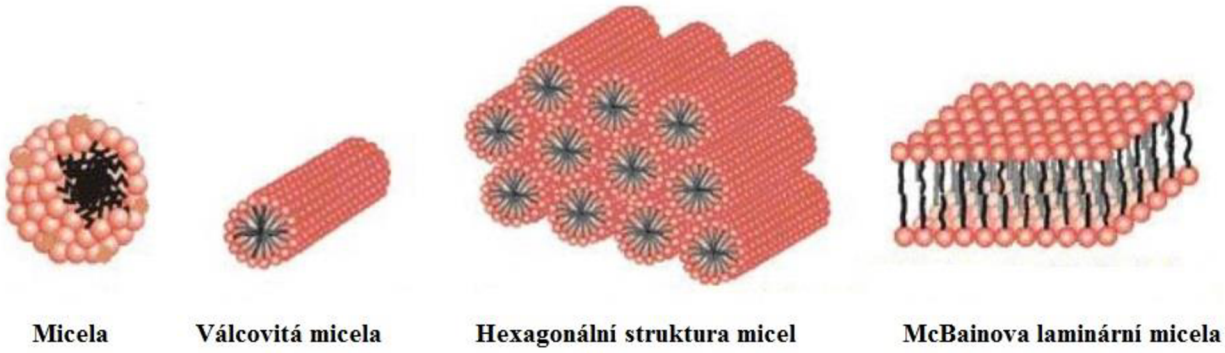
Koloidní roztoky se vyznačují typickým průběhem závislostí různých fyzikálně-chemických veličin na koncentraci, kdy při hodnotě CMC obvykle nastává prudký zlom a změna vlastností. Například povrchové napětí prudce klesá se zvyšující se koncentrací tenzidu, po dosažení CMC se však jeho hodnota již téměř nemění. Také hodnoty molární vodivosti, hustoty, viskozity či turbidity vykazují zlomy koncentračních závislostí při dosažení hodnoty CMC. Tato skutečnost nám umožňuje stanovovat CMC různými technikami, dnes je pro svou rychlost a jednoduchost velice populární metoda fluorescenční sondy [33, 34].

S procesem tvorby micel souvisí i pojem **agregační číslo**. Jeho hodnota udává počet molekul tenzidu, které tvoří jednu micelu. Tento parametr závisí na několika faktorech, přičemž roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Daná plocha souvisí nejen s velikostí polární hlavy tenzidu, ale také s odpudivými silami mezi těmito polárními skupinami [31, 32].

2.2.2 Velikost a tvar micel

Velikost a tvar micel se liší v závislosti na koncentraci tenzidu a teplotě, pH a iontové síle roztoku. Ve zředěných vodných roztocích v koncentraci mírně nad CMC se vyskytují sférické Hartleyovy micely, které mají tvar nepravidelné koule. Poloměr takového kulového agregátu se přibližně rovná délce molekuly tenzidu, hodnota agregačního čísla se pohybuje v rozmezí 50 až 150. S rostoucí koncentrací tenzidu se zvětšují jeho rozměry a jsou přítomny i micely jiného tvaru. Uhlovodíkové řetězce se začínají orientovat stále více rovnoběžně, čímž vznikají válcovité agregáty, hexagonální kapalné krystaly či útvary podobné dvojvrstvě lipidů

v buněčných membránách. Tyto dvojvrstvé micely se nazývají McBainovy a jsou složené ze dvou vrstev tenzidů, které jsou k sobě orientovány uhlovodíkovými řetězci, zatímco polární skupiny směřují směrem ven. Díky laminárnímu uspořádání micel může docházet k přechodu roztoku v gel [23, 25, 35].



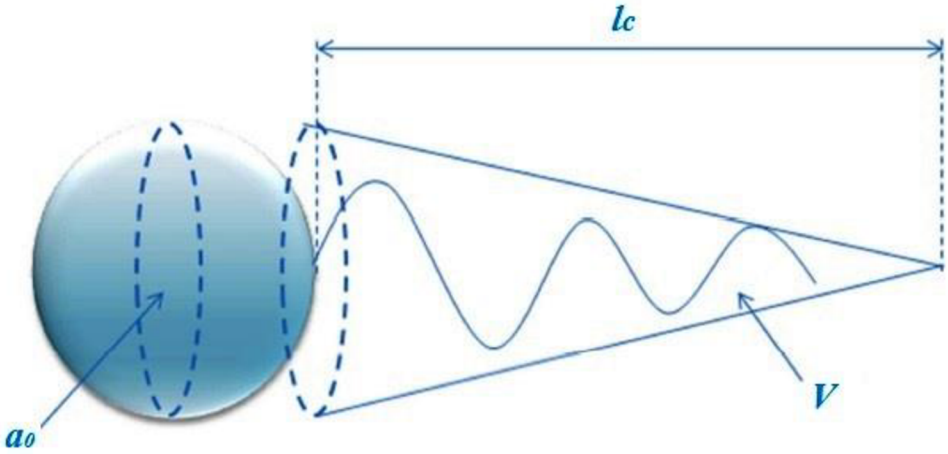
Obr. 7: Změna tvaru micely v závislosti na koncentraci roztoku [23]

Typ vznikajícího agregátu závisí také na poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly tenzidu. Tento vztah definuje bezrozměrná veličina **kritický parametr uspořádání** („*Critical Packing Parameter*" – *CPP*).

$$p = \frac{V}{a_0 \cdot l_c}, \tag{1}$$

kde V je molekulární objem hydrofobní části molekuly, a_0 je účinný průřez polární hlavou skupiny a l_c efektivní délka uhlovodíkového řetězce.

Pro hodnoty $p << 1$ je tvar micel sférický až cylindrický, pro $p \approx 1$ odpovídá tvar válcovitým či dvojvrstevným micelám. Pokud je p větší než 1, tvoří se inverzní micely. Je třeba také podotknout, že klasické sférické a inverzní micely jsou systémy velmi dynamické s dobou existence řádově ve zlomcích sekund, zatímco laminární dvojvrstvy jsou vysoce uspořádané a stabilní systémy schopné fungovat i několik týdnů [36, 37, 38].

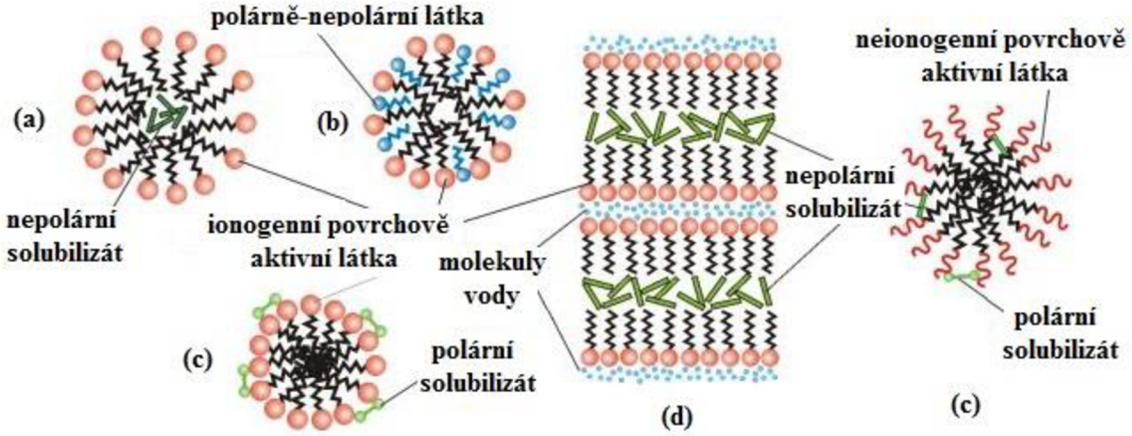


Obr. 8: Schéma molekuly tenzidu s veličinami popisující CPP [36]

2.2.3 Solubilizace

Micelární koloidy mají, díky své amfifilní struktuře, významnou vlastnost, a tou je solubilizace. Jedná se o schopnost rozpustit látky v daném rozpouštědle nerozpustné. Solubilizace je možná až po vzniku agregátů tenzidů, přičemž mechanismus může být různý. Nejčastěji se jedná o rozpouštění nepolárních látek ve vodném prostředí, které se inkorporují do jádra micely. Polárně-nepolární látky se v micele orientují podobným směrem jako samotné molekuly tenzidu. Jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel, zatímco polární skupiny ven z micely. Polární látky se solubilizují na povrchu micely. V laminárních micelách způsobují rozpouštěné látky oddalování molekulových řetězců tenzidu, protože se rozmisťují mezi uhlovodíkové konce molekul.

Solubilizace způsobuje nárůst hmotnosti micely nejen v důsledku přidaných molekul rozpuštěné látky do jádra micely, ale také proto, že se procesem solubilizace zvětší objem hydrofobního jádra, které tudíž musí tvořit více molekul tenzidu [23, 29, 31].



Obr. 9: Solubilizace (a), (b), (c) malými micelami, (d) laminárními micelami [23]

Solubilizační kapacita je definována jako počet molů rozpuštěné látky na 1 mol tenzidu a pro konkrétní povrchově aktivní látky zůstává obvykle stejná v širokém koncentračním rozmezí nad CMC. Faktory ovlivňující solubilizaci jsou vesměs totožné s těmi, které ovlivňují micelizaci. Jedná se zejména o přídavek elektrolytu, pH roztoku, teplotu nebo tlak. Solubilizace také závisí na tvaru micely a podílu z jejího povrchu, na kterém proces probíhá. Ve většině případů je solubilizační kapacita větší pro polární solubilizáty [39, 40].

Na principu solubilizace fungují kosmetické i prací prostředky, kdy jsou mastné nečistoty uzavřeny uvnitř micel detergentů a smyty z povrchu čištěného materiálu. Pro vědecký výzkum je praktické solubilizovat do micel fluorescenční sondy, umožňující zkoumat dané systémy pomocí fluorescenční spektroskopie. Velký potenciál má však použití povrchově aktivních látek jako nosičů nepolárních léčiv pro nádorovou terapii. Léčivo může být v micele vázáno buď hydrofobně (tj. rozpuštěno v jádře micely), nebo přímo chemicky navázáno na polymerní nosič biodegradovatelnou vazbou. Prvně jmenovaný postup je výrazně jednodušší a univerzálnější, je u něj však podstatně obtížnější řídit rychlost uvolňování přípravku z polymerní micely. Na druhé straně chemická vazba umožňuje řídit rychlost uvolňování léčiva a spustit jej až v nádorové tkáni, aby nedocházelo k uvolňování během cirkulace v krevním řečišti. Jedním z mechanismů, který toto do značné míry splňuje, je použití hydrazonové vazby,

která je hydrolyticky labilní v mírně kyselém prostředí (nádorová tkáň je kvůli hypoxii výrazně kyselejší než krevní plazma), zatímco v neutrálním prostředí krevního řečiště je výrazně stabilnější.

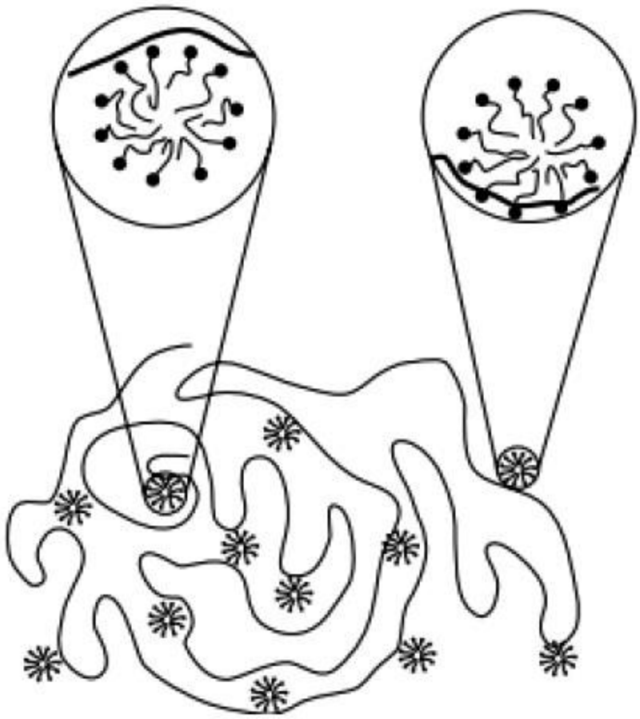
Nosiče s inkorporovaným léčivem je možné připravit několika způsoby, nejčastěji společným odpařováním vodného roztoku polymeru, který je schopen tvořit micely, a látky v organickém rozpouštědle, která má být solubilizována v hydrofobním jádru. Po odpaření do podoby filmu se tento rehydratuje. Micely se vytvoří samovolně. Další způsob je použití ultrazvuku, vysokotlakého homogenizátoru apod. [41, 42].

2.2.4 Inerakce polymer-tenzid

Interakce polymerů s tenzidy mohou být více druhů a různě silné v závislosti na povaze látek. Vazba mezi neiontovým tenzidem a nenabitým polymerem je slabá nebo žádná, v případě interakce iontových tenzidů s neiontovým polymerem reagují ochotněji aniontové tenzidy [43]. U polymerů obsahujících hydrofobní část molekul budou převládat hydrofobní interakce s molekulami tenzidů. Nabitý polymer, tzv. polyelektrolyt, v roztoku disociuje a jeho disociované funkční skupiny jsou obklopeny ekvivalentním množstvím protiiontů. S opačně nabitými tenzidy zde budou převládat elektrostatické interakce, na které má vliv především chemické složení, lineární hustota a pozice náboje a dynamika kostry polymeru [25].

Proces navázání molekul tenzidu na řetězce polymeru nastává již při velmi nízké koncentraci, která se nazývá **kritická agregační koncentrace (CAC)** a je často i o několik řádů nižší než CMC tenzidu. Pokud by byla hodnota CAC vyšší než CMC, situace by naznačovala, že molekuly tenzidu preferují vlastní micelizaci nežli vznik komplexů s polymery. Navázané molekuly tenzidu tvoří na řetězci polymeru micelám podobné klastry nazývané *„minimicely“*. Celá tato charakteristická struktura se nazývá **struktura perlového náhrdelníku**, tzv. *„pearl necklace“* (**obr. 10**), kde micely svým kulovým tvarem připomínají perly a řetězec polymeru je spojuje [25, 44].

Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu dochází v roztoku i k tvorbě volných micel a složitějších agregátů, po přesáhnutí určitého bodu navázání tenzidu na polymer přestanou být jejich komplexy dále rozpustné a dochází k fázové separaci za vzniku gelů. Tyto gely, vzniklé interakcí polyelektrolytů a opačně nabitých tenzidů, jsou dnes předmětem velkého zájmu hlavně v potravinářství a farmacii. Dosahují vyšší stabilitu a povrchovou aktivitu, zároveň mohou micely v těchto komplexech sloužit jako nosiče pro nepolární látky, zejména cytostatika [45].



Obr. 10: Struktura perlového náhrdelníku – model interakce polymer-tenzid [25]

2.2.5 Interakce hyaluronanu s kationtovými tenzidy

V případě úvahy použití výše popsaných systémů v medicínských aplikacích není dostačující pouze úspěšná interakce. Micely tenzidu sice mohou zapouzdřit, většinou nepolární, léčiva ve svém jádru, nicméně některé tenzidy jsou dráždivé a pro kosmetický či farmaceutický průmysl zcela zakázané. Totéž platí pro hledání vhodného kandidáta na post polymeru. Látky musí být biokompatibilní a netoxické, stejně tak jejich degradační produkty. Jako vhodný kandidát se zde jeví hyaluronan, který se přirozeně nachází v těle všech obratlovců a tudíž splňuje výše zmíněné podmínky. Stále více výzkumů směřuje právě k prozkoumání interakcí mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy.

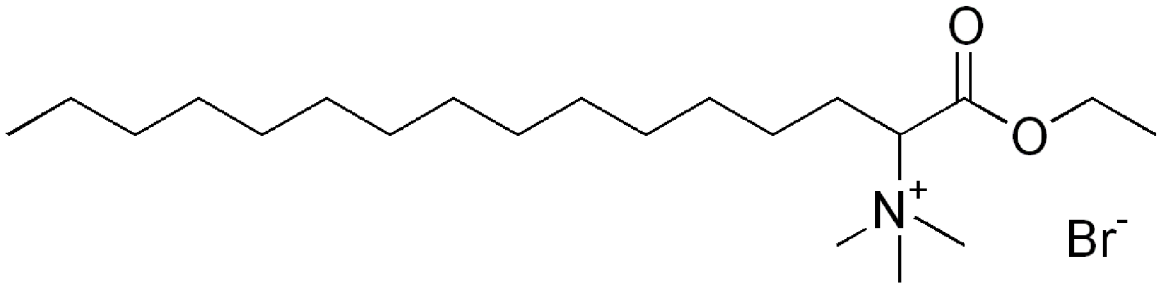
Hyluronan reaguje s tenzidovými kationty obdobně, jak bylo popsáno v předchozí kapitole. Při CAC se molekuly tenzidu začnou vázat na řetězce a tvořit zde minimicely. Fakt, že hyaluronan upřednostní tenzidový kation (např. Septonexový kation) je dán hydrofobicitou daného iontu, tvořeného dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, protože se kontaktem s hyluronanem redukuje jeho styk s vodou. Z elektrostatického hlediska se tento tenzidový iont chová stejně jako hyaluronový protiiont (např. Na^+). Díky těmto preferencím vzrůstá lokálně koncentrace tenzidů v okolí polyelektrolytu oproti celému roztoku, tím pádem může být lokálně překročena CMC a mohou tak vznikat micely i při celkové koncentraci tenzidu nižší než CMC. Nutno podotknout, že z důvodu nižší hustoty náboje na řetězci hyaluronanu jsou síly mezi ním a tenzidy slabší než např. při interakci s alginátem nebo pektátem. Při dosažení určité koncentrace hyaluronanu i tenzidu dochází k fázové separaci a tvorbě gelu. Fázové chování těchto systémů (hyaluronan-tenzid-voda) se klasicky popisuje ternárním diagramem.

Dvoufázová oblast, která vystupuje z rohu vody, má kapkovitý tvar a je silně nakloněna k rohu tenzidu. Vzorky nacházející se v této oblasti podléhají fázové separaci. Její příčinou je redukce náboje mezi hyaluronanem a tenzidem, čímž se sníží hydrofilicita i repulze v rámci polymeru. Při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu a různých tenzidů má kapkovitá dvoufázová oblast mírně odlišný tvar.

Vzniklé gely obsahují hydrofobní oblasti, jelikož koncentrace tenzidu v gelu přesahuje CMC. Samovolná difúze vody v gelech je omezená kvůli poměrně velkému množství již navázané hydratační vody. Gely je možné rozpustit přidáním velkého nadbytku tenzidu či zvýšením iontové síly roztoku. Přídavek nízkomolekulárního elektrolytu totiž odstiňuje elektrostatické interakce mezi nabitými skupinami hyaluronanu a polárními hlavami tenzidů, čímž se podporuje vznik volných micel. Koncentrace elektrolytu potřebná pro zabránění vzniku fázové separace se nazývá **kritická koncentrace elektrolytu (CEC)** a pro hyaluronan roste s jeho zvyšující se molekulovou hmotností. Pravděpodobně kvůli hydrofobním interakcím však nelze tyto interakce v případě hyaluronanu s tenzidy zcela potlačit [46, 47, 48, 49].

2.2.6 Karbethopendeciniumbromid

Karbethopendeciniumbromid patří mezi kationtové tenzidy, vyskytující se ve formě kvartérní amoniové soli s kladným nábojem na dusíku a funkčním vzorcem $C_{21}H_{44}BrNO_2$. Jedná se o bílou krystalickou látku s molekulovou hmotností 422,48 g/mol a bodem tání 153–156 °C. Vyznačuje se dobrou rozpustností ve vodě, ethanolu (96 %) a chloroformu. V rozmezí koncentrací 0,79–0,81 mM dochází k tvorbě sférických micel. Karbethopendeciniumbromid se používá ve farmaceutickém průmyslu jako účinná látka antiseptických a dezinfekčních přípravků pod komerčními názvy Septonex a Otipur [50, 51].



Obr. 11: Struktura karbethopendeciniumbromidu

2.3 Gely

Jako makromolekulární gely se označují koloidní disperzní soustavy, jejichž pevné částice disperzního podílu tvoří trojrozměrnou síť, která je prostoupená spojitou fází disperzního prostředí. V důsledku uspořádání částic právě do této trojrozměrné sítě mají gely charakter tuhé látky i přesto, že disperzní prostředí, které gel obsahuje, je kapalné.

Takové gely (s kapalným disperzním prostředím) se obecně nazývají *lyogely*. Dle charakteru disperzního prostředí dělíme gely na **hydrogely** (rozpouštědlem je voda) a **organogely** (rozpouštědlem je organická látka). Jestliže rozpouštědlo odstraníme, např. vysušením, vzniká tak *xerogel*. Jeho objem je zmenšený o objem odstraněného rozpouštědla. U gelů vzniklých z lyofilních koloidů je možnost opětovného vzniku lyogelu ze xerogelu, a to přidáním rozpouštědla. Takové gely se nazývají **reverzibilní**. Gely vzniklé z lyofobních koloidů tuto schopnost nemají a nazývají se **ireverzibilní**. Proces přechodu xerogelu v lyogel se nazývá **botnání** gelu, které může být **omezené** (do vzniku gelu) nebo **neomezené**, kdy xerogel přijímá nadbytek rozpouštědla až do vzniku koloidního roztoku [24, 52].

2.3.1 Vznik

Ke vzniku gelu je, v procesu zvaném gelace, nutno vytvoření dostatečného množství spojů mezi lineárními řetězci polymeru v roztoku. Tyto spoje se nazývají styčné body neboli *uzly*. Podle

povahy sil, které drží síť gelu v těchto uzlech pohromadě, můžeme dělit gely na **fyzikálně** nebo **chemicky síťované**. U fyzikálních gelů převládají v uzlových oblastech van der Waalsovy síly, bipolární síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce, příp. zde může dojít také k vzájemnému zauzlení řetězců. Chemické gely jsou zesíťovány pomocí kovalentních vazeb. Jedním ze způsobu vzniků gelů je také botnání, podrobněji popsané v následující kapitole [24, 53].

Proces gelace ovlivňuje zejména teplota, koncentrace, pH či mechanické působení. Zvyšující se teplota obvykle zabraňuje vzniku gelů z důvodu většího tepelného pohybu molekul a tudíž kratšího trvání vazeb mezi segmenty. Se vzrůstající koncentrací však roste počet srážek molekul, čímž se zvětšuje i počet vzniklých vazeb v objemu gelu. V případě amfoterních polyelektrolytů probíhá gelace nejlépe v hodnotě pH, která je rovna izoelektrickému bodu [23, 24, 53].

2.3.2 Vlastnosti

Gely se vyznačují svou charakteristickou elasticitou. V důsledku svého uspořádání se, i přes majoritní podíl kapalného disperzního prostředí, chovají jako látky v tuhém stavu a odolávají vystavené deformaci až do určité kritické hodnoty. Do té doby se deformují vratně. Hodnota kritického napětí závisí na počtu uzlů a jejich pevnosti. Reverzibilní gely s malým počtem vazeb jsou obvykle značně elastické, naopak se vzrůstajícím počtem uzlů se struktura stává rigidnější, čímž se snižuje možnost změny tvaru makromolekuly. Obecně lze říci, že se u fyzikálních gelů sdružují řetězce k sobě a tvoří tzv. *uzlové oblasti*, které jsou obvykle mnohem větší než kovalentní uzly u chemicky síťovaných gelů. Tyto uzlové oblasti se vyskytují v poměrně velké četnosti vzhledem k délce řetězce makromolekuly. Může jich být více typů, lišících se strukturou, životností a pevností. Na těchto parametrech pak závisí reologické chování gelů. Gely se silnými vazbami se blíží svými vlastnostmi kovalentním gelům, naopak slabé gely si zachovávají svou elasticitu jen při malých napětích. Některé fyzikální gely se slabými vazbami mohou také mechanickým účinkem, zejména protřepáním, přejít do stavu koloidního roztoku. Při ponechání soustavy v klidu se síly obnoví, čímž vznikne původní struktura gelu. Tento jev se nazývá **tixotropie**. Děj opačný, tedy vznik gelu protřepáním koloidního roztoku, se nazývá **reopexie** [24]. I přes prostorovou síť je difuzivita v gelu pro nízkomolekulární látky a ionty téměř neměnná od původního koloidního roztoku, z čehož vyplývá, že i elektrická vodivost gelů zůstává téměř stejná jako v solu [23, 24].

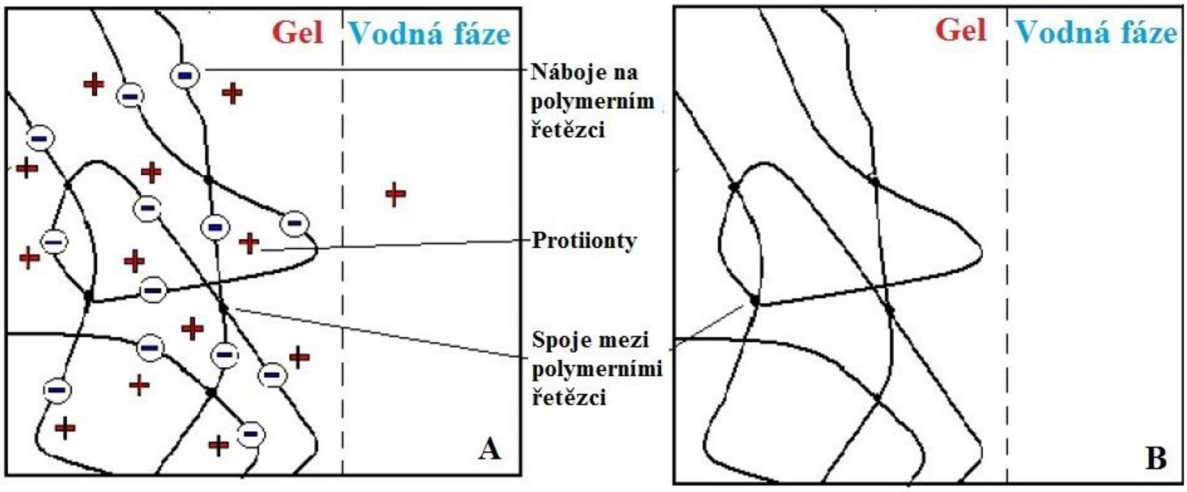
Pro fyzikální gely je také typické *neomezené* botnání, které se tímto nezastaví ve stádiu lyogelu, ale za přítomnosti dostatečného množství rozpouštědla zaniknou jejich styčné body a makromolekuly přecházejí do koloidního roztoku. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3, jedná se o proces pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla xerogelem, jež zvyšuje svou hmotnost i objem. Rychlost botnání vždy vzrůstá s teplotou a je také ovlivněna hodnotou pH. Hyaluronové gely patří mezi iontové gely, pro něž je botnavost mnohem vyšší ve srovnání s gely, jejichž síť neobsahuje skupiny schopné disociace. Síť polyelektrolytového gelu může ve vodném prostředí představovat jednoduchý model membránové rovnováhy. Na jedné straně membrány disociují funkční skupiny gelu. Přítomno je zde také ekvivalentní množství protiiontů, které jsou schopny membránou, propustnou pouze pro nízkomolekulární látky, přecházet velmi omezeně. Velký rozdíl koncentrací protiiontů v gelu na jedné a ve vodě na druhé straně membrány má tendenci zvyšovat snahu molekul vody přecházet do gelu, a tím zvyšovat botnání gelu.

V případě aplikací hydrogelů je botnání jednou z jejich nejdůležitějších vlastností. Charakterizuje se měřením kapacity absorpce vody nebo vodného roztoku. Zjištění hmotnosti nabotnaného hydrogelu je nejjednodušší cesta k získání botnací kinetiky a rovnováhy. Rozsah

botnání (R_S), nejčastěji používaný parametr k vyjádření botnací kapacity hydrogelů, je definován jako:

$$R_S = (W_S - W_D)/W_D, \tag{2}$$

kde W_S a W_D jsou hmotnosti nabotnaného a vysušeného hydrogelu. Botnací síla je kompenzována retrakční silou vyvolanou uzly sítě. Když se tyto dvě síly vyrovnají, botnání hydrogelu se dostane do rovnovážného stavu [54, 55].



Obr. 12: A) Botnání gelu vysokomolekulárního elektrolytu, B) nedisociovaný gel se stejnou strukturou v čisté vodě [24]

Čerstvě připravené fyzikální gely nejsou v termodynamické rovnováze. Časem tedy dochází ke zdokonalování struktury přeskupováním řetězců, což vede ke snižování Gibbsovy energie. U gelů s dlouhou životností spojných oblastí nastává tento proces pomaleji. Děj se nazývá *zrání gelu*. Jestliže je výsledkem zvýšení počtu uzlů nebo jejich funkčnosti, může tímto dojít ke smrštění síťovité struktury, čímž se sníží botnavost a část rozpouštědla, pro které již není v gelu místo, je vytlačována ven. Objem gelu se tedy sníží o vyloučené množství rozpouštědla. Tento jev se nazývá **synereze** a je podporován zvýšením teploty nebo přídavkem elektrolytu [23, 24].

2.3.3 Hydrogely

Stejně jako u definice gelů, tak i v případě hydrogelů se jedná o trojrozměrné sítě polymerních řetězců. Hydrogely se vyznačují značnou absorpcí vody, aniž by se rozpouštěly. Tato schopnost je dána hydrofilní povahou funkčních skupin vázaných na řetězci, mezi které mohou patřit hydroxylové (–OH), karboxylové (–COOH), amidické (–CONH) nebo sulfonové (–SO_3H) skupiny. Tyto polární skupiny jsou hydratovány jako první, a to přes vodíkové můstky či iontové interakce. Tím je absorbována tzv. primárně vázaná voda. V důsledku hydratace polárních skupin se prostorová síť hydrogelu zvětšuje, čímž se odkrývají hydrofobní skupiny, které také interagují s vodou a dochází tak k navázání sekundární vody. Primárně a sekundárně vázaná voda se souhrnně označuje jako *celkově vázaná voda*. Prázdný mezisíťový prostor vyplňuje ještě tzv. volně vázaná voda, která je dovnitř hydrogelu vháněna osmotickou silou. Objem hydrogelu je významně závislý na teplotě, pH či kvalitě rozpouštědla [56].

Hydrogely lze vyrobit z přírodních i syntetických polymerů, a to chemicky či fyzikálně. Chemické hydrogely vykazují pevnější vazby a označují se jako permanentní hydrogely, nicméně jejich příprava často vyžaduje přítomnost toxických látek, a proto nejsou vhodné pro medicínské použití. Fyzikální gely jsou pro tuto aplikaci vhodnější. Jedním ze způsobu jejich přípravy je elektrostatická interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, kdy vznikají tzv. **PEC hydrogely** (z angl. *„Polyelectrolyte-complex hydrogels"*). Takto připravené hydrogely jsou i předmětem této práce. Interakce tenzidů s polyelektrolytem byla diskutována v předchozích kapitolách [25, 57, 58].

2.3.4 Využití

Hydrogely nacházejí využití v mnoha odvětvích průmyslu jako např. při výrobě lepidel, kontaktních čoček, při zpracování kůží nebo při zvlákňování. Používají se též jako zahušťovadla v potravinářství. V kosmetice jsou gelové přípravky oblíbené pro svoji dobrou roztíratelnost na kůži. Nejvyšší potenciál však mají na poli tkáňového inženýrství, hojení ran či cílené distribuce léčiv. Degradační vlastnosti, a tedy jejich schopnost cíleně uvolňovat léčiva, jsou velmi dobře modulovatelné. Příkladem mohou být hydrogely citlivé na odpovídající fyzikální podněty jako např. teplota, pH, či světlo [59, 60, 61].

2.4 Reologie

Dlouhou dobu byla v technologických procesech materiálového inženýrství trhlina v potřebě charakterizovat deformační a tokové chování látek. V roce 1928 však chemik Eugene Cook Bingham a stavební inženýr Markus Reiner tuto trhlinu zalepili, když založili vědní obor reologii, jejíž název je odvozen z řeckých slov *rhein* a *logos*, která znamenají „tok" a „věda". Reologie tedy zkoumá vztahy mezi silou, napětím, deformací a rychlostí deformace u různých druhů látek. V následujícím roce 1929 pak byla založena *American Society of Rheology*, která nově vzniklé vědě udala směr. Reologie je totiž interdisciplinární obor, zasahující do fyzikální chemie, stavebního inženýrství, mechaniky kontinua, hydrodynamiky apod. Další směr, kterým lze reologii dělit je podle studia pevných či kapalných látek, mikro nebo makrostruktury materiálů, kde potom hovoříme o *mikroreologii* a *makroreologii* či studia kinetiky chemických reakcí nebo deformačních procesů v živých tkáních. Zde přichází na řadu *chemoreologie*, popř. *bioreologie*.

Již slavný starořecký filozof Herakleitos zvolal *„Panta rhei!"* („Vše plyne!"), taktéž ve starozákonním zpěvu prorokyně Debory se objevuje fráze: „skály tekly před Hospodinem". Z vědeckého hlediska totiž tečou všechny materiály, záleží pouze na pozorovacím čase. Proto je zavedeno tzv. Debořino číslo, které je dáno vztahem:

$$D.č. = \frac{t_{rel}}{t_{obs}}, \tag{3}$$

kde t_{rel} je tzv. relaxační doba daného materiálu. To je čas, který materiál potřebuje k přeskupení svých částic (molekul, iontů) při toku. Je velmi krátký pro dobře tekuté látky, jako je např. voda, ale velmi dlouhý pro materiály, které se nám jeví jako spíš pevné, např. žula. Ve jmenovateli je pak čas t_{obs}, po který látku pozorujeme.

Žula se nám v obvyklých pozorovacích časech jeví jako tvrdý materiál. Při opravdu dlouhém pozorování ale zjistíme, že v důsledku vnějších sil se žula nevratně deformuje a tudíž teče. Teče ale tak pomalu, že by nám zdaleka nestačil ani celý náš život na spolehlivé zaznamenání toku.

Debořino číslo je tedy bezrozměrné číslo, které charakterizuje tok materiálů za určitých podmínek. Čím je jeho hodnota menší, tím tekutější se jeví daný materiál. Skály proto mohou před Hospodinem téct, pokud se jejich pozorovací doba blíží k nekonečnu.

K dané problematice stojí za zmínku *„Pitch drop experiment“*, který započal v roce 1927 na univerzitě v Austrálii. Jedná se o pozorování toku, na první pohled tuhého, asfaltu. Experiment je nepřetržitě monitorován kamerou a za celou dobu ukáplo 9 kapek, poslední v roce 2014.

Jak vyplývá z předešlého, reálné látky nevykazují limitní případy ideálně nestlačitelné kapaliny (s nulovou viskozitou) a ideálně tuhého tělesa (s nekonečně velkým modulem pružnosti), které jsou součástí následujících zákonů, ale jejich chování je možno zařadit někde mezi, a proto se nazývá viskoelastické [23, 62].

2.4.1 Hookův zákon

Hookův zákon popisuje základní vztah principu deformace ideálně elastických pevných látek, což jsou látky, u kterých nedochází k disipaci vložené energie. Veškerá energie uložená během namáhání je po uvolnění tělesa opět využita. Takové elastické látky se při působení síly chovají jako pružina a deformace je dokonale vratná, neboli **elastická**. Působení tečného napětí σ na těleso způsobí jeho protažení o délku Δl. Hookův zákon je pak dán tvarem:

$$\sigma = G_E \cdot \frac{\Delta l}{l} = G_E \cdot \varepsilon \,, \tag{4}$$

kde $\varepsilon = \Delta l/l$ je tzv. relativní prodloužení (deformace) a konstantou úměrnosti G_E je Youngův (elastický) modul pružnosti.

Při větší míře deformace můžeme u reálných tuhých těles pozorovat druhý typ odezvy. Ten se po odnětí působící síly projeví tzv. nevratnou, neboli **trvalou** deformací [63, 64].

2.4.2 Newtonův zákon

Newtonův zákon popisuje, obdobně jako Hookův, vztahy pro deformace, zde pro případ ideálně viskózních tekutin. Jedná se zejména o plyny a nízkomolekulární kapaliny, které veškerou vloženou energii disipují na teplo. Nedochází tedy k žádnému zpětnému využití vložené mechanické energie při odlehčení vzorku. Newtonův zákon pro takové ideálně viskózní látky, nazývané také jako **newtonské**, je dán vztahem:

$$\sigma_{xy} = \eta \cdot \gamma_{xy} \,, \tag{5}$$

kde σ_{xy} je smykové napětí, η je dynamická viskozita a γ_{xy} je smyková rychlost. Z daného vztahu vyplývá, že viskozita newtonovských látek se při zvyšujícím se tečném napětí nemění, proto je tedy toto tečné napětí lineárně závislé na smykové rychlosti.

Samotná definice **viskozity** zní, že se jedná o schopnost materiálu bránit se deformaci silami vnitřního tření úměrnými rychlosti deformace, kde vnitřní tření je důsledek vzájemného silového působení mezi částicemi při proudění. Viskozita se mění s koncentrací látek, teplotou, časem a tlakem. V **tabulce 1** jsou pro ukázku uvedeny viskozity běžných materiálů.

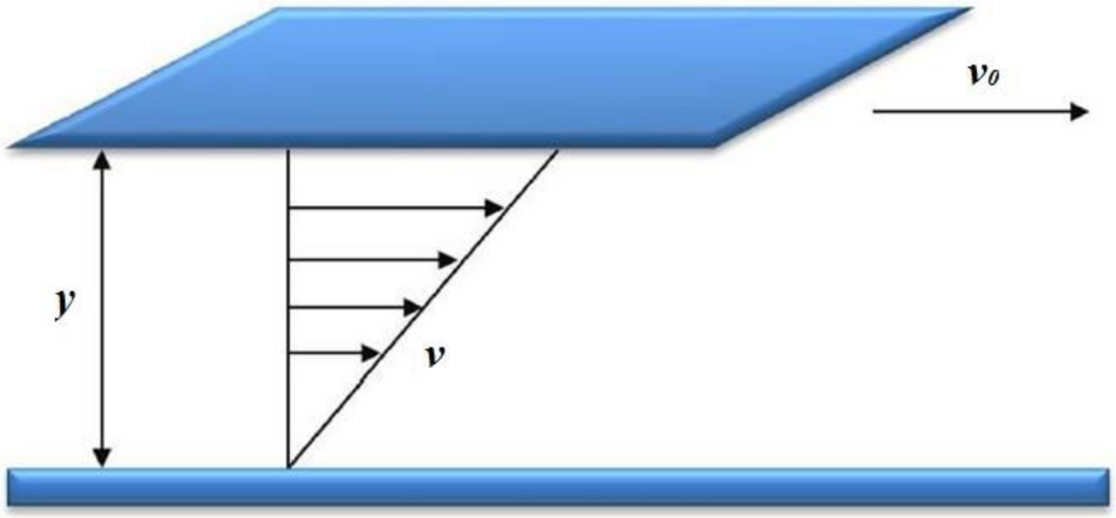
Tab. 1: Příklad viskozit vybraných látek

Materiál	Viskozita [Pa.s]
sklo	10^{40}
roztavené sklo (500 °C)	10^{12}
bitumen	10^{8}
polyethylen (120 °C)	10^{5}
polyethylen (220 °C)	10^{3}
sirup	10^{2}
med	10^{1}
glycerin	10^{0}
olivový olej	10^{-1}
rtuť, voda	10^{-3}
vzduch	10^{-5}

Pro případ proudění kapaliny mezi dvěma deskami, z nichž spodní je stacionární a horní pohyblivá, definoval Isaac Newton v roce 1687 vztah pro smykové napětí σ následovně:

$$\sigma = \frac{F}{A}, \tag{6}$$

kde F udává smykovou sílu, která vyvolává pohyb horní desky o ploše A.



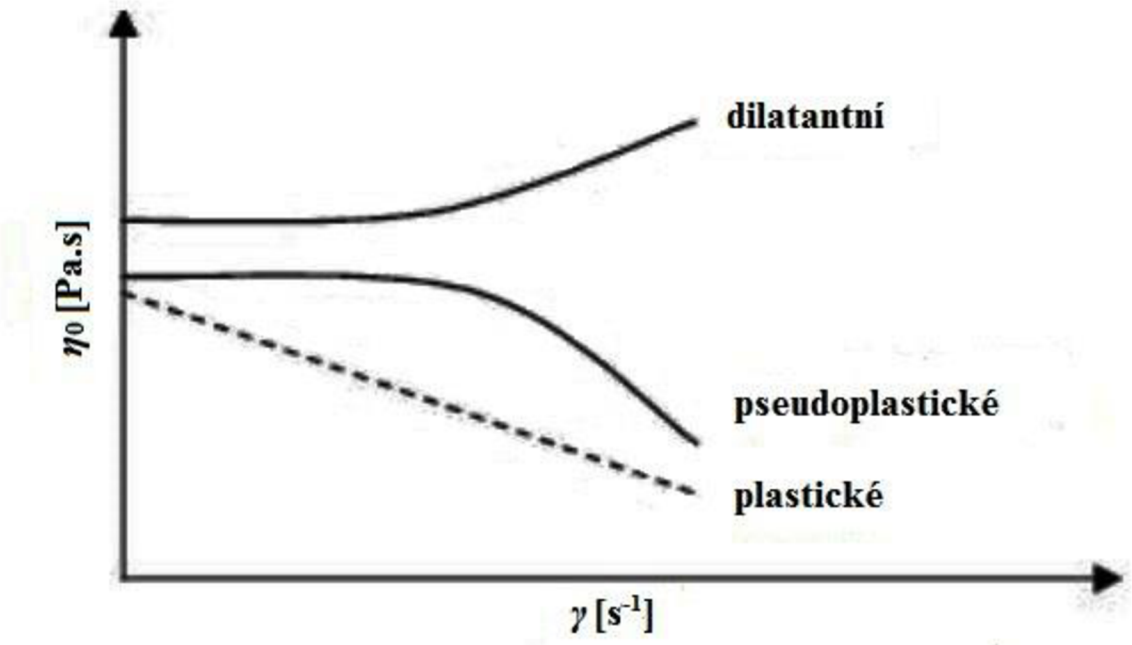
Obr. 13: Rychlostní profil toku v kapalině mezi nepohyblivou (spodní) a pohybující se (horní) deskou

Látky, které se neřídí tímto zákonem, se nazývají jako **nenewtonovské**. Jejich viskozita není materiálovou konstantou, ale je závislá na velikosti tečného napětí nebo rychlosti deformace a označuje se proto pojmem zdánlivá viskozita η_0. Základním modelem pro viskozitu nenewtonovských látek je tzv. **mocninný model** (*„power-law model"*), který je dán vztahem:

$$\eta_0 = K \cdot \gamma^{n-1}, \tag{7}$$

kde η_0 je zdánlivá viskozita, γ je smyková rychlost, konstanta K udává tzv. koeficient konzistence dané látky, který určuje strmost výsledných křivek, prezentovaných příkladně na **obr. 14** a n zastává index toku daných látek projevující se zakřivením křivek (**obr. 14**).

Mezi nenewtonovské látky se řadí zejména roztoky či taveniny polymerů, suspenze, pasty apod. Se změnou tečného napětí nebo rychlosti deformace může tedy zdánlivá viskozita klesat, popř. růst, kdy takové chování označujeme jako *pseudoplastické* ($n < 1$) a *dilatantní* ($n > 1$). Z daného vyplývá, že newtonské látky mají $n = 1$. Typickým příkladem dilatantní látky je kukuřičný škrob rozpuštěný ve vodě, který se při pozvolném míchání jeví jako tekutý a při prudkém míchání tuhne. Pseudoplastické chování naopak vykazují např. barvy a laky na stěnu, případně krev, které při prudším roztírání lépe tečou [63, 65].



Obr. 14: Závislost zdánlivé viskozity na rychlostním gradientu pro různé typy nenewtonských látek

Kromě mocninného modelu obsahuje reologie celou řadu dalších, každý vhodný pro jiný typ aplikace. Za zmínku stojí ještě **Binghamův model**, který do rovnice zavádí tzv. *mez toku*, jež představuje největší smykové napětí, při kterém ještě nedochází k deformaci dané látky. V praxi to znamená, že se při namáhání látky nějaký čas nic neděje, než začne téct. Typickým příkladem je např. kečup, do jehož láhve je nutno klepnout, čímž se překoná mez toku, a poté teče. Rovnice výpočtu zdánlivé viskozity dle Binghamova modelu je definována následovně:

$$\eta_0 = \sigma_0 \cdot \gamma^{-1} + K \cdot \gamma^{n-1}, \tag{8}$$

kde z předchozího mocninného modelu přibývá pouze parametr σ_0 představující mez toku.

Na závěr této podkapitoly je navíc uvedena tabulka vybraných smykových rychlostí různných úkonů využitelných zejména v průmyslu. Následující znalosti jsou důležité při konstrukci různých zařízení s tryskami či nálevkami určitého poloměru, kdy je nutné v laboratnorních podmínkách změřit viskozity materiálů používaných na dané aplikace s uvažovanou smykovou rychlostí úkonu. Tím se zabrání konstrukčním chybám, kdy se materiál v trysce ucpe. V případě farmakologie je možno uvažovat oftalmologické aplikace, kdy je např. nutno porovnat viskozitu slz při dané hodnotě smykové rychlosti mrknutí oka s viskozitou použitých medicínských gelů při stejné smykové rychlosti. Tímto způsobem se dá vyhodnotit, zdali se námi vyrobený gel vůbec v oku rozetře.

Tab. 2: Příklad smykových rychlostí vybraných aplikací [63, 65]

Situace	Smyková rychlost [1/s]	Aplikace
sedimentace jemných částic	10^{-6}–10^{-4}	stabilizace laků, léčiv
kapilární vyrovnávání hladiny	10^{-2}–10^{-1}	operace po tisku
stékání filmu	10^{-1}–10^{1}	natírání
vytlačovací stroje	10^{0}–10^{2}	zpracování polymerů
nanášení ponorem	10^{1}–10^{2}	keramika, metalurgie, potravinářství
žvýkání a polykání		potravinářství
tok trubkou	10^{1}–10^{3}	doprava čerpáním, tok krve
míchání	10^{1}–10^{3}	homogenizace
natírání a rozstřikování	10^{3}–10^{4}	sušení, lakování
mrknutí oka	10^{3}–10^{4}	oftalmologie
mokré mletí pigmentů	10^{3}–10^{5}	výroba barev a laků
rychloběžné nanášení povlaků	10^{3}–10^{5}	průmysl papíru, polygrafie
ruční roztírání	10^{4}–10^{5}	masáž pokožky krémem
mazání	10^{3}–10^{7}	výbušné motory

2.4.3 Viskoelasticita

Hookův a Newtonův zákon, které jsou popsané výše, představují limitní případy reologického chování, a to pro ideální látky. Většina reálných látek však svými vlastnostmi připomíná částečně jak tuhé elastické těleso, tak také viskózní kapalinu. Tyto látky se nazývají **viskoelastické**.

Materiálové vlastnosti viskoelastických látek se zpravidla popisují dvěma typy modulů. V prvním případě je to **elastický modul** pro pevné látky, standardně označovaný jako G', který vyjadřuje energii uloženou v materiálu během napěťového cyklu a tvoří reálnou část komplexního smykového modulu G^*. **Viskozitní modul** pro kapaliny, označovaný G'', sděluje ztrátu energie během napěťového cyklu. Jedná se o imaginární složku komplexního smykového

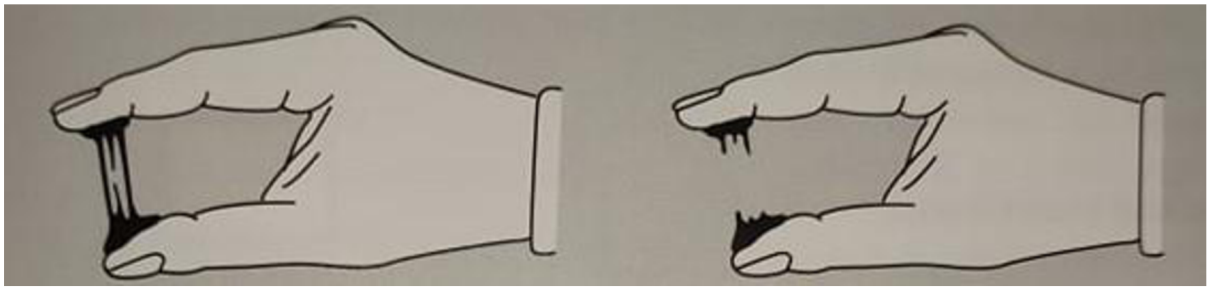
modulu G^*. **Komplexní smykový modul** zahrnující obě složky a vyjadřující reologické chování reálných viskoelastických látek lze matematicky vyjádřit jako komplexní číslo:

$$G^* = G' + iG'' . \tag{9}$$

K určení přesné hranice v chování mezi pevnou a kapalnou fází slouží tzv. **bod překřížení** (z angl. *„cross point"*) elastického a ztrátového modulu. Do dosažení dané hodnoty deformace převažuje právě jeden z modulů a udává tak charakter chování zkoumané látky. V praxi se tak porovnávají výsledky obou modulů (viz kapitola 6.1), kdy při vyšší hodnotě elastického modulu se látka chová jako pevná, naopak při vyšším viskozitním modulu se látka chová více tekutě. Získání výledků viskoelastických modulů je možné pouze na rotačním reometru s odpovídajícím počítačovým softwarem (viz kapitola 2.4.4.2) [66].

2.4.4 Měřicí systémy a metody charakterizace viskoelastických látek

Pro stanovení viskozity či mechanických vlastností látek se v praxi setkáváme s množstvím měřicích metod. Od nejjednoduššího orientačního zanalyzování látky mezi prsty, též známého jako Furdíkova metoda, je možno měřit viskozitu zejména průtokovými viskozimetry. Nejsložitější přístroje v podobě rotačních reometrů jsou schopny pomocí softwaru zobrazit závislosti viskoelastických modulů, viskozitní funkce a další parametry.



Obr. 15: Furdíkova metoda [67]

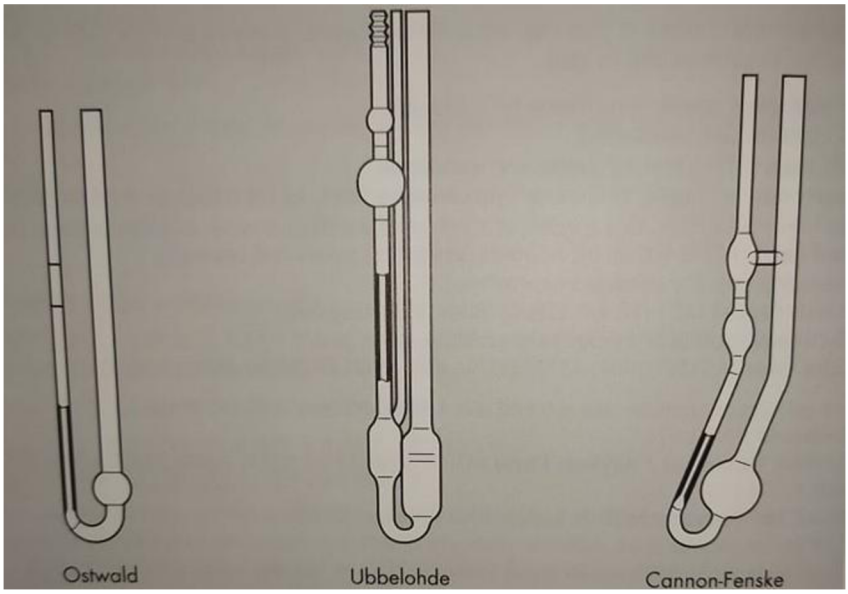
2.4.4.1 Klasické viskozimetry

Prvním typek klasických viskozimetrů jsou **kapilární viskozimetry**, které jsou založené na meření času, za který kapalina proteče určitým úsekem kapiláry. Kapilární viskozimetry jsou přesné (0,01 až 0,1 %), avšak nemohou být použity pro nenewtonské kapaliny, neboť rychlostní gradient není konstantní, ale roste se vzdáleností od osy kapiláry. Další problém nastává u suspenzí, kdy často dochází ke komplikacím vlivem nehomogenity vzorků, která je zapříčiněna především sedimentací. Matematicky je daný proces meření viskozity založen na *Poiseuillově rovnici* pro průtok kapaliny kapilárou o poloměru r a délce l:

$$\eta = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta p \cdot \tau}{8V \cdot l}', \tag{10}$$

kde Δp je rozdíl tlaku daný hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře, který je úměrný hustotě kapaliny, V je objem kapaliny, který proteče kapilárou za čas τ. Viskozita je tedy úměrná hustotě kapaliny a době průtoku. Obvykle se provádí měření relativní, při němž se na stejném viskozimetru porovnává viskozita kapaliny η se známou viskozitou srovnávací kapaliny η_{ref}:

Na **obr. 16** jsou zobrazeny typy kapilárních viskozimetrů s nejpoužívanějším Ubbelohdeho viskozimetrem.



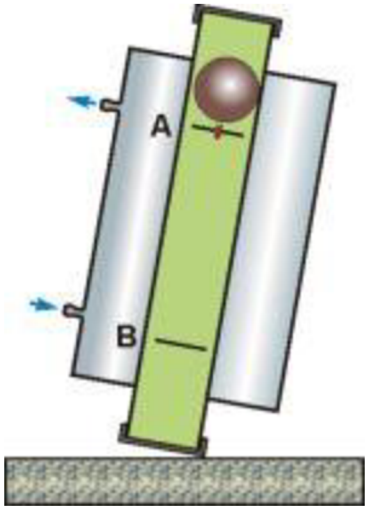
Obr. 16: Typy kapilárních viskozimetrů [67]

Dalším typem jednoduchých viskozimetrů jsou **pádové viskozimetry**. Měření dynamické viskozity η je založeno na *Stokesově vztahu* pro pád koule o poloměru r ve viskózním prostředí:

$$\eta = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2 \cdot g \cdot (\rho_k - \rho)}{u}, \tag{11}$$

kde g je gravitační zrychlení, ρ_k je hustota kuličky a ρ hustota kapaliny.

Častou variantou kuličkových viskozimetrů je viskozimetr Höpplerův (**obr. 17**), ve kterém se kulička valí skleněnou trubicí o přesném vnitřním průměru, skloněnou v úhlu 10°, naplněnou měřenou kapalinou, obklopenou temperačním pláštěm. Měří se rychlost u, tedy čas, potřebný k průchodu kuličky mezi horní ryskou A a spodní ryskou B. Obvykle se měří srovnávacím způsobem. Viskozimetr může být použit jen pro průhledné newtonské kapaliny.



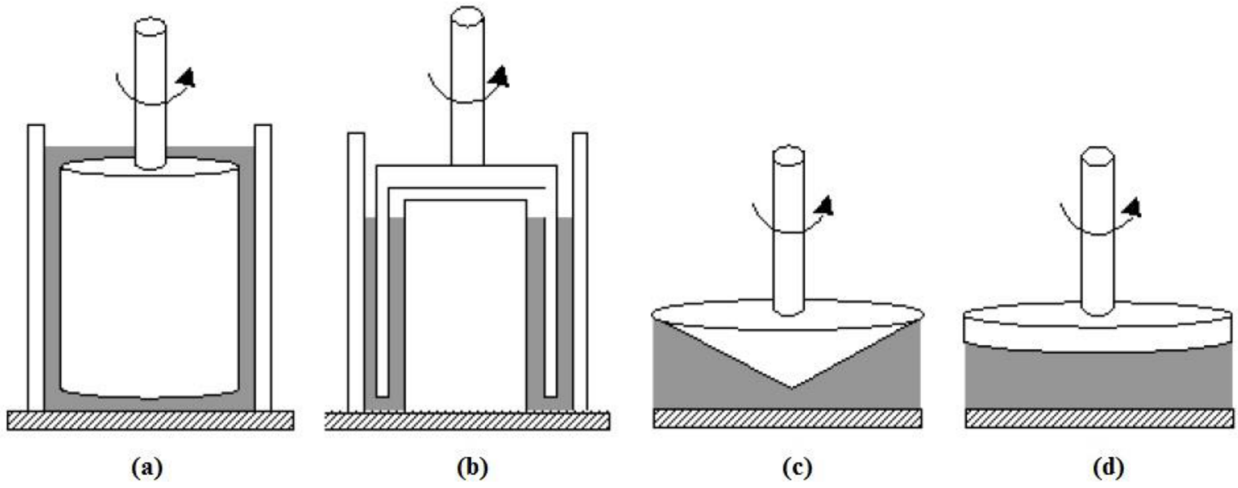
Obr. 17: Höpplerův pádový viskozimetr

2.4.4.2 Rotační reometry

Nejdokonalejší měřicí přístroje viskozity a mechanických vlastností se nazývají rotační reometry, které jsou složeny ze dvou základních částí, kdy jedna je statická – stator a druhá rotuje nastavenou úhlovou rychlostí – rotor. Jsou založeny na měření torzní síly, kterou působí rotující kapalina na element zavěšený na torzním vlákně, který se otáčí konstantní úhlovou rychlostí. Vnitřním třením kapaliny je otáčivý moment přenášen na druhý element. Po ustavení rovnováhy se měří úhel pootočení elementu od původní polohy φ, který je úměrný úhlové rychlosti ω a viskozitě kapaliny η, přičemž K je konstanta přístroje:

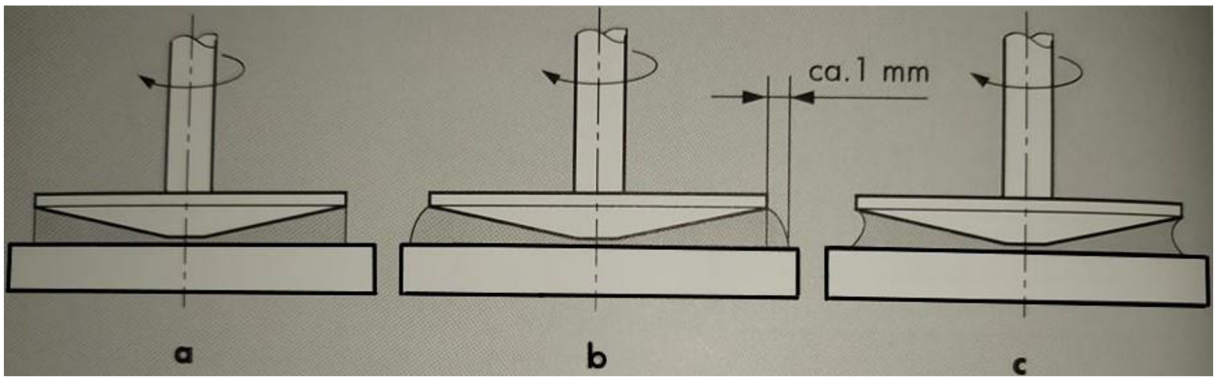
$$\varphi = K \cdot \eta \cdot \omega \,. \tag{12}$$

Pro měření různě viskózních vzorků lze použít několika typů geometrie popsaných na **obr. 18**. Ke stanovení reologických vlastností gelových vzorků, jež jsou předmětem této práce, je nejvhodnější typ deska-deska (*parallel plates*). Výhoda spočívá v malé spotřebě vzorku a jednoduchém čištění aparatury. Avšak při měření tokových křivek může vzorek ve vysokých smykových rychlostech z aparatury vylétávat. Speciální případ geometrie pro tekutější roztoky je dvojice koaxiálních válců (*double gap concentric cylinders*). Oba válce jsou duté a zasouvají se do sebe, přičemž jeden je opět stacionární a druhý, oscilující, namáhá vzorek. Nevýhodou je však větší spotřeba vzorku oproti aparatuře deska-deska a složitější čištění, kdy musí být celá aparatura rozebrána. Viskóznější vzorky, jako např. hydrogely, nelze pohodlně nadávkovat do tohoto typu aparatury, proto je pro ně vhodnější uspořádání deska-deska [68].



Obr. 18: Geometrie rotačního reometru: (a) válec-válec, (b) double-gap, (c) kužel-deska, (d) deska-deska [68]

Pro zkoumání viskoelastických látek včetně hydrogelů jsou vhodné **oscilační testy**. Základní princip spočívá v rovnoměrném uložení vzorku mezi dvě části měřicí aparatury, přičemž spodní je stacionární a horní osciluje. V případě gelových vzorků je nejvhodnější typ deska-deska. Výhoda spočívá v malé spotřebě vzorku a jednoduchém čištění aparatury. Podmínkou je, aby se vzorek deformoval homogenně v celém smykovém rozsahu a aby přilnul k oběma deskám bez jakýchkoliv protiskluzových účinků (**obr. 19**).



Obr. 19: Dávkování rotačního reometru: (a) ideální, v praxi nedosažitelné, (b) správné, (c) nedostatečné [67]

Existuje několik druhů nastavení experimentu, v této práci budou použity amplitudové testy s konstantní frekvencí oscilace a frekvenční testy s konstantní amplitudou deformace.

V prvním případě je nastavena konstantní frekvence oscilací s měnící se hodnotou amplitudy deformace v %, v případě druhém se mění oscilace v rozmezí frekvencí se stálou hodnotou amplitudy deformace (vybranou z lineární viskoelastické oblasti, což je oblast mechanického namáhání, při které dochází k vratné deformaci). Zaznamenává se chování namáhaných vzorků, a to pomocí závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace v případě testu amplitudového a závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací v případě testu frekvenčního. Poměrem těchto modulů získáme ztrátový úhel δ:

$$tg(\delta) = \frac{G''}{G'}, \tag{13}$$

z jehož velikosti se dá usuzovat charakter chování zkoumaného vzorku. V případě, že $\delta > 45°$ (tedy $tg(\delta) > 1$), vykazuje vzorek viskózní chování a naopak, pokud je $\delta < 45°$ (tedy $tg(\delta) < 1$), se vzorek chová elasticky [67, 69].

Druhým typem měření je stanovení závislosti dynamické vizkozity na smykové rychlosti, tzv. **tokové testy**. Výsledný tvar tokových křivek pak charakterizuje reologické chování materiálu, kdy ze závislosti či nezávislosti viskozity na měnící se smykové rychlosti lze usuzovat, zdali se látky chovají jako newtonské nebo nenewtonské (*pseudoplastické* či *dilatantní* – viz **obr. 14**).

Z hlediska medicínských aplikací je vhodné aplikovat právě tyto typy testů pro farmaceutické a kosmetické přípravky. Ty mohou zastupovat příklad pseudoplastické, rychle vstřebatelné látky (čím rychleji roztíráme, tím lépe se vstřebává z důvodu poklesu viskozity). Opačný případ platí např. pro zubní pasty, které si i po roztírání musí zachovat svůj vysoce viskózní charakter [63, 70].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Cílem mnoha vědeckých týmů po celém světě je udělat průlom v oblasti léčby nádorových onemocnění, a to pomocí cílené distribuce léčiv, kdy je toto léčivo dopraveno do postižené tkáně speciálním nosičem, který zabrání jeho nežádoucímu působení ve zdravé tkáni. Výběr nosiče není věc jednoduchá, musí se jednat o látku biokompatibilní a biodegradabilní, schopnou pevně vázat léčivo, aby nedošlo k jeho samovolnému uvolnění do krevního oběhu, zároveň umožnit léčivu specificky působit v požadovaném místě. Dalším důležitým požadavkem na nosič je netoxicita látek vzniklých jeho degradací [71].

Byla vyvinuta celá řada nosičů, založených na liposomech, dendrimerech [72] nebo polymerních micelách [42, 73].

Výsledky studií testování různých biopolymerů pro použití v cílené distribuci léčiv byly diskutovány jinde [74–78]. Testy se většinou zaměřovaly na charakteristiku daných biopolymerů, ať už nativních či hydrofobně modifikovaných, konkrétně se zkoumala bioaktivita, biodegradabilita a vlastnosti jejich micel. Na stanovení vlastností micel byly použity klasické techniky fluorescenční sondy, dynamického rozptylu světla (DLS), infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), rentgenové difrakce, nukleární magnetické rezonance (NMR) nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Sledovala se velikost a stabilita polymerních micel, byla stanovena kritická micelární koncentrace, jejich biokompatibilita, příp. interakce směsí micel různých biopolymerů.

3.1 Hyaluronan v cílené distribuci

Podle mnohých autorů se však jako nejvýznamnější zástupce na pozici potenciálních nosičů léčiv jeví hyaluronan. Jedná se o tělu vlastní polysacharid, takže je přirozeně biokompatibilní a biodegradabilní. Velmi důležitá je také jeho citlivost na receptor CD44, který se nachází u většiny savčích buněk, kde je zodpovědný za jejich proliferaci a migraci. Ve velké míře je však tento receptor exprimován na povrchu nádorových buněk. Tohoto faktu se využívá při aktivním cílení, kdy je hyaluronan specificky vychytáván právě nádorovou tkání [79, 80].

Avšak právě díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě je nativní hyaluronan pro medicínské aplikace a tkáňové inženýrství téměř nepoužitelný. Přistupuje se proto k jeho modifikacím, ať už se jedná o síťování, derivatizace hydrofobními funkčními skupinami či interakce s jinými látkami. Toho se chopili ***S. Qhattal a spol.*** [81], kteří navázali hyaluronan na liposomy a zkoumali právě citlivost daných komplexů na hyperexprimované nádorové receptory CD44. Účinnost vychytávání daných komplexů byla vyšší než v případě liposomů bez hyaluronanu, zároveň byla také závislá na střední velikosti konjugátů, molekulové hmotnosti použitého hyluronanu a hustoty jeho řetězců na liposomech.

V roce 2009 proběhl výzkum nového typu modifikace hyaluronanu. Studiem vlastností alkylovaného derivátu hyaluronanu se zabývali ***M. Chytil a M. Pekař*** [82]. Tento derivát byl připraven navázáním alkylových řetězců o délce 8 a 12 atomů uhlíku na –OH skupiny D-glukoronové kyseliny, přičemž testy byly provedeny při nízkém (pod 20 %) i vysokém stupni substituce (100 %). Při testech povrchového napětí, viskozity a reologických vlastností se ukázalo, že největší povrchovou aktivitu projevovaly vysokomolekulární deriváty s vyšším stupněm substituce. Dále bylo zjištěno, že vysokomolekulární, vysocesubstituovaný hyaluronan s kratším alkylovým řetězcem má nižší kritickou agregační koncentraci (CAC) než nízkomolekulární hyaluronan s nižším stupněm substituce a delším navázaným alkylovým řetězcem. Z toho vyplývá, že asociační chování je ovlivněno délkou řetězce, molekulovou hmotností i stupněm substituce.

Agregační chování daného typu hyaluronanu provedli také o rok dříve ***F. Mravec a spol.*** [83], a to pomocí fluorescenční spektroskopie, užitím pyrenu a perylenu jako fluorescenčních sond. Hydrofobně modifikovaný hyaluronan byl použit o pěti různých molekulových hmotnostech se stupněm substituce 10–70 %. Výsledky měření pomocí obou sond potvrdily, že daný typ hyaluronanu má sklony k agregačnímu chování v porovnání s nativním hyaluronanem. Výsledky těchto prací dokazují, že hydrofobně modifikované deriváty hyaluronanu jsou vhodnými uchazeči v kategorii nosičů pro cílenou distribuci léčiv.

Hyaluronan modifikovaný na primární hydroxylové skupině použili pro své testy ***K. Iris a spol.*** [19]. Studie z roku 2011 zaměřená na regeneraci chrupavek použila jako začleňovací skupiny metakrylát a akrylát, kdy právě tyto funkční skupiny umožňují fotozesítění daného komplexu za vzniku hydrogelu. Adhezní a degradační testy vykazovaly slibné výsledky daného hydrogelu, který by mohl být nadále hojně využíván pro lékařské účely.

O rok později zkoumal tým ***R. Censiho*** [84] kombinaci polyethylenglykolu (PEG) s diakrylát/thiolovaným hyaluronanem. Jako síťovací prostředek zde byla opět použita fotopolymerizace. Cílem bylo prozkoumat uvolňování proteinů z takto upraveného hyaluronanu. Dle očekávání se kladně nabité proteiny uvolňovaly rychleji než záporné, a to z důvodu záporného náboje na řetězcích hyaluronanu. Rychlost uvolňování také závisí na enzymu hyaluronidáze, která je přítomna v biologických tkáních.

V témže roce proběhl také pokus zapouzdřit do micelárních útvarů modifikovaného hyaluronanu cytostatikum Paclitaxel (PTX), jehož úspěšným nosičem se stal styryl-pyridinium-hyaluronan. Experimenty prováděli ***Y. Tao a spol.*** [85]. Užitím metody fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) bylo dokázáno, že daný nosič je vychytáván mozkovými tumory, tudíž bude nadále používán v medicíně.

Úspěšná solubilizace PTX se povedla i ***J. Liovi*** [86] při použití micelárního roztoku hyaluronanu s deoxycholovou kyselinou jakožto nosiče. Polymerní micely tohoto systému byly vychytávány karcinomem prsu. Prokázalo se také, že dopravují hydrofobní cytostatika velmi rychle a receptory v tumoru podporují množení těchto micel.

Jak však naznačují předchozí studie, uvolňování aktivních látek z hyaluronového nosiče je silně závislé na aktivitě hyaluronidáz. Z tohoto faktu vyplývá zásadní problém cílené distribuce, a to neúmyslné uvolnění aktivní látky do krevního řečiště. Touto problematikou se v roce 2013 zabývali ***H. Yoon a spol.*** [87], kteří vyvinuli nanočástice kyseliny hyaluoronové připravené fotozesíťováním akrylátových skupin. Takto zesíťovaný hyaluronan vykazoval větší stabilitu a také delší a postupnější uvolňování PTX v místě účinku. Autoři se shodují, že naměřená data poskytují slibné možnosti využití těchto derivátů pro medicínské aplikace.

Použití jiných cytostatik do komplexu s haluronanem se věnovaly vědecké skupiny ***S. Lia*** [88] a ***S. R. Datira*** [89]. První jmenovaní připravili konjugáty hyaluronan-cisplatina navázáním cisplatiny na karboxylové skupiny haluronanu za vysoké teploty. Testy na myších prokázaly účinnější vychytávání daných konjugátů receptory CD44. Druhá skupina připravila komplexy π-π vrstvených karbonových nanotrubiček s hyaluronanem. Aktivní látka zde byla doxorubicin. Obdobně byly provedeny experimenty na myších s tumorem plic, kdy dané systémy vykazovaly pětkrát větší inhibiční efekt než volný doxorubicin.

3.2 Interakce hyaluronan-tenzid

Hojně prostudovaná je také myšlenka interakce tenzidu s hyaluronanem, kde, zjednodušeně řečeno, tenzid vytváří hydrofobní prostor pro rozpuštění nepolárního léčiva a polyelektrolyt, v tomto případě hyaluronan, poskytuje vnější ochranu a schopnost cílení k poškozené tkáni.

Dané komplexy jsou také více stabilní, protože se v nich projevují nejen elektrostatické, ale také hydrofobní interakce.

Právě potvrzení elektrostatických interakcí ve výše zmíněném komplexu hyaluronan-kationtový tenzid měli za cíl ***J. Xu a spol.*** [90]. Použitím metod dynamického rozptylu světla, měření zeta potenciálu, mikroskopie a meření turbidity byly elektrostatické interakce v daných systémech určeny jako klíčové. Autoři dále zjistili, že proces vázání tenzidových micel na řetězce polymeru je podmíněn molárním poměrem jednotlivých složek.

Vzájemné působení hyaluronanu a tenzidu bylo cílem zájmu ***T. Halasové a spol.*** [91]. Jako vzorek byl použit hyaluronan o dvou molekulových hmotnostech smíchaný s dvěma zástupci kationtových tenzidů – CTAT nebo CTAB v roztoku NaCl. Výsledky ukázaly, že i když přítomnost NaCl může potlačit interakce mezi opačně nabitými polyelektrolyty a povrchově aktivními látkami, jsou tyto interakce stále přítomny v některých systémech hyaluronan-tenzid, bez ohledu na iontový charakter povrchu. Molekulová hmotnost hyaluronanu také nemá na posun CMC významný vliv. Fluorescenční data ale poukázala především na fakt, že tvorba agregátů (micel) se vyskytuje spíše v určitém intervalu, než v jednom konkrétním bodě koncentrace povrchově aktivní látky, a to zejména v přítomnosti hyaluronanu. Tento poznatek je zásadní v problematice cílené distribuce léčiv, kdy se právě snažíme zjistit, jestli, a při jaké koncentraci, je systém schopen vytvořit micely ochotné pojmout léčivo.

Sama ***Halasová*** [92] pak ve své dizertační práci zkoumá interakce CTAB a hyaluronanu. Testy proběhly v oblasti kolem CMC tenzidu, kdy se potvrdilo, že tento je schopen tvořit stabilní agregáty s hydrofobními doménami schopné pojmout nepolární látku a zodpovědné za interakci s řetězci hyaluronanu. Testy byly provedeny pro různé koncentrace CTAB a různá prostředí. Při vyšších koncentracích tenzidu pak dochází ke vzniku gelové fáze, která je schopna pojmout všechnu nepolární látku. Reologické vlastnosti gelů jsou závislé na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu. Solubilizační testy potvrdily, že gel je schopen vytvořit se v přítomnosti téměř jakékoliv látky nezávisle na její hydrofilicitě či hydrofobicitě, jedinou výjimku tvořil minerální olej s vysokou viskozitou a hustotou nižší než voda.

Asi nejznámější je práce vědeckého týmu okolo ***K. Thalberga*** [93], již z roku 1989, který zkoumal vzájemné interakce mezi hyaluronanem sodným a kationtovými tenzidy s různou délkou řetězce (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků). Bylo prokázáno, že ještě pod kritickou micelární koncentrací tenzidu dochází k jeho navázání na hyaluronan, ovšem toto platí jen u tenzidů, které obsahují 10 a více uhlíků v alkylovém řetězci. Po dalším přidávání tenzidu se agregáty stabilizují a dochází i k tvorbě volných micel. Vodivostní, solubilizační a NMR měření prokázaly, že micely s navázaným hyaluronanem mají menší velikost než volné micely tenzidu. Byla také prokázána nezávislost molekulové hmotnosti polymeru (nad určitou minimální hodnotu) na interakci polymer-tenzid.

Interakce polymerů s aniontovými (SDS) a neiontovými (Cremophor EL a Tween 80) tenzidy prověřovali pomocí metody fluorescenční spektroskopie ***D. Yin a spol.*** [94]. Výsledky studie ukázaly, že hodnoty CMC jsou pro Cremophor EL téměř identické v přítomnosti i absenci hyaluronanu, což vypovídá o extrémně slabých interakcích hyaluronanu s neintovými tenzidy. Naopak v případě SDS dokázal přídavek hyaluronanu CMC mírně snížit. Experiment s čistým SDS v roztoku NaCl však vykazuje podobné chování, což potvrzuje, že se v tomto případě hyaluronan choval jako nízkomolekulární elektrolyt. Zmíněné závěry podporují myšlenku použít hyaluronan ve spojení s kationtovými tenzidy. Autoři také posoudili vliv přídavku dalších sacharidů na příslušné interakce v systému.

Vhodný výběr Septonexu, coby tenzidu využívaného pro tuto práci, potvrzuje studie českých vědců pod vedením ***A. Čapka*** [95], kteří se zabývali antimykotickou aktivitou kvartérních amoniových sloučenin proti 8 vybraným mikrobiálním kmenům. Z testovaných aktivních látek vykazoval Septonex nejlepší výsledky, kdy však bylo zjištěno, že kvartérní amoniové sloučeniny jsou obecně užitečné v lokální chemoterapii, stejně tak jako v dezinfekci. Pokud tyto sloučeniny obsahovaly v alifatickém řetězci méně než 12 uhlíků, či se v jejich struktuře nacházel aromatický nebo pyridinový kruh, byla antimykotická aktivita snížena. Naopak přítomnost halogenu ve struktuře kvartérní amoniové sloučeniny tuto aktivitu zvyšovala.

Nevýhoda účinků kationtových tenzidů popsaných výše (antibakteriální a antimykotická aktivita) je, že působí také na savčí buňky. Tým ***M. Pekaře*** [96] se proto rozhodl, otestovat cytotoxicitu samotných kationtových tenzidů (CTAB a Septonexu) a jejich komplexů s hyaluronanem. Testy proběhly na několika typech lidských buněk (osteoblasty, keratinocyty a fibroblasty). Zajímavé je, že tenzidy vykazovaly selektivní citlivost na různé typy buněk, CTAB na keratinocyty, Septonex na osteoblasty a fibroblasty. Komplex tenzidu s hyaluronanem vykazoval v obou případech sníženou cytotoxicitu, přičemž autoři také stanovili minimální potřebný limit hyaluronanu v komplexu s tenzidy pro potlačení jejich nežádoucích účinků na buňky. Ochranná funkce hyaluronanu v těchto systémech otevírá dveře jejich budoucímu kosmetickému, diagnostickému či medicínskému použití.

3.3 Hyaluronové hydrogely v medicínských aplikacích

Jednou z možností vytvoření nosiče léčiv je příprava hydrogelových matric, jejichž porézní struktura umožňuje pohodlné ukládání farmak. Výhoda hydrogelů je potom, právě díky jejich unikátní struktuře, pozvolnější uvolňování léčiva a zachování vysoké lokální koncentrace léčiva v místě účinku. Mnoho studií proto stále směřuje ke stanovení jejich fyzikálně chemických vlastností nebo přípravě nových typů hydrogelů. Kvůli vysokému obsahu vody jsou hydrogely přirozeně biokompatibilní, z čehož vyplývá i jejich biologická odbouratelnost. Ta se dá také řídit změnou podmínek prostředí např. pH, teplotou nebo elektrickým polem. I přes to všechno se zde však také setkáváme s řadou nevýhod. Nízká pevnost v tahu a biologická degradace mohou být právě nežádoucí v přílišném uvolňování léčiv. Řešením jsou síťovací reakce, o kterých již bylo pojednáno v předchozích odstavcích, jež mají za následek zpevnění struktury gelu. Velmi tuhé gely však mohou vykazovat problematický aplikační potenciál v injekčním podání, a proto vyžadují chirurgickou implantaci. Alchymie v hledání optimálních vlastností je tedy běh na dlouhou trať, díky moderním technologiím se však hydrogely uplatňují stále více v klinické praxi a procesech cílené distribuce [97].

K. Thalberg [98] prohloubil svou studii z roku 1989, když si všiml, že přidáním určitého množství tenzidu k roztoku hyaluronanu dochází k fázové separaci těchto fází. Pro dané série testů byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové a alkyltrimethylamonium bromidy s počtem uhlíků větším než 10. Vzniklé oddělené fáze vykazovaly odlišnosti, kdy vrchní supernatant projevoval viskozitu blízkou vodě, zatímco spodní fáze byla tuhá, vysoce viskózní. Tato gelová fáze je průhledná a izotropní. Solubilizační metodou, při které je barvivo, které je nerozpustné ve vodě, inkorporováno do gelu, byla zjištěna přítomnost micelárních útvarů s hydrofobními doménami. Metoda NMR byla následně použita na objasnění struktury těchto micel. V současnosti se provádí reologická měření na objasnění vztahu mezi složením a viskoelastickými vlastnostmi těchto typů gelů.

Studie italských vědců z roku 2000 se právě zabývá cílenou manipulací ve viskoelastických vlastnostech připravených gelů. Odlišné hydrogely stejného základu lze připravit z hyaluronanu, který je modifikován kvartérními amoniovými skupinami pocházejícími

z diaminu (tzv. *linker*). Modifikace probíhá na karboxylových skupinách hyaluronanu, kdy výběrem různého linkeru lze cíleně měnit vlastnosti vzniklých hydrogelů. Tým ***R. Barbucciho*** [99] došel při zkoumání reologických vlastností těchto gelů k závěru, že všechny modifikované gely vykazovaly lepší viskoelastické vlastnosti než gely nemodifikované, přičemž elastický modul převyšoval ztrátový modul v celé škále měřených frekvencí, což naznačuje právě elastický charakter.

O 2 roky později se stejní autoři rozhodli prozkoumat reologické vlastnosti hyaluronového gelu použitého pro léčbu osteoartrózy. Zde se hyaluronan využívá zejména pro lubrikaci kloubů a zlepšení odpružení při pohybu. Má také částečně protizánětlivý účinek. Zásadní problém je však jeho rychlá degradace v organismu, způsobená enzymatickými nebo hydrolytickými reakcemi. Klinické výsledky poukazují na silnou závislost stálosti gelu na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Autoři však dospěli k závěru, že pokud bude hydrogel podáván intravenózně, jeho reologické chování bude stále vykazovat gelovou strukturu, i přesto, že dojde k poklesu elastického modulu [100].

Také ***P. Bulpip a spol.*** [101] se zaměřili na zlepšení viskoelastických vlastností hyaluronových hydrogelů a zvýšení jejich odolnosti vůči degradaci. Na kostře hyaluronanu esterifikovali karboxylové skupiny, stejně tak jako substituovali nukleofilní skupiny na bočním řetězci. Výsledkem byl chemicky síťovaný hydrogel odolný vůči fragmentaci na jednoduché cukry. Pro slibné použití v hojení ran a tkáňovém inženýrství napovídaly výsledky inkorporace hyaluronanu do buněk, či nadměrné vázání růstových faktorů na jeho skelet.

Podrobnou reologickou studii hydrogelů tvořených hyaluronanem s opačně nabitými tenzidy provedli ***T. Venerová*** a ***M. Pekař*** [102]. Pro tvorbu vzorků použili koncentrace tenzidů vyšší než jejich CMC, konkrétně 50 a 200 mM. Hyaluronan byl použit o nízkých molekulových hmotnostech s počáteční koncentrací 0,5 a 2 %. Všechny systémy vykazovaly viskoelastické vlastnosti s převládajícím elastickým modulem, které mohly být modifikovány v závislosti na koncentraci vstupních komponent a molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Jak napovídá kapitola 3.1, použití micelárního roztoku hyaluronanu vykazuje nadějné výsledky pro cílenou distribuci léčiv. Stejná myšlenka napadla i ***G. Bajaje*** a jeho tým [103], kteří v roce 2012 zkoušeli zapouzdřit PTX do hyaluronového hydrogelu. Jako modelový vzorek byly použity myši s nádorem pobřišnice. Hyaluronový hydrogel dokázal udržet a postupně uvolňovat PTX v místě účinku až 14 dní. Použití klasické chemoterapie pomocí PTX dosahuje udržení tohoto léčiva v místě účinku řádově v minutách až hodinách. Ačkoliv hyaluronový hydrogel nezvyšuje terapeutický účinek PTX, jeho postupné a dlouhotrvající uvolňování je však tou správnou cestou ve výzkumu léčby nádorových onemocnění.

Metodu lyofilizace použili k vytvoření nanoporézních hydrogelů ***Y. Minaberry a spol***. [104]. Do gelu jako aktivní látku inkorporovali gentamicin. Při testech se autoři zaměřili na zkoumání rozpustnosti a agregace gelů. Na závěr také potvrdili výhodu prodlouženého uvolňování aktivní látky z hydrogelu.

Myšlenku použití hyaluronových hydrogelů pro hojení ran realizoval v roce 2015 tým ***O. Catanzana*** [105]. Ten vytvořil ruzné hydrogely kombinací hyaluronanu s alginátem, které se lišily poměrem jednotlivých složek. To mělo za následek rozdílnou kinetiku gelace z hlediska reologické charakterizace. Kromě mechanických vlastností byla stanovena také morfologie a homogenita vzorků. Výsledky ukázaly, že ačkoliv obsah hyaluronanu v gelech zpomalil proces gelace, jeho přítomnost byla žádoucí v případě hojení ran. *In vitro* a *in vivo* testy odhalily, že gely neinterferují s buňkami z hlediska jejich viability, přičemž urychlují

zacelování a hojící proces kožních ran na myších modelech. Autoři studie slibně předpovídají budoucí použití jejich modelových systémů v medicínských aplikacích.

Nadějně vypadají také výsledky ***E. A. Kamouna a spol.*** [106]. Ti vytvořili pH a teplotně citlivý hydrogel kombinací hyaluronanu a poly(N-isopropylakrylamidu). Antibiotikum ampicilin bylo zapouzdřeno do gelu, jakožto aktivní látka. Přídavek hyaluronanu podporuje vyšší obsah vody v gelu a jeho flexibilitu. Zvětšuje také rozsah uvolňování ampicilinu v závislosti na aplikaci do lidského těla a jeho měnící se teplotě v různých místech. Naopak ovšem mírně zhoršuje mechanické vlastnosti gelů. Překvapivě však bylo zjištěno, že tyto gely, v závislosti na obsahu hyaluronanu a ampicilinu, vykazují selektivní antibakteriální citlivost na různé typy bakterií. Teplotně a pH senzitivní uvolňování ampicilinu je v místě účinku poměrně rychlé, proto se dané systémy jeví atraktivně pro budoucí použití.

4 CÍLE PRÁCE

Z rešerše je patrný fakt, že polyelektrolyty mohou reakcí s opačně nabitými tenzidy tvořit gelové fáze. Tyto materiály však byly předmětem jen velmi omezeného zájmu, i přes rozsáhlou literaturu, týkající se problematiky samotných polyelektrolytů či tenzidů.

Příspěvkem k rozšíření tohoto poznání je předložená dizertační práce, jejímž základním cílem je studium vlastností fázově separovaných hydrogelů na bázi hyaluronan-kationtový tenzid, které vznikají elektrostatickou interakcí mezi těmito opačně nabitými látkami. Hyaluronan byl vybrán jakožto zástupce biokompatibilního, záporně nabitého polymeru. Karbethopendeciniumbromid (Septonex) představuje kationtový tenzid, známý díky svým antiseptickým a antimykotickým vlastnostem.

Hlavním pilířem postupu přípravy je, jak vyplývá z literatury, použití koncentrací tenzidu vyšší než jeho kritická micelární koncentrace. Z rešerše je též patrné užití reologického měření pro primární charakteristiku mechanických vlastností hydrogelů. Proto je tato metoda stěžejní i v této práci.

Veškeré experimenty popisují hlavně vliv přípravy, koncentrace komponent či podmínek prostředí na reologické chování vzorků. To je prezentováno provedením amplitudových testů s konstantní frekvencí oscilace a frekvenčních testů s konstantní amplitudou deformace, přičemž k uskutečnění experimentů bylo použito rotačního reometru s geometrií deska-deska.

Mezi vliv přípravy lze zahrnout rozdělení na tzv. *„suchou“* a *„mokrou“* cestu, tedy míchání vstupních komponent v práškové formě nebo v roztoku. Koncentrace vstupních komponent a molekulová hmotnost hyaluronanu jsou též zvažovány. Z předchozích zkušeností na školícím pracovišti je patrné, že právě modulováním výše zmíněného lze dosáhnout gelů o rozdílném množství a mechanických vlastnostech.

Jako standardní prostředí pro přípravu gelů se využívá roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, který simuluje fyziologický roztok. Nicméně již ***K. Thalberg*** [93, 98] zjistil, že pro vznik gelové fáze je právě určité rozmezí iontové síly nutné, kdy nízkomolekulární elektrolyt snižuje nábojové repulze na nabitých skupinách polymerního řetězce, čímž mu umožnuje se více sbalit a zaplést do gelové sítě. Naopak vysoká iontová síla (IS), přesahující určitou kritickou hodnotu, má za následek zánik fázově separované fáze. Jedna ze sady testů byla tedy zaměřena na potvrzení této domněnky a stanovení přesného ohraničení iontové síly pro vznik gelových komplexů v námi vybraném vzorku hyaluronan-Septonex.

V návaznosti bylo provedeno reologické měření pro gely, u kterých je 0,15 M prostředí simulováno jiným typem iontů než běžně používaným NaCl.

Pro zvažování hyaluronových hydrogelů v kosmetických, farmaceutických či medicínských aplikacích je nutno zjistit jejich chování při rozdílném pH a teplotě, zejména pro hodnoty lidského těla. V závislosti na budoucím použití se totiž od gelu může vyžadovat stabilita nebo degradace pro určité podmínky. Proto byla další studie věnována těmto vlivům (pH=3,5; 5; 7; 9 a T=25; 37 °C).

Reologický popis hyaluronových hydrogelů provedený v této práci je esenciální pro pochopení jejich chování za určitých podmínek. Ze zjištěných faktů byly posléze designovány podrobnější studie, zejména analytické zjištění obsahu látek v gelu a supernatantu, bližší charakteristika vnitřní struktury, antibakteriální aktivita či stabilita a schopnost uvolňování aktivních látek, které byly externě provedeny kolegy z Fakulty chemické VUT v Brně, taktéž nasledující projekt GAČR 16-12477S. Práce si klade za cíl alespoň malým dílem přispět k problematice medicínských hydrogelů, která je v současné době rychle se rozvíjející oblastí se širokým potenciálem.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiály

Hyaluronan (Hya)	**LMW Hya** hyaluronan o molekulové hmotnosti 250–450 kDa, M_w = 309 ± 4 kDa (SEC-MALLS, FCH VUT), CPN spol. s.r.o., šarže 230215-E1 **HMW Hya** hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 400–1 600 kDa, M_w = 1 255 ± 90 kDa (SEC-MALLS, FCH VUT), CPN spol. s.r.o., šarže 181214-4-D1
Karbethopendeciniumbromid	CAS: 10567-02-9, GNB chem, a.s., šarže 511SEP003
Chlorid sodný	CAS: 7647-14-5, Penta, šarže 2106210616
Octan sodný trihydrát	CAS: 6131-90-4, Lach:ner
Kyselina octová	CAS: 64-19-7, Lach:ner, šarže PP/2018/08867
Dihydrogenfosforečnan draselný	CAS: 7778-77-0, Penta, šarže 1805180516
Hydroxid sodný	CAS: 1310-73-2, Penta, šarže 1905160514
Kyselina chlorovodíková	CAS: 7647-01-0, Lach:ner, šarže PP/2014/05946
Tetraboritan sodný dekahydrát	CAS: 1303-96-4, Lachema a.s., šarže 206270379
Chlorid vápenatý	CAS: 10043-52-4, Lachema a.s., šarže 2-22-24-46
Chlorid hořečnatý hexahydrát	CAS: 7791-18-6, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže 051M0158V
Chlorid železitý	CAS: 7705-08-0, Lach:ner, šarže PP/2007/02970/0
Kyselina pikrová	CAS: 88-89-1, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže STBH1964
Chloroform	CAS: 67-66-3, Penta, šarže 2107210716
Voda	Deionizovaná voda Miliphore; Purelab: ELGA

5.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků hydrogelů

5.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl

Rozpuštěním přesné navážky v deionizované vodě byl připraven roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, což představuje fyziologický roztok. Pro další použití byl roztok NaCl dále uchováván

při laboratorní teplotě. Pro případ zkoumání vlivu iontové síly na reologické vlastnosti hydrogelů (kapitola 6.1.3) byly obdobným způsobem připraveny zásobní roztoky prostředí NaCl o požadované iontové síle 0,05–1 M.

5.2.2 Příprava zásobních roztoků pufrů

Rozpuštěním potřebných navážek v deionizované vodě byly připraveny pufry se složením, popsaným v **tabulce 3**, a to na výslednou iontovou sílu 0,15 M. Dané pufry pak byly použity jako roztok prostředí pro míchání gelů mokrou cestou, obdobně jako ve standardním případě roztok NaCl (viz kapitola 6.1.5). Pro další použití byly roztoky uchovávány při laboratorní teplotě.

Tab. 3: Přehled složení pufrů

Rozsah pH	Použité chemikálie	Název pufru
3,5–5,5	$CH_3COONa \cdot 3\ H_2O$; CH_3COOH	Acetátový pufr
6–7,5	KH_2PO_4; NaOH	Fosfátový pufr
8–9	HCl; $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	Borátový pufr
9,5–11	NaOH; $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	Borátový pufr

5.2.3 Příprava zásobních roztoků rozdílného iontového složení

Pro potřeby zkoumání vlivu přídavku vícemocných iontů na reologické vlastnosti gelů (kapitola 6.1.6) byly, obdobně jako roztoky pufrů, připraveny zásobní roztoky rozdílného iontového složení. Přesná navážka $CaCl_2$, $MgCl_2.6H_2O$ či $FeCl_3$ byla rozpuštěna v deionizované vodě na požadovanou koncentraci 0,15 M. Dané roztoky pak byly použity pro míchání gelů mokrou cestou, místo standardního roztoku NaCl. Pro další použití byly roztoky uchovávány při laboratorní teplotě.

5.2.4 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Přesná navážka hyaluronanu byla smíchána s přibližně ¾ požadovaného objemu 0,15 M NaCl. Po úplném rozpuštění na magnetické míchačce (cca 8–12 hod.) byl přesný objem upraven pomocí odměrných baněk na požadovaný výsledný objem a roztok byl opět ponechán na magnetické míchačce po dobu nejméně 12 hodin.

Pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 2 % hm. Roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

5.2.5 Příprava zásobního roztoku Septonexu

Přesná navážka Septonexu byla smíchána s potřebným množstvím 0,15 M NaCl a roztok byl uložen na magnetickou míchačku na 24 hodin. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 200 mM, 100 mM a 50 mM, které byly dále uchovávány při laboratorní teplotě.

5.2.6 Příprava vzorků hydrogelů

Pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu byla, smícháním zásobních roztoků Hya a Septonexu, připravena trojice gelů dle následujícího schématu.

Tab. 4: Přehled složení základní šestice vzorků

Název vzorku	Hyaluronan [% hm.]	Septonex [c]	Poměr nábojů
H_1	2 % HMW	200 mM	4
H_2	2 % HMW	100 mM	2
H_3	2 % HMW	50 mM	1
H_4	2 % LMW	200 mM	4
H_5	2 % LMW	100 mM	2
H_6	2 % LMW	50 mM	1

Teorický poměr nábojů byl spočítán z předpokladu existence jedné nábojové skupiny na každé molekule tenzidu a jednoho náboje na dimerovou jednotku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 401,299 $g.mol^{-1}$.

Fyzikálně síťované hydrogely vzniklé fázovou separací při interakci hyaluronan-Septonex byly pro tuto práci připraveny čtyřmi metodami. Suchá cesta[1] míchání práškových vzorků, které byly následně ponechány k relaxaci stáním, byla označena jako **příprava č. 1**, mokrá cesta míchání zásobních roztoků s následným stáním vzorku je značena jako **příprava č. 2**, obdobně suchá a mokrá cesta s odstředěním vzorků jsou označeny jako **příprava č. 3**, resp. **č. 4**.

Podrobnější popis daných metod příprav je zmíněn v následujících podkapitolách.

5.2.6.1 Metoda přípravy hydrogelů č. 1 – suchá cesta, stání

Příprava vzorků hydrogelů s následným stáním probíhala ve skleněných vialkách. Metoda spočívá ve smíchání přesných navážek hyaluronanu a tenzidu, které byly následně ve vialkách homogenizovány pomocí tření špachtlí. K homogenizovanému prášku z daných komponent byl posléze přilit přesný objem 0,15 M NaCl, standardně 6 ml. Výsledný roztok byl několik sekund vortexován a ponechán 24 hodin v klidu. Během této doby došlo k oddělení gelové fáze.

Jelikož se při přípravě mokrou cestu míchají zásobní roztoky v poměru 1:1, tak je pro zachování stejných koncentrací komponent ve vzniklém gelu potřeba spočítat navážky na suchou cestu pro polovinu výsledného objemu, v tomto případě 2 % Hya, resp. 200 mM, 100 mM či 50 mM Septonex v objemu 3 ml.

5.2.6.2 Metoda přípravy hydrogelů č. 2 – mokrá cesta, stání

Fázová separace gelů touto metodou probíhala ve skleněných vialkách, v nichž byly smíchány zásobní roztoky Hya a Septonexu v poměru 1:1. Standardně připravovaný výsledný objem vzniklého roztoku byl 6 ml. Ten je posléze vortexován a ponechán 24 hodin v klidu k oddělení gelové fáze.

5.2.6.3 Metoda přípravy hydrogelů č. 3 – suchá cesta, odstředění

Postup přípravy je téměř shodný s metodou č. 1., avšak míchání vzorků probíhalo ve skleněných centrifugačních zkumavkách. Po homogenizaci a vortexování roztoku byl tento odstřeďován po dobu 15 min a 3 500 ot/min na rotační centrifuze ROTOFIX 32 Hettich Zentrifugen.

5.2.6.4 Metoda přípravy hydrogelů č. 4 – mokrá cesta, odstředění

Metoda je obdobná s postupem č. 2, kdy jsou do centrifugačních zkumavek smíchány zásobní roztoky vstupních komponent v poměru 1:1. Vzniklý roztok je poté homogenizován

[1] Venerová, T., Mravec, F., Pekař, M., Simulescu, V.: *Způsob přípravy fyzikálně síťovaného hydrogelu s alespoň jednou solubilizovanou hydrofobní sloučeninou*. Patent č. 308595 B6. 2020-11-12.

promícháním špachtlí, vortexován několik desítek sekund, a poté odstředěn opět při 3 500 ot/min po dobu 15 min.

5.2.7 Příprava zásobního roztoku kyseliny pikrové

Pro použití Mahrousovy metody (viz dále) byl připraven zásobní roztok analytického činidla v podobě 0,01 % kyseliny pikrové. Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství, přičemž toto nesmělo přesahovat 0,03 g na 100 ml zásobního roztoku. Výsledná navážka byla zalita chloroformem. Homogenizovaný roztok byl pro další použití uchováván při laboratorní teplotě.

Jelikož se jedná o potenciálně výbušnou látku, je třeba kyselinu pikrovou uchovávat pod vodou (v práškové formě). Navážka proto musí být nabírána z nejspodnější části láhve, aby byla odebrána požadovaná kyselina a ne její směs s vodou. Samozřejmostí je používání ochranných pomůcek – brýle, rukavice.

5.3 Metody měření a standardní vyhodnocení dat

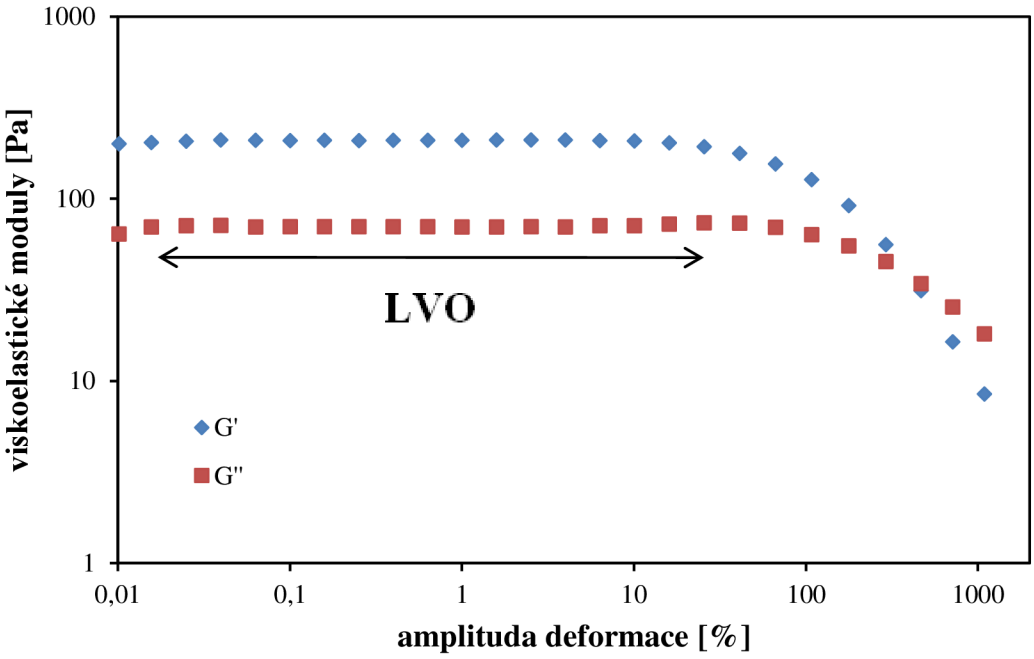
5.3.1 Reologie – oscilační testy

Veškerá reologická měření gelových vzorků byla provedena na rotačním reometru DISCOVERY HR2 od firmy TA Instruments při teplotě 25 °C či 37 °C, jež byla temperována před každým měřením, přičemž byla použita geometrie typu deska-deska s průměrem horní rotační ocelové desky 20 mm (viz **obr. 18**). Software TRIOS umožňuje nastavení jednotlivých parametrů. Před každým měřením byl zaveden krok relaxace vzorku tzv. *„conditioning step“*, kdy po sjetí senzoru do měřící polohy (standardně je vzdálenost horní a spodní měřící desky 100 μm) je vzorek ponechán k relaxaci po dobu 5 min při požadované teplotě měření.

Pro všechny typy vzorků byl nejprve proveden deformační test tzv. *„strain sweep test“*, jehož výsledkem je závislost viskoelastických modulů na měnící se amplitudě deformace při konstantní hodnotě frekvence oscilací, která byla nastavena na 10 rad/s. Rozsah amplitudy deformace se v průběhu měření měnil v rozmezí 0,01–1 000 %. Výsledkem těchto testů je nalezení optimální hodnoty amplitudy deformace, která je poté použita do dalších typů měření. Tato hodnota leží v tzv. lineární viskoelastické oblasti (LVO), která je zakončena těsně před protnutím obou modulů, tzv. *cross pointem*. Po překročení takové amplitudy deformace nastává nevratné porušení uzlů gelu, který již poté není schopen nabýt své původní struktury. Poloha viskoelastických modulů vůči sobě ve strain sweep testu je také nositelem informace o tom, které chování u dané látky převažuje, jestli tedy vykazuje charakter jako elastické těleso či viskózní kapalina. V případě vyšších hodnot elastického (*paměťového*) modulu G', vykazuje látka chování podobné tuhému tělesu, v opačném případě, při převážení viskozitního (*ztrátového*) modulu G" se látka chová spíše jako kapalina. Gely lze také porovnat z hlediska rozsahu LVO, kdy ten, jehož bod překřížení obou modulů je posunut k vyšším hodnotám amplitudy deformace, dosahuje lepších mechanických vlastností, co se týče rigidity struktury gelu. Typický průběh závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace je uveden na **obr. 20**. V tomto konkrétním případě převyšuje elastický modul nad viskozitním a daná viskoelastická látka vykazuje převahu elastického chování.

Druhý typ testů reologického měření se nazývá frekvenční test s konstantní hodnotou amplitudy deformace, tzv. *„frequency sweep test“*. Daná hodnota deformace byla vybrána z předchozích testů tak, aby náležela do LVO. U všech vzorků byla použita její hodnota 1 %. Rozsah měnících se frekvencí byl nastaven v rozmezí 0,01–20 Hz. Výsledky poté ukazují závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilace. Zde je též možno usuzovat

mechanické vlastnosti gelů s ohledem na bod překřížení modulů, liší se pouze doba působení síly o stejné velikosti. Rozdílné hodnoty intenzit modulů (v grafech ve smyslu pohybu po ose *y*) vypovídají o mechanických vlastnostech gelu jako celku. Dle rovnice (13) byly také vypočítány ztrátové úhly δ, jejichž porovnání je přehlednější v případě většího množství vzorků, jelikož jsou oba viskoelastické moduly sloučeny v jednu křivku.



Obr. 20: Typický průběh viskoelastických modulů v deformačním testu, šipkou je znázorněna LVO

5.3.2 Reologie – tokové testy

Tokové testy sledují závislost viskozity vzorku na smykové rychlosti. Měřící geometrie, temperace i relaxace vzorků jsou obdobné jako v předchozích měřeních. Liší se pouze nastavení parametrů v módu pro měření tokových křivek. Smyková rychlost byla zadána v rozmezí 0,02–200 s^{-1}, kdy v tomto rozsahu přístroj provádí 21 skenů při pěti bodech na dekádu. Jeden sken trvá maximálně 60 sekund, kdy nesmí odchylka viskozit tří opakujících se bodů měření jednoho skenu přesáhnout 5 %. Vyšší smykové rychlosti nejsou vhodné pro daný typ vzorků, zejména v geometrii deska-deska, kdy toto zapříčiňuje vylétávání vzorku z měřící aparatury. Tokové křivky podávají informaci zejména o newtonském či nenewtonském chování látek.

Veškerá data z reologických měření byla exportována do MS Excel, kde byly spočítány potřebné výsledky a hodnoty vyneseny do grafů. Pro lepší prezentaci dat jsou u všech grafů reologických měření použita logaritmická měřítka u obou os. Výledky byly poté diskutovány z hlediska porovnání viskoelastických a tokových vlastností daných hydrogelů.

Každý vzorek byl změřen všemi druhy testů minimálně dvakrát, dokud nenastala shoda mezi výslednými křivkami ze dvou měření.

5.3.3 Infračervená spektroskopie

Měření vzorků hydrogelů pomocí infračervené spektroskopie bylo provedeno kolegy z pracoviště Fakulty chemické VUT v Brně, kteří se taktéž podíleli na projektu č. 16-12477S.

Proto budou ve výsledkové části výsledné výstupy, ve formě grafických závislostí, prezentovány v originální podobě tak, jak byly poskytnuty.

Mnozí autoři se zabývali použitím infračervé spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) s technikou ATR (attenuated total reflectance – *„zeslabená úplná reflektance“*), jakožto levné a přístupné metody pro zkoumání vnitřní struktury a konformačních vlastností polysacharidů, včetně hyaluronanu. Měření proběhlo jak pro práškové vzorky, tak vodné roztoky. U druhých zmíněných se zakládá na faktu silné hydratace daných látek. Tudíž je možno zkoumat první typický pás absorbancí vodíkových vazeb či O–H skupin pro vlnočty 3 800–3 100 cm^{-1}. Další z důležitých parametrů pro hyaluronové vzorky je vlnočet 2 922 cm^{-1}, reprezentující přítomnost alifatického řetězce, tedy vazby C–H. Intenzivní pás absorbance v oblasti mezi 1 700 a 1 500 cm^{-1} je charakteristický pro amidové skupiny. Ty jsou následovány oblastí karboxylových skupin, nacházejících se při vlnočtu přibližne 1 400 cm^{-1}. Vlnočet 1 377 cm^{-1} je typický pro hyaluronové vzorky, kde prezentuje deformační vibraci methylových skupin. Esterové funkční skupiny vykazují vibraci svých vazeb v oblasti mezi 1 240 a 1 150 cm^{-1}. Oblast otisku prstu se pro hyaluronan vyskytuje mezi vlnočty 1 100–900 cm^{-1}, přičemž je reprezentována píkem pro alkoholovou vazbu C–O. Dané píky byly proto také vybrány pro kvantitativní analýzu (viz kapitola 6.2.1) [107, 108].

Veškerá měření infračervené spektroskopie s ATR technikou byla realizována na spektrofotometru Nicolet *i*S50 od firmy Thermo Fisher Scientific, a to při laboratorní teplotě 25 °C, zajišťované klimatizovanou místností. Experimenty byly realizovány pro kapalné vzorky, které byly nanášeny v malých množstvích, přibližně 200 µl, na diamantový ATR krystal. Měřené spektrum bylo stanoveno rozsahem 4 000–400 cm^{-1}, s rozlišením 4 cm^{-1}, při průměrném počtu 128 skenů. Spektrum čistého suchého ATR krystalu bylo použito jako vzorek pozadí. Veškerá data byla zpracována v softwaru OMNIC 9.0.

Pro podrobení infračervené spektroskopii byly studovány supernatanty daných gelů. Pro analytické stanovení je jasné, že dané supernatanty mohou obsahovat nějaké množství z původního hyaluronanu či Septonexu. Pro kvantitativní stanovení byla tedy sestavena kalibrační sada vzorků. Pro zachování dobré rozpustnosti byly připraveny vzorky HMW Hya v 0,15 M NaCl o koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 a 0,25 % hm. a vzorky LMW Hya o koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 a 0,75 % hm. Výsledné píky pro stanovení obsahu zbytkového Hya v supernatantu byly vybrány z oblasti otisku prstu (1 100–900 cm^{-1}). Stejným způsobem byly proměřeny Septonexové vzorky, jejichž vyhodnocující pík se nachází v oblasti vlnočtu 1 737 cm^{-1}, odpovídající vibraci skupiny nasyceného esteru. Kalibrační řada obsahovala koncentrace 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30 a 35 mM. Všechna důležitá množství látek byla v průběhu přípravy nebo po vytvoření gelů zvážena.

Celá sada vzorků byla proměřena třikrát, přičemž prezentované výsledky jsou aritmetickým průměrem naměřených dat. Vzorek H_1 byl posléze změřen ještě pětkrát pro potvrzení opakovatelnosti.

5.3.4 Modifikovaná Mahrousova metoda

Tato metoda se používá pro stanovení neznámé koncentrace tenzidu v roztoku pomocí vytvoření jeho komplexu s kyselinou pikrovou. Po předchozí zkušenosti s touto metodou na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně, zejména při použití s tenzidem CTAB, byla tato metoda zopakována pro potvzení funkčnosti na strukturně podobný tenzid Septonex, a to pětinásobným opakováním u vzorku gelu H_1. Výsledná data pak byla porovnána s výsledky infračervené spektroskopie.

Pro tvorbu barevného komplexu byly ve zkumavce smíchány roztoky Septonexu a 0,01 % kyseliny pikrové v poměru 1:2, standardně 3 a 6 ml. Směs byla poté, v uzavřené zkumavce, intenzivně třepána po dobu 1 min. Následně se zkumavka ponechala 2 min v klidu, pro optimální rozdělení fází. Horní, vodná fáze systému, byla pomocí pipety odebrána, zatímco spodní chloroformová fáze byla přefiltrována přes filtrační papír za normálního tlaku, přičemž první 1–2 ml filtrátu byly odebrány do odpadu. Zbylý roztok byl ihned uzavřen do vialky, aby nedocházelo k odpařování chloroformu. Takto připravený vzorek byl proměřen na UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H v rozsahu vlnových délek 300–700 nm. Jako pozadí byl použit čistý chloroform. Detekční vlnová délka pro další výpočty byla zvolena hodnota 415,5 nm [109].

Pro stanovení neznámého obsahu Septonexu v roztoku supernatantu byla nejprve připravena kalibrační sada vzorků tohoto tenzidu o koncentracích 0,01; 0,04; 0,07; 0,1; 0,15 a 0,3 mM. Měření probíhalo postupem popsaným výše, přičemž opět byla důležitá množství komponent hydrogelů vážena jako v předchozí instrumentální metodě. Pro stanovení neznámé koncentrace Septonexu v supernatantu byl tento zředěn 50krát a následně změřen stejným postupem. Pomocí kalibrační závislosti byl poté v programu MS Excel stanoven neznámý obsah tenzidu v supernatantu. Vzorky kalibrační závislosti byly standardně proměřeny třikrát, přičemž výsledky jsou aritmetickým průměrem daných hodnot. Samotný vzorek H_1 byl proměřen pětkrát.

5.3.5 Stanovení anorganických iontů

K uzavření analytické části byly vybrány metody na stanovení iontů. Jednalo se o prvotní experimenty na těchto typech vzorků hydrogelů, proto bylo zajímavé zkusit, zdali se těmito přiblížíme korelaci dat předchozích dvou metod. Kapitola 6.2.3 pak prezentuje překvapivě uspokojivou shodu.

Veškerá měření opět proběhla ve spolupráci s kolegy z Fakulty chemické VUT v Brně, zainteresovaných na projektu č. 16-12477S. Proto jsou případné grafické výstupy prezentovány v originální podobě.

Při studiu zkoumaných hydrogelů na bázi hyaluronanu a Septonexu můžeme uvažovat tři druhy iontů, které mohou být významné pro detekci a analýzu. První a nejjednodušší příklad jsou bromidy, které budou přímo úměrné obsahu Septonexu, jelikož jiný vstupní komponent atomy bromu neobsahuje. Chloridové anionty budou odpovídat přítomnosti rozpouštědla, tedy fyziologického roztoku 0,15 M NaCl. Posledním detekovaným iontem byl sodíkový kationt. Ten se ovšem vyskytuje jak v roztoku prostředí NaCl, tak jako součást polymeru, který vystupuje ve formě soli hyaluronanu sodného. Proto není možné brát obsah Na^+ iontů jako směrodatný při určování obsahu NaCl a jeho případném rozložení mezi gel a supernatant.

Pro poslední jmenovaný, tedy kationt sodíku, byla k detekci vybrána *optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem* (ICP-OES), která se používá pro stanovení široké škály hlavních, vedlejších i stopových prvků. Principem této metody je přenesení vzorku do plazmového zdroje ve formě aerosolu, jehož je dosaženo pomocí zmlžovače. Plazma je nejčastěji generováno vzácnými plyny (helium, argon) a je iniciováno v hlavici vysokofrekvenčním jiskrovým výbojem. Při teplotě několik tisíc Kelvinů zde dochází k odpaření vzorku při současném zániku chemických vazeb. Jednotlivé prvky jsou atomizovány a následuje excitace jejich elektronů do vyšších energetických hladin. Tento stav je ovšem velmi nestabilní, proto následně dochází k jejich návratu zpět na základní energetickou hladinu, přičemž může dojít k emisi elektromagnetického záření ve formě fotonu. Tyto fotony mají přesně definovanou vlnovou délku, která projde přes monochromátor, většinou typu difrakční

mřížky, a je detekována na detektoru, nejčastěji fotonásobiči. Tato vlnová délka, jež je dána právě rozdílem energie obou hladin, je typická pro každý prvek. V případě námi detekovaného sodíku se jedná o vlnovou délku 588,995 nm [110, 111].

Příprava vzorků hydrogelů byla realizována podle návodu v kapitole 5.2.6, přičemž pro měření byly použity pouze supernatanty, které byly, 50, 100 nebo 250krát, naředěny deionizovanou vodou. Výsledné naředěné roztoky byly ještě přefiltrovány přes 45 µl filtr. Každý vzorek byl proměřen minimálně třikrát, a to při použití různých ředění a v sadách připravených v různém čase v průběhu několika let.

Veškerá měření ICP-OES probíhala na přístroji Horiba Jobin Yvon, typ Ultima 2. Jako plazmový plyn byl použit argon a jako detektor fotonásobič. Výsledné reporty byly zpracovány v MS Excel. Podmínky prvkové analýzy jsou stanoveny v **tabulce 5**.

Tab. 5: Podmínky prvkové analýzy

Přístroj	ICP-OES model Ultima 2 (Horiba Jobin Yvon)
Výkon	1 200–1 400 W
Otáčky pumpy	15–18 ot/min
Prutok plazmového plynu	14 l/min
Průtok stínícího plynu	0,8–0,5 l/min
Tlak zmlžovače	3 bary

V případě stanovení chloridových a bromidových iontů byla použita metoda *iontové chromatografie* (IC). Iontová chromatografie je typ vysokoúčinné kapalinové chromatografie, založená na probíhajících elektrostatických interakcích mezi hydratovanými ionty v roztoku a opačně nabitými funkčními skupinami iontoměničů nebo stacionární fází, které jsou pevně umístěny v koloně. Podle náboje se iontová chromatografie rozlišuje na aniontovou a kationtovou, a iontoměniče se poté dělí na katexy a anexy, dle jejich navázané funkční skupiny. Katexy jsou záporně nabité kyseliny uvolňující kationty, anexy jsou naopak kladně nabité báze uvolňující anionty. Základem iontoměničů je vlastní vázaný iont a protiiont, který se během prostupu kolonou vyměňuje za jiný iont. Velikost náboje analytu a funkční skupiny určuje sílu interakce, kdy při zvyšující se koncentraci iontů v mobilní fázi jsou tyto eluovány z kolony podle rostoucí afinity ke stacionární fázi. Vliv na retenční časy má tedy pH a iontová síla. Jako stacionární fáze mohou být použity různé typy iontoměničů, např. pórovitý nosič iontoměniče, organická matrice či silikagel. Pro stanovení aniontů se jako mobilní fáze nejčastěji používá roztok shodný s protiionty na iontoměniči, soli kyselin nebo hydroxidy (hydroxid sodný, uhličitan sodný atd.). Pro stanovení kationtů se jako mobilní fáze využívají zředěné organické i anorganické kyseliny. Samotná instrumentace, kromě kolony, obsahuje také čerpadlo mobilní fáze, dávkovací zařízení, které nastříkne vzorek do mobilní fáze, detektor různého typu (spektrofotometrický, fluorescenční, voltametrický, hmotnostní) a vyhodnocovací software [112, 113].

Příprava vzorků a měření probíhaly podobně jako u ICP-OES. Pro měření byly vyhrazeny supernatanty hydrogelů celé základní šestice, tedy vzorky H_1–H_6. Ty byly 50krát nebo 100krát naředěny deionizovanou vodou a opět přefiltrovány přes 45 µl filtr. Každý vzorek byl opět měřen několikrát v průběhu více let, minimálně však třikrát v jedné sadě pro posouzení reprodukovatelnosti. Měření probíhalo na přístroji Metrohm 850 Professional Ion Chromatograph, přičemž parametry měření jsou uvedeny v **tabulce 6**. Výsledné chromatogramy byly zpracovány pomocí MS Excel.

Tab. 6: Parametry iontového chromatografu

Přístroj	Metrohm 850 Professional Ion Chromatograph
Detekce	Vodivostní detektor
Kolona	Metrosep A Supp 7 – 250/4.0
Nástřik	20 µl
Průtok	0,8 ml/min
Teplota	45 °C
Mobilní fáze	3,6 mmol/l Na_2CO_3
Supresní roztok	100 mmol/l H_2SO_4

5.3.6 Antimikrobiální testy

Posledním zkoumaným odvětvím pro tuto práci bylo stanovení antimikrobiální aktivity našich hydrogelů. Provedení daných testů vyplývá již ze samotného složení gelů, kdy jeden z komponentů, tenzidová složka Septonex, je znám pro své antiseptické a dezinfekční účinky. Jeho přebytek v míchané substanci a následně v systému gel-supernatant (viz **tabulka 4**) napovídá, že by se po homogenizaci a dosažení rovnováhy v systému mohly přebytečné, potenciálně stericky vázané, micely Septonexu z gelu uvolnit do prostředí. Ideálně by tak v případě medicínských aplikací mohly gely sloužit i jako prostředky mokrého hojení, kdy micely tenzidu by na postižené místo mohly doručit potřebné léčivo, inkorporované v nich, a zároveň by dezinfikovaly okolní prostředí. Samotný, tělu vlastní hyaluronan, by podporoval proces hojení.

Antimikrobiální testy hydrogelů byly provedeny ve spolupráci s kolegy z pracoviště Fakulty chemické VUT v Brně, kteří se taktéž podíleli na projektu č. 16-12477S. Pro samotné měření byly použity gely, připravené standardně podle návodu, popsaném v kapitole 5.2.6, a také samotné vstupní komponenty, tedy roztoky hyaluronanu a Septonexu, připravené dle kapitol 5.2.4 a 5.2.5. Antimikrobiální aktivita byla testována vůči dvěma druhům bakteriálních kmenů a jednomu kmeni kvasinek. Z bakteriálních kmenů byl použit grampozitivní zástupce – *Micrococcus luteus* (ML) a zástupce gramnegativních kmenů – *Serratia marcescens* (SM). Z kvasinkových kmenů byl použit kmen *Candida glabrata* (CG). Všechny mikrobiální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně a následně kultivovány při 37 °C.

Antimikrobiální aktivita vzorků, které jsou schopny inhibovat růst určitých mikroorganismů, byla testována pomocí dvou druhů metod. ***Agarová difúzní metoda*** byla provedena ve dvou typech, a to jako *diskový difúzní test* pro gelové vzorky a *jamkový difúzní test* pro kapalné vzorky. Princip spočívá v naočkování agarového média v Petriho misce daným typem mikroorganismu, a to 100 µl mikrobiální kultury, která byla předtím 24 hodin kultivována. Následuje aplikace 50 µl studovaného vzorku, který je do média vpravován difúzí. Stejný objem deionizované vody je použit jako kontrolní vzorek. Agarové plotny jsou poté inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Mikrobiální inhibice je stanovena pomocí změření průměru inhibičních zón (v mm) okolo každého disku nebo jamky. Všechny experimenty byly zopakovány třikrát, kdy výsledky jsou poté průměry daných hodnot. Druhá použitá metoda byla ***bujónová diluční metoda***. Její princip spočívá v nanesení mikrobiální kultury, v našem případě 150 µl, do mikrotitračních destiček, následováno nanesením antimikrobiálního vzorku (50 µl), a to v klesající koncentrační řadě. Jako kontrolní vzorek opět slouží deionizovaná voda. Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C se hledá nejnižší koncentrace, schopná inhibovat růst mikroorganismů. K vyhodnocení je možno měřením absorbance sledovat vznik zákalu, který poukazuje na růst mikroorganismů. Pro potřebu klesající koncentrace u vzorků gelů byla

zvolena metoda jejich promývání. Ta spočívá v tom, že po fázové separaci a vzniku gelu je odlit jeho supernatant a gel je doplněn stejným množstvím deionizované vody. Poté je gel rozrušen špachtlí a následně vortexován a ponechán k relaxaci po dobu 24 hodin, stejně jako v procesu standardní přípravy. Tímto způsobem lze simulovat další uvolňování stericky vázaných micel z gelu, a tedy snižování jeho antimikrobiální aktivity.

Finální výsledky z této metody jsou klasicky prezentovány jako **minimální inhibiční koncentrace** (MIC), která je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiálního vzorku schopná zabránit růstu mikroorganismů v určitém inkubačním čase [114, 115].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola podrobně popisuje získané výsledky z měření vlastností i chování hydrogelů na bázi hyaluronan-tenzid. Závěry měření jsou rozděleny do jednotlivých kapitol dle již popsaných použitých instrumentálních metod.

Podkapitoly jsou rozděleny na reologickou část, analytickou část a antimikrobiální testy. V první ze jmenovaných, která zaujímá stěžejní pozici v této práci, jsou zhodnoceny základní viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů. Metody přípravy a použití odlišných komponent pro složení gelů jsou diskutovány s ohledem na mechanické a tokové vlastnosti daných gelů. Vliv prostředí pro vznik gelů, zejména rozdílná iontová síla, pH či přítomnost jiných iontů v roztoku, tvoří nezanedbatelnou část následující kapitoly.

V analytické části je prezentována snaha stanovení přesného složení hydrogelů, kdy je z výše patrného jasné, že při přípravě známe jen koncentrace vstupních komponent. Modifikovaná Mahrousova metoda byla, na základě předchozí zkušenosti, použita pro stanovení koncentrace tenzidu v roztoku supernatantu nad hydrogelem. S pomocí pracovníků, podílejících se taktéž na projektu č. 16-12477S, byly supernatanty gelů podrobeny měření infračervených spekter, ICP-OES či iontové chromatografii.

Na závěr byla u hydrogelů stanovena antibakteriální aktivita, taktéž ve spolupráci s biotechnologickým oddělením Fakulty chemické VUT v Brně.

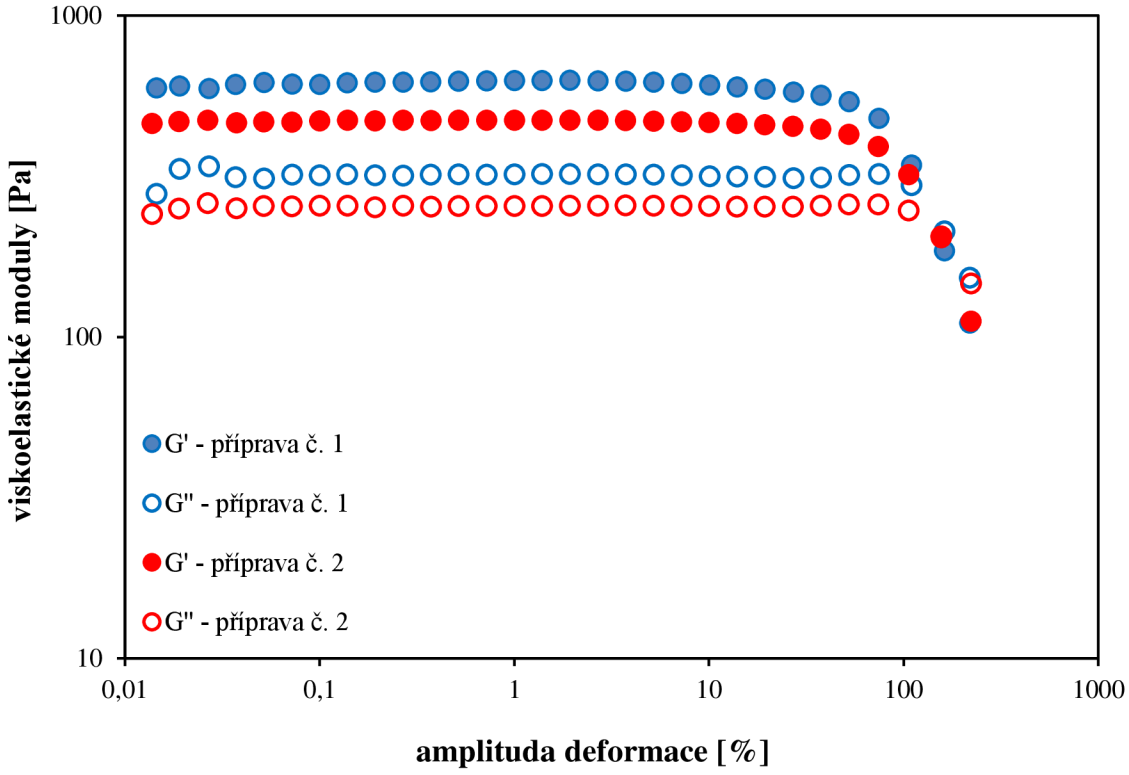
6.1 Reologická část

Následující kapitola shrnuje poznatky z měření reologického chování základní šestice hydrogelů na bázi Hya-tenzid, jejichž složení je popsáno v **tabulce 4**. Pro základní charakteristiku hydrogelů a popis vlastností pro diskuzi aplikačního potenciálu je právě reologie stěžejní metodou. V rámci této práce byly vybrány dva typy měření, a to oscilační (*deformační* a *frekvenční*) a tokové testy. Příprava vzorku, nastavení měřicího systému i vyhodnocení dat bylo podrobně diskutováno v kapitolách 5.3.1 a 5.3.2. Následující podkapitoly prezentují typy nastavení reologických experimentů, jimž byla základní šestice gelů vystavena. Reologická data jsou také součástí publikace, která je obsažena v příloze (viz kapitola 12) [116].

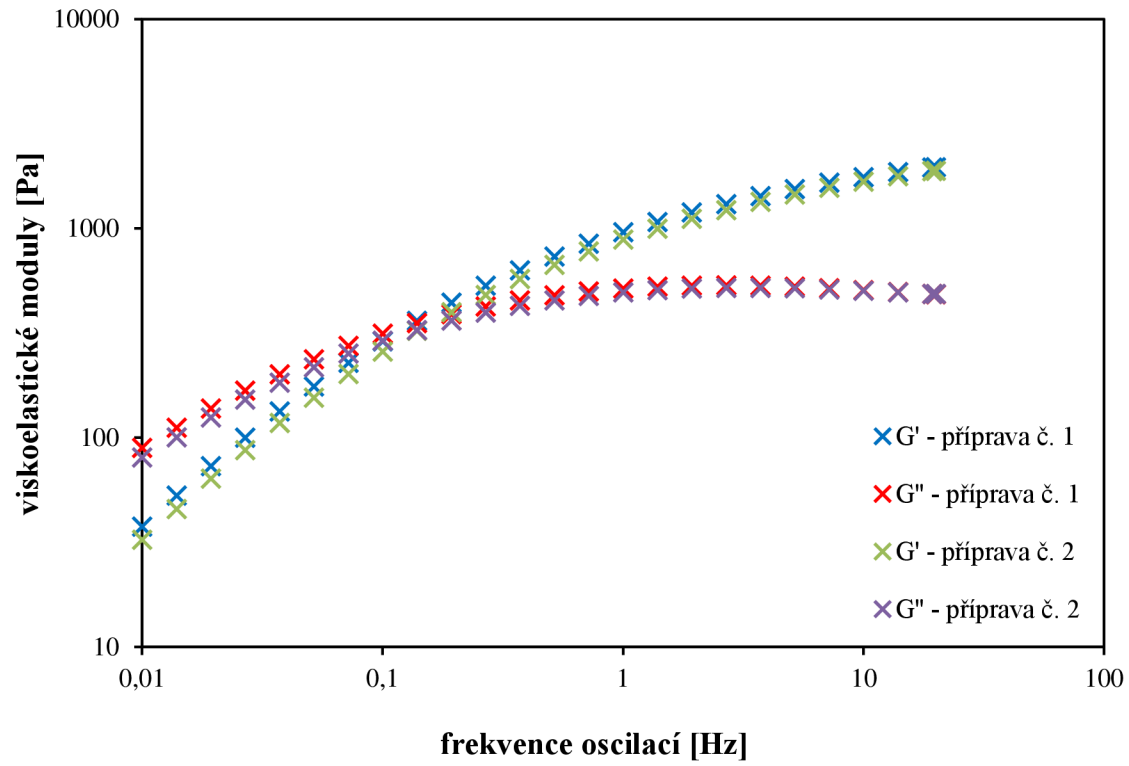
6.1.1 Vliv metody přípravy

Pro přípravu základní šestice hydrogelů byly použity čtyři metody přípravy popsané v kapitole 5.2.6. Dle předchozí zkušenosti se, v případě Septonexu, očekávalo jeho možné použití v kombinaci s jakýmkoliv typem metody přípravy. Oproti jiným, strukturně podobným tenzidům, jako např. CTAB, CTAC či CTAT, vykazuje Septonex mnohem jemnější práškovou formu, schopnou se homogenizovat i při použití metody suché cesty. V případě výše jmenovaných obdobných typů toto činilo problém. Provedená reologická měření daný fakt potvrzují.

Jako první byly porovnány metody **příprav č. 1** a **2**, čili *suchá* a *mokrá* cesta, kdy jsou vzorky připraveny smícháním práškových forem s následným zalitím roztokem prostředí nebo smícháním již hotových zásobních roztoků komponent. Ukázalo se, že obě metody poskytují vzorky s velmi podobnými reologickými vlastnostmi, a to u všech zkoumaných gelů. Na **obr. 21** je zobrazeno dané srovnání pro ukázkový vzorek H_1. V případě deformačního testu je patrné dosažení „rovnováhy“ při vytvoření gelové sítě, která následně odolává vložené deformaci, pro daný vzorek poměrně vysoké. Následuje překřížení obou modulů, kdy se gelová síť hroutí a nastává oblast nevratné deformace. Všechny zkoumané vzorky vykazovaly obdobné chování, přičemž polohy jejich vzájemných modulů, převyšování jednoho nad druhým či délka LVO bude předmětem další kapitoly.



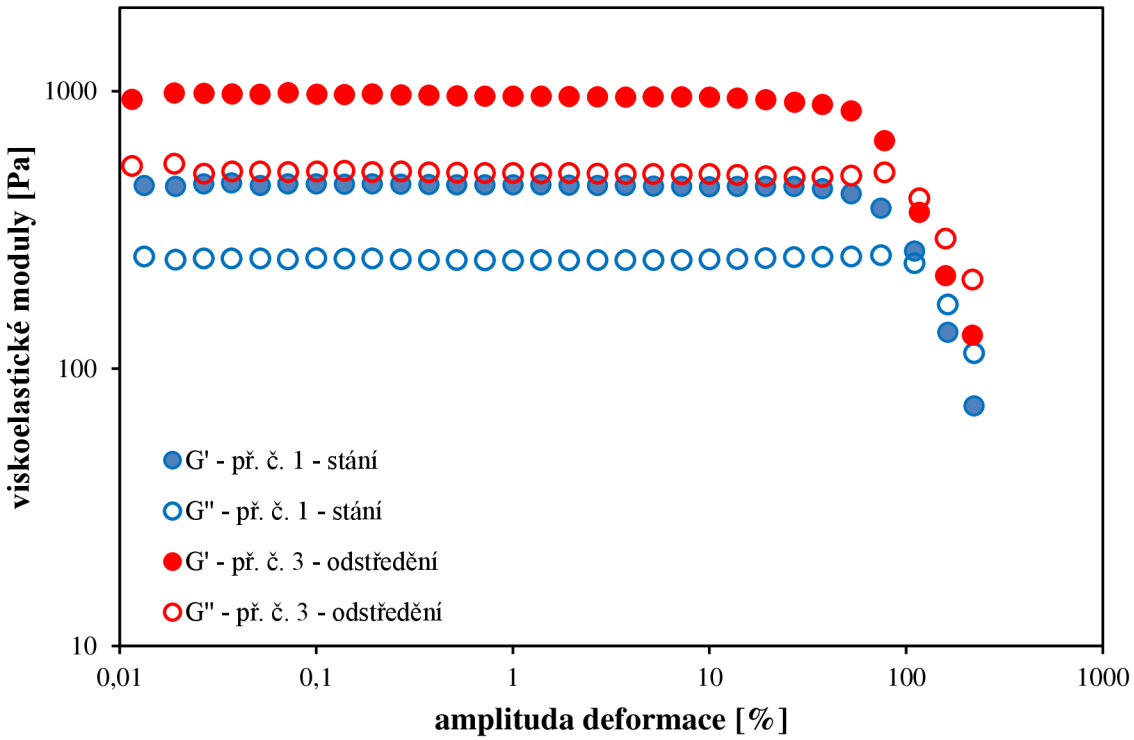
Obr. 21: Srovnání mechanických vlastností vzorku H_1 pro suchou a mokrou metodu přípravy



Obr. 22: Srovnání závislostí viskoelastických modulů na frekvenci oscilací vzorku H_1 pro suchou a mokrou metodu přípravy

Frekvenční test, který přímo vychází z deformačního, kdy je zjištěná hodnota amplitudy deformace z oblasti LVO, získaná z předchozího měření, použita jako konstantní hodnota právě proto, aby u gelů docházelo k elastické deformaci, potvrdil nezávislost metody **přípravy č. 1** nebo **2**. Všechny vzorky vykazovaly více či méně podobné závislosti. Elastický modul buď zcela převažoval v celé škále frekvencí, což vypovídá o dokonalé síťové struktuře gelu, nebo tohoto chování dosahoval při vyšších hodnotách frekvencí oscilací. Absolutní hodnoty modulů či posuny jejich bodů překřížení jsou nezávislé na způsobu přípravy. **Obr. 22** opět typově srovnává použité metody přípravy pro vzorek H_1.

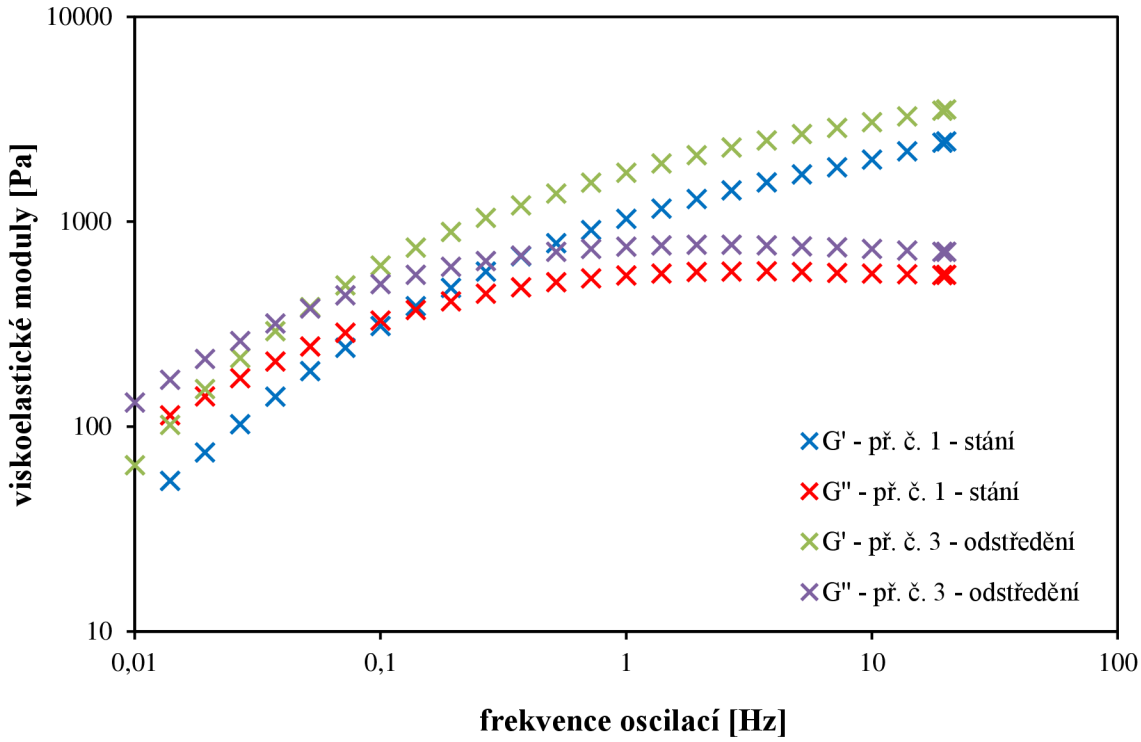
V případě zkoumání metody **přípravy č. 1** a **3**, čili stání nebo odstředění vzorků bylo dosaženo obdobných výsledků nezávislosti použití té či oné metody. Vzájemná poloha viskoelastických modulů v deformačních testech se pro všechny vzorky shoduje nehledě na způsobu přípravy. Použití odstředivky způsobilo pouze zanedbatelné zvýšení obou modulů v kontrastu se vzorky ponechanými ke stání, nicméně toto mohlo být způsobeno stlačením vzorku odstředivou silou, kdy se pak větší množství gelu nachází v jednotkovém objemu vzorku. LVO se však v obou typech přípravy neliší, což svedčí o tom, že, co do pevnosti struktury gelu, jsou oba totožné. Na **obr. 23** je daný jev zobrazen pro reprezentativní vzorek H_1.



Obr. 23: Srovnání vlivu stání či odstředění na mechanické vlastnosti vzorku H_1

V případě oblasti elastické deformace vykazovaly frekvenční testy totožné výsledky pro celou sadu vzorků. Na **obr. 24** je vidět typický průběh závislostí viskoelastických modulů na frekvenci oscilací. I zde je stejně jako v deformačních testech vidět mírné zvýšení modulů při použití odstředivky, nicméně ani zde se poloha bodu překřížení nijak výrazně nemění. Tudíž lze soudit, že z mechanického hlediska se gely, v závislosti na metodě **přípravy č. 1** či **3**, příliš neliší. V případě použití vysokomolekulárního Hya, vykazovaly vzorky vyšší elastický modul

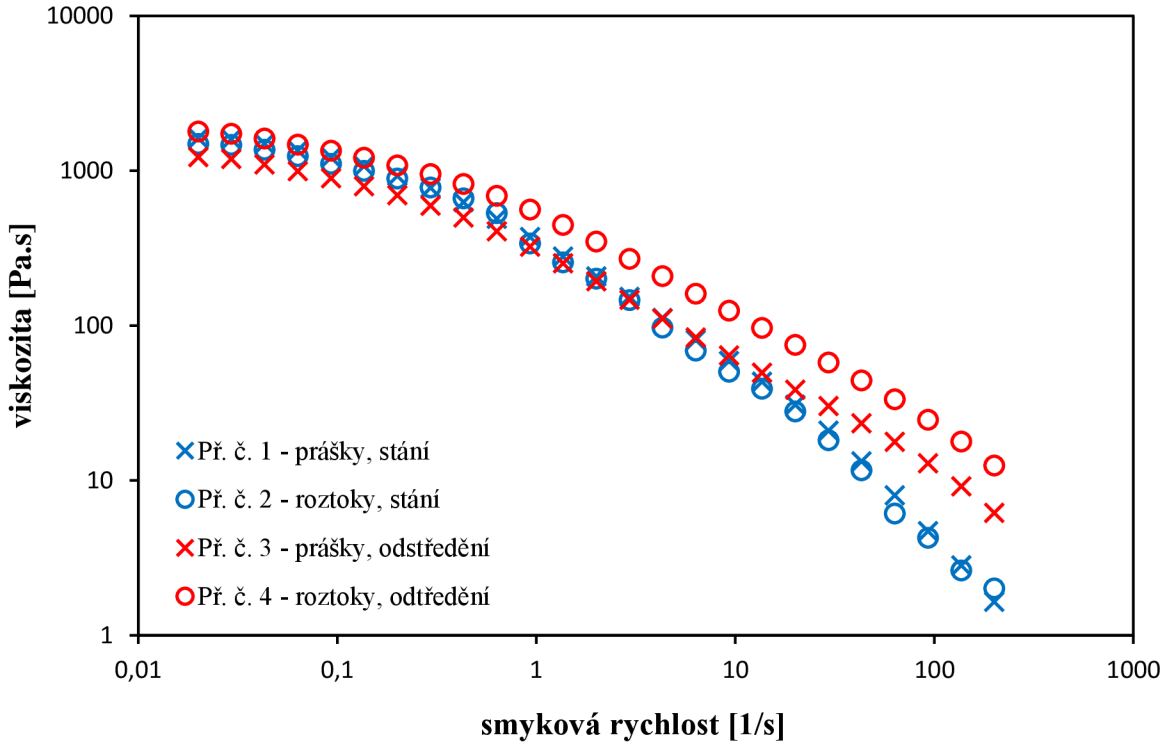
oproti viskozitnímu, a to v případě vyšších frekvencí (kratší časy působení deformace), což přímo koreluje s deformačními testy. Při použití nízkomolekulárního Hya převažuje spíše viskozitní modul (viz kapitola 6.1.2). Bod překřížení viskoelastických modulů se v závislosti na použití stání či odstředění posunuje. Při ponechání gelů k 24 hodinovému stání jsou jejich mechanické vlastnosti mírně lepší, nežli při prudkém odstředění. Vstupní komponenty mají v tomto případě pravděpodobně více času na dokonalou homogenizaci a obsazení více vazných míst při tvorbě tužšího gelu.



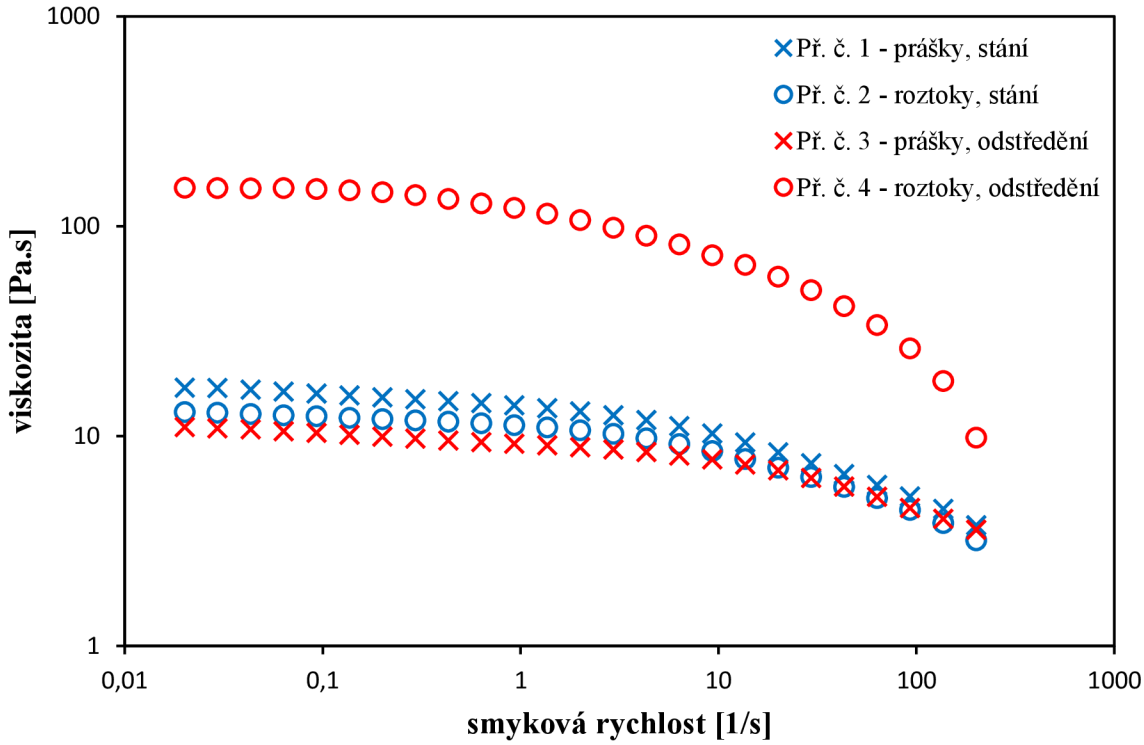
Obr. 24: Srovnání závislostí viskoelastických modulů na frekvenci oscilací vzorku H_1 při použití stání či odstředění vzorků

Vliv způsobu přípravy na tokové vlastnosti sady základní šestice vzorků koreluje s předchozími měřeními. Při srovnání metody **přípravy č. 1** a **2**, tedy míchání práškových forem či roztoků vstupních komponent vzorků, můžeme konstatovat, že tato nemá žádný zásadní vliv na výsledné tokové vlastnosti gelů. Jsme tedy schopni připravit konzistentní hydrogel jak z nízkomolekulárního tak vysokomolekulárního hyaluronanu v kombinaci s tenzidem, s ohledem na vhodnost té či oné metody pro budoucí aplikaci. Srovnání vlivu suché a mokré cesty na výsledné tokové vlastnosti je vidět na **obr. 25**. Vzorky tvořené vysokomolekulárním hyaluronanem jsou standardně prezentovány vzorkem H_1, přičemž zbytek z trojice vykazuje obdobné chování. Obdobně je tomu u trojice vzorků tvořených nízkomolekulárním hyaluronanem, jejichž zástupce – vzorek H_4 a jeho toková závislost, je znázorněn na **obr. 26**. Použití centrifugy částečně odpovídá oscilačním testům, kdy toto způsobuje tlakové nahromadění většího množství gelu v jednotkovém objemu, čím zvyšuje tuhost gelů. Vliv centrifugy na zvýšení viskozity je patrné pouze u mokré cesty, kdy jsou práškové formy vstupních komponent dokonale rozpuštěny a homogenizovány v roztoku,

přičemž při použití nízkomolekulárního Hya je toto zvýšení mnohem významnější než při použití vysokomolekulárního Hya, kdy metoda přípravy nemá téměř vliv.



Obr. 25: Srovnání tokových vlastností vzorku H_1 při použití stání či odstředění vzorků



Obr. 26: Srovnání tokových vlastností vzorku H_4 při použití stání či odstředění vzorků

Číselné srovnání daných metod přípravy reprezentuje **tabulka 7**. Pro přehlednost jsou zde uvedeny hodnoty (spočítané či vyhodnocené měřícím softwarem) dynamické viskozity [Pa.s] k odpovídajícím hodnotám smykových rychlostí [1/s]. K nulové smykové rychlosti, tzv. *„zero-shear viscosity“*, dále viskozita odpovídající přibližné hodnotě smykové rychlosti 1 s^{-1} a spočtená viskozita aproximovaná k nekonečné smykové rychlosti, tzv. *„infinite-shear viscosity“*. Jejich porovnání odpovídá **obr. 25** a **26** diskutující vliv metod přípravy, zejména odstředění na výsledný mechanický projev gelů, kdy všechny tři parametry dodržují vzájemný poměr dle metody přípravy a jejího vlivu na změnu viskozity.

Tab. 7: Přehled viskozitních parametrů v závislosti na metodě přípravy

Metoda přípravy	Vzorek	η [Pa.s]/$\gamma = 0\ s^{-1}$	η [Pa.s]/$\gamma \sim 1\ s^{-1}$	η [Pa.s]/$\gamma = \infty\ s^{-1}$
1	H_1	1623,00	373,00	4,64E-06
	H_4	17,01	13,09	8,36E-05
2	H_1	1499,00	339,20	6,31E-07
	H_4	12,96	11,37	2,51E-04
3	H_1	1948,00	193,50	4,53E-06
	H_4	10,75	8,85	1,01E-05
4	H_1	1505,00	349,45	3,94E-06
	H_4	147,50	122,03	1,70E-05

Na závěr této kapitoly tedy můžeme konstatovat, že metoda přípravy nemá, až na drobné výjimky, zásadní vliv na výsledné mechanické a tokové vlastnosti zkoumané základní šestice hydrogelů. Tato nezávislost je důležitá pro budoucí aplikační vlastnosti. Někdy může být výhodné smíchat pouze práškové formy a následně je zalét roztokem rozpouštědla. Stejně tak 24 hodinové čekání pro homogenizaci vzorků nemusí být pro komerční využití příliš vhodné. Naopak zakomponování dalších komponent do struktury gelů, jako např. dezinfekčních látek či léčiv, může být pohodlněji dosaženo přes „mokrou“ cestu přípravy. Podobně je tomu i pro zásadní analytická měření, kdy vzorky při mokré metodě dosahují přece jen kvalitnější homogenizace. Proto byla metoda **přípravy č. 2** využívána k téměř veškerým měřením v této práci.

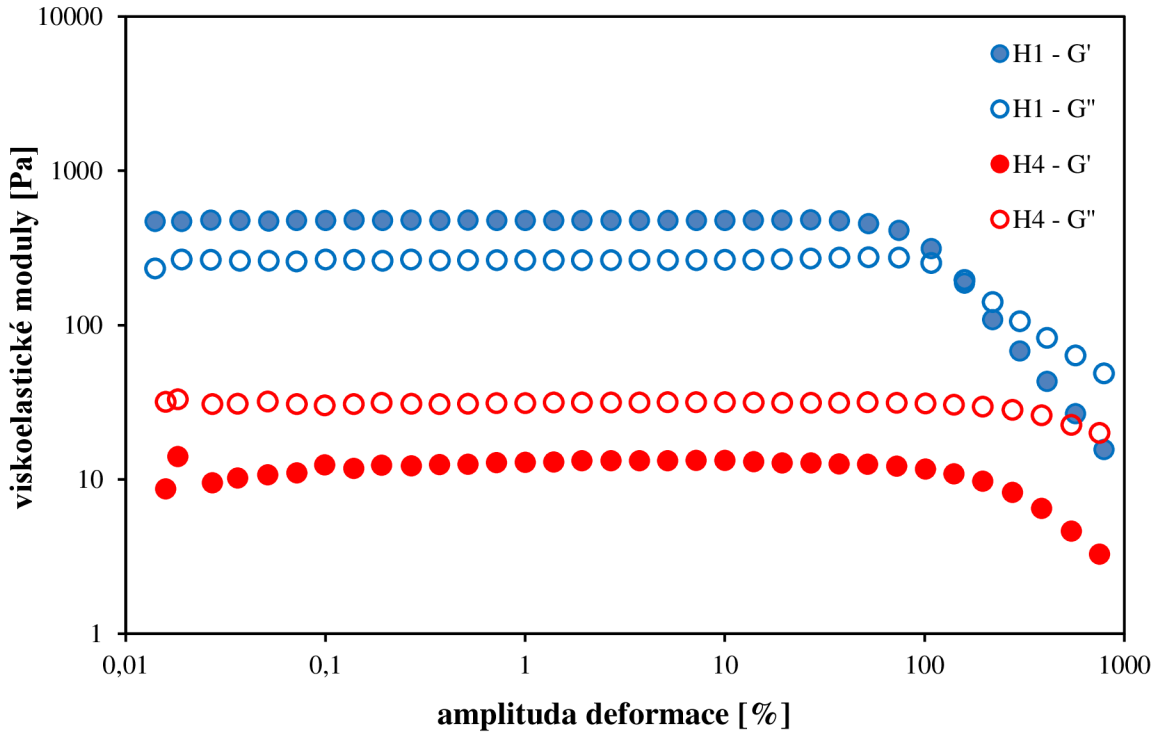
Základní šestice gelů byla taktéž podrobena testu reprodukovatelnosti. Vzorky prošly za měsíce výzkumu základní reologickou charakteristikou v řádu desítek měření, přičemž bylo připraveno množství sad vzorků, bylo testováno odebírání vzorků z jiné části vialky či centrifugační zkumavky, dokonce byl testován i vliv lidského faktoru v podobě přípravy vzorků různými lidmi. Představená šestice vzorků vykazovala stále stejné reologické chování, což značí velmi výhodnou startovní pozici pro případné budoucí aplikace, ať už lékařské nebo kosmetické.

6.1.2 Vliv složení gelů

Pro zkoumání vlivu složení na výsledné mechanické vlastnosti hydrogelů je možno vycházet z **tabulky 4**, kde je přehledně prezentována základní šestice vzorků. Z toho vyplývá, že je možno použít rozdílnou molekulovou hmotnost Hya v kombinaci s různou koncentrací tenzidu.

Deformační testy nám primárně poskytují informaci o délce LVO, která vypovídá o odolnosti

uzlů gelové sítě proti zpřetrhání, a tudíž jejich schopnosti odolávat této vystavené deformaci. Použití vysokomolekulárního Hya posunuje tuto oblast přibližně 5krát, oproti vzorkům tvořeným nízkomolekulárním Hya. **Obr. 27** znázorňuje takové chování pro případ srovnání vzorků H_1 a H_4. Z naměřených dat je patrné, že pokles modulů, značící konec LVO, nastává v případě gelů s LMW Hya již při cca 4 %, naopak při použití HMW Hya až při cca 20 %. Zbylá čtveřice gelů zachovává podobný trend, přičemž všechny hodnoty LVO jsou prezentovány v **tabulce 8**.



Obr. 27: Srovnání vlivu molekulové hmotnost Hya na délku LVO připravených hydrogelů

Elastický modul pro první trojici vzorků tvořených HMW Hya převyšoval viskozitní modul v celém rozsahu LVO. Její nezanedbatelná délka spolu s tímto faktem určují typický gelový materiál, který je rigidní až do okamžiku překřížení modulů, kdy dojde k nevratnému porušení gelové sítě. Naopak použití LMW Hya způsobilo vznik více viskózních gelů, kdy pro všechny tři vzorky převyšoval viskozitní modul nad elastickým, a to v celém rozsahu LVO. V případě vzorků H_4 a H_5 není tekutost tak markatní, jelikož pro jejich výrobu je použito větších koncentrací tenzidu. Vzorek H_6 však již svým chováním připomíná spíše viskózní kapalinu. Přehled chování vzorků je prezentován v **tabulce 9**, kdy převyšování elastického modulu je značeno písmenem *E*, naopak viskozitní chování písmenem *V*. Subjektivní vizuální charakterizace autorem je zde také zahrnuta.

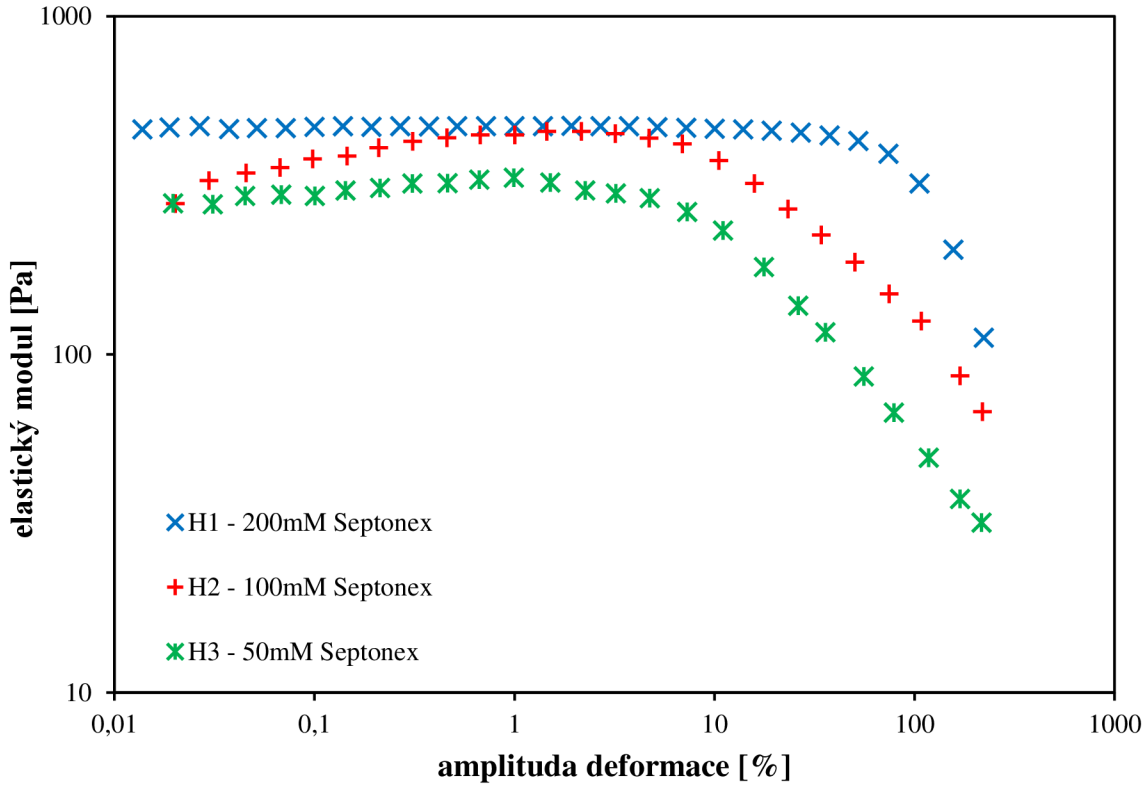
Absolutní hodnota modulů koresponduje k použité molekulové hmotnosti. Na **obr. 27** je taktéž patrná vyšší hodnota obou modulů při použití HMW Hya, přičemž tento trend je zachován i pro ostatní vzorky. Je tedy zřejmé, že pro tvorbu mechanicky více odolných materiálů je třeba delších polymerních řetězců s více vaznými místy. Zcela nejvyšší poměr modulů G'/G" se však vyskytoval u prostředních vzorků H_2 a H_5 s poměrem nábojů 2:1. Nejnižší hodnoty elastických modulů pak vykazovaly nejzředěnější vzorky H_3 a H_6. Ačkoliv je

zde poměr nábojů vyvážen, nemůžeme však jistě předpokládat 100 % disociaci. V přebytku tenzidu u vzorků H_2 a H_5 je tedy možné zcela zaplnit dostupná vazebná místa, a taktéž navázat část micel stericky, což ještě více zahustí gelovou síť. Další přidávání tenzidu v případě vzorků H_1 a H_4 (poměr nábojů 4:1) však již nemá významný dopad a jejich mechanické vlastnosti se od vzorků H_2 a H_5 výrazně nemění.

Tab. 8: Přehled oblastí LVO v závislosti na amplitudě deformace

Vzorek	Konec LVO (amplituda deformace [%])
H_1	19,30
H_2	7,75
H_3	5,91
H_4	1,94
H_5	4,77
H_6	10,18

Jak je patrné z **tabulky 8**, pro odpovídající si dvojice gelů, které se liší pouze použitou molekulovou hmotností Hya, a to H_1 a H_4 (2 % Hya + 200 mM Septonex), H_2 a H_5 (2 % Hya a 100 mM Septonex) odpovídá pravidlo, kdy vyšší molekulová hmotnost použitého Hya prodlužuje oblast LVO, přičemž zpevňuje strukturu gelu v uzlových bodech. Jediná výjimka nastává pro dvojici H_3 a H_6 (2 % Hya + 50 mM Septonex), přesněji pro vzorek H_6, který se, díky zředěným komponentům a nízké molekulové hmotnosti Hya, chová spíše jako vizkózní kapalina. Proto měření jeho deformačních vlastností není srovnatelné s jeho koncentrovanějšími kolegy.



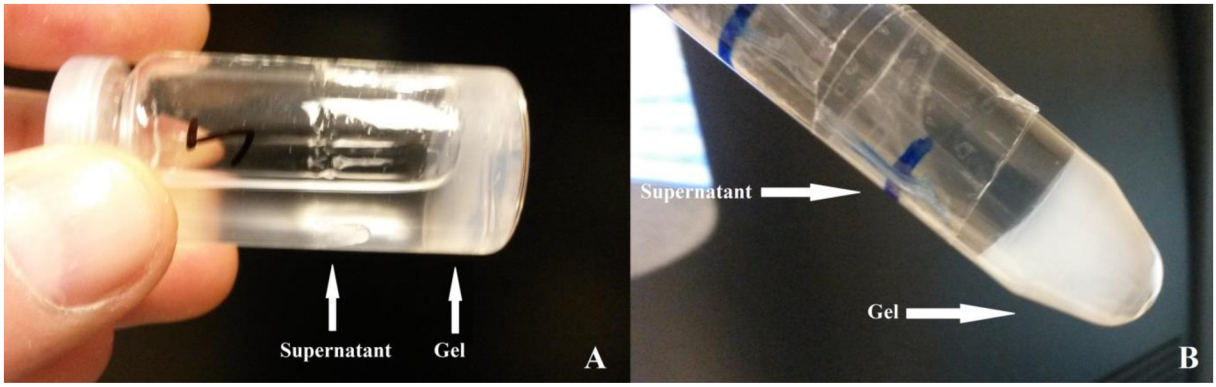
Obr. 28: Srovnání vlivu koncentrace tenzidu na absolutní hodnoty elastických modulů

Rozsah LVO i absolutní hodnota viskoelastických modulů je tedy závislá nejen na molekulové hmotnosti Hya, ale i na použité koncentraci tenzidu, přičemž jak bylo řečeno výše, při použití vyšší koncentrace roste absolutní hodnota modulů. **Obr. 28** zobrazuje tento jev pro trojici gelů tvořených HMW Hya (jen elastické moduly). Vzorky H_4–H_6 vykazují podobnou závislost, kdy se absolutní hodnoty modulů pohybují o řád níže.

Tab. 9: Vizuální charakterizace a viskoelastické chování základní šestice

Vzorek	MW Hya	Septonex [*c*]	Vzhled gelu	Vzhled supernatantu	Množství gelu (cca)	VE chování
H_1	HMW	200 mM	Pevný, čirý	Čirý	1 ml	E
H_2	HMW	100 mM	Pevný, čirý	Čirý	1 ml	E
H_3	HMW	50 mM	Pevný, čirý	Mírně zakalený	0,5 ml	E
H_4	LMW	200 mM	Mírně tekutý	Čirý	1 ml	V
H_5	LMW	100 mM	Mírně tekutý	Čirý	1 ml	V
H_6	LMW	50 mM	Tekutý	Mírně zakalený	0,5 ml	V

Před závěrečným shrnutím deformačních testů je zde třeba, v souvislosti s **tabulkou 9**, doplnit i **obr. 29**, který ukazuje typický vzhled fázově separovaného hydrogelu při použití metody přípravy stáním ve vialce či odstředěním v centrifugační zkumavce. Jak vyplývá z **tabulky 9**, kde viskózní chování látek je označeno písmenem *V* (viskozitní modul převládal nad elastickým), elastické naopak *E* (elastický modul převládal nad viskozitním), tak nejvíce elastické gelové chování vykazují nejkoncentrovanější vzorky s použitím vysoké molekulové hmotnosti Hya (H_1, H_2). Takový příklad je také uveden na **obr. 29**. Fázové rozhraní je dobře čitelné, vzorek neteče ani po otočení, je homogenní v celém objemu a stabilní v čase.

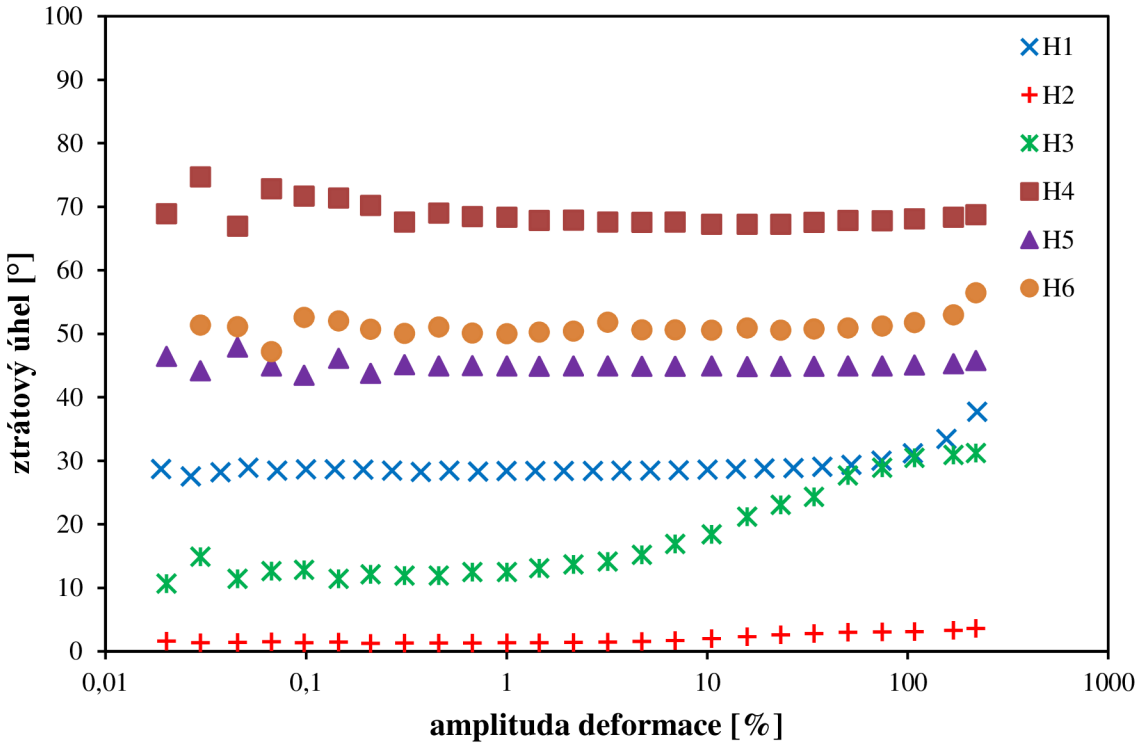


Obr. 29: Ideální vzhled vzniklých hydrogelů ve A) vialce, B) centrifugační zkumavce

Pro shrnutí výsledků deformačních testů je vhodné srovnat celou šestici gelů. **Obr. 30** prezentuje závislosti ztrátových úhlů na amplitudě deformace, kdy v případě, že velikost ztrátového úhlu daného vzorku přesáhne hodnoty 45°, vykazuje tento chování viskózní kapaliny, naopak pro případ, kdy jsou hodnoty ztrátových úhlů nižší než 45°, vykazují vzorky chování elastického tělesa. Křivky závislostí na **obr. 30** se shodují s deformačními testy popsanými výše. Jako nejpevnější vzorek s nejnižšími hodnotami ztrátových úhlů se projevil vzorek H_2, který je složen z vysokomolekulárního Hya o dostatečném počtu vazných míst, a také disponuje poměrem nábojů 2:1, při předpokladu, že přebytek tenzidu způsobuje i jeho

sterické vázání. Obecně všechny tři vzorky obsahující HMW Hya vykazují hodnoty ztrátových úhlů nižší než 45°, což se prokazuje jejich elastickým gelovým chováním.

Trojice gelů obsahujících LMW Hya překračuje v celé škála hodnotu 45°, kdy vykazují viskóznější chování. Dle **tabulky 9** sice vzorek H_4 teče jen mírně a v grafu se jeho křivka nachází nad vzorkem H_6, ale celkové viskoelastické chování závisí také na vzájemném poměru G'/G", pročež se tedy vzorek H_4 může zdát pevnější. V případě vyšších hodnot deformace je pak z grafu patrný strmý nárůst křivky u vzorku H_6, což ještě podtrhuje jeho tekutost.



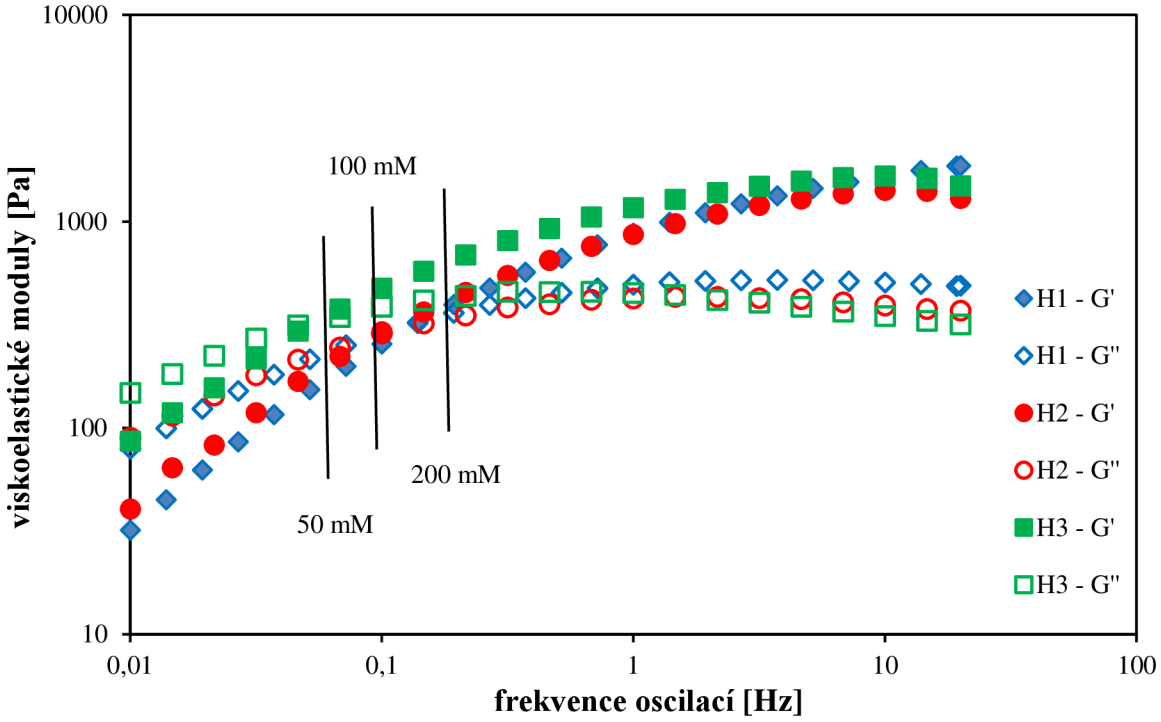
Obr. 30: Srovnání ztrátových úhlů v závislosti na deformaci u základní šestice gelů

Druhý z provedených měření byl frekvenční test, který přímo navazuje na deformační testy. Zjištěná hodnota amplitudy deformace z oblasti LVO získaná z předchozího měření zde byla použita jako konstantní hodnota právě proto, aby u gelů docházelo k elastické deformaci. Tato hodnota deformace byla stanovena jako 1 %. Vliv na výsledné hodnoty sledovaných viskoelastických modulů či ztrátového úhlu pak bude mít pouze frekvence oscilací.

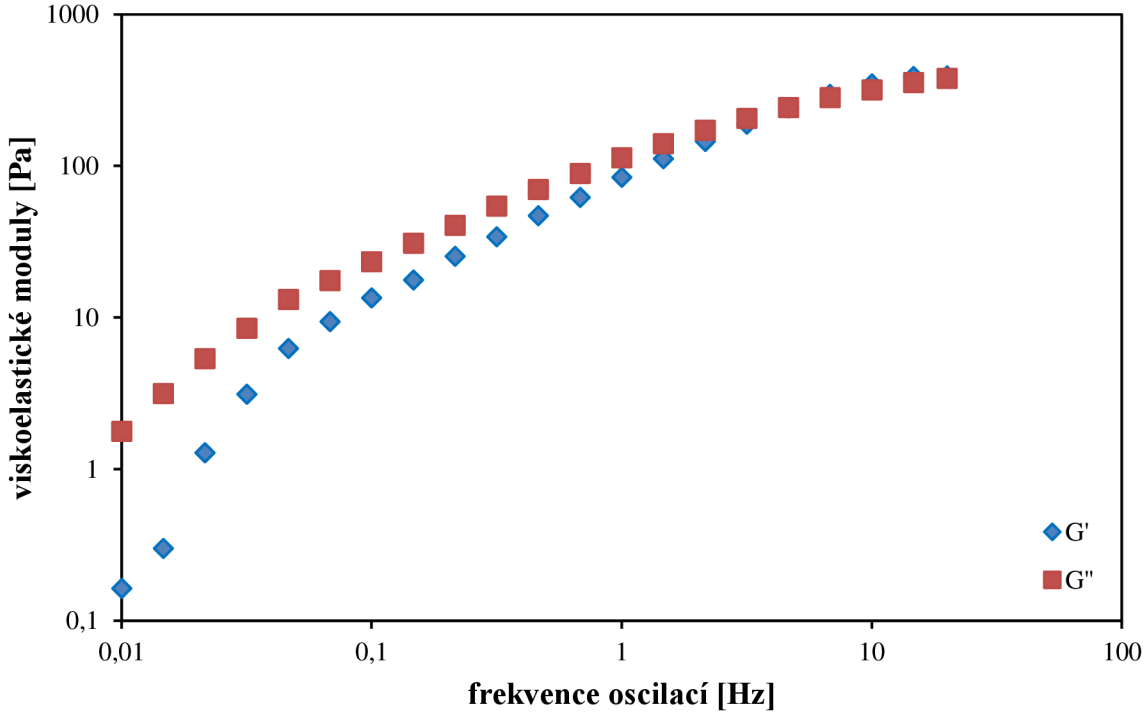
Vliv koncentrace tenzidu na výsledky závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací úzce souvisí s použitou molekulovou hmotností Hya. Na **obr. 31** je zobrazena tato závislost pro vzorky tvořené HMW Hya (H_1, H_2, H_3), které vykazují podobný průběh. Hodnota viskoelastických modulů v bodu překřížení (svislé čáry s příslušnou koncentrací tenzidu) je zde téměř nezávislá na koncentraci tenzidu. Naopak frekvence překřížení je s vyšší koncentrací tenzidu posunuta lehce k vyšším hodnotám, čili kratším časům. Nicméně rozdíl zde není tak zásadní, což odpovídá i porovnání mechanických vlastností z předchozího měření.

Vzorek hydrogelu s nejnižší koncentrací tenzidu (H_3) má teoreticky nasycená všechna vazebná místa při poměru nábojů 1:1. Avšak to by reálně znamenalo úplnou disociaci všech nabitých skupin a jejich dobrou dostupnost, což v reálných vzorcích velmi pravděpodobně není možné. Nicméně zvýšení koncentrace tenzidu zde má za následek navázání části micel stericky,

které tudíž zaplní volná místa mezi řetězci sítě gelu, což se potvrzeno i ve frekvenčních testech v mírném zvýšení hodnot viskoelastických modulů.



Obr. 31: Závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro vzorky H_1, H_2 a H_3



Obr. 32: Typická závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro vzorky tvořené LMW Hya

V případě hydrogelů tvořených nízkomolekulárním Hya je možno sledovat stejný trend ve změně modulů v závislosti na frekvenci oscilací a koncentraci použitého tenzidu jako u vysokomolekulárního protějšku. Nicméně kvůli kratším řetězcům hyaluronanu je možno vytvořit relativně pevný gel jen při použití vysoké koncentrace tenzidu – větší množství micel, které je schopno se inkorporovat do struktury gelu. I tak však, pro téměř celý rozsah frekvence oscilací, převažuje viskozitní modul nad elastickým, přičemž absolutní hodnota modulů je oproti HMW Hya gelům posunuta přibližně o řád níže. Typický průběh závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro vzorky LMW Hya + Septonex je zobrazen na **obr. 32**.

Přehled frekvencí a hodnot viskoelastických modulů, které jsou popsané výše, je představen v **tabulce 10**. Na rozdíl od frekvence a modulů v bodu překřížení, které s rostoucí koncentrací tenzidu mírně vzrostl, tak vypočítaná *mesh size*, která určuje velikost domén mezi řetězci v síti gelu, naopak s koncentrací tenzidu v případě HMW Hya gelů klesá. Tento jev může být vysvětlen vyšší hustotou sítě řetězců HMW hyaluronanu oproti nízkomolekulárnímu polymeru, který je až následně zesíťován micelami tenzidu.

Tab. 10: Viskoelastické parametry základní šestice

Vzorek	Frekvence bodu překřížení [Hz]	Hodnota bodu překřížení modulů [Pa]	Mesh size [nm]
H_1	0,14	324	13,0
H_2	0,10	287	14,6
H_3	0,05	314	16,4
H_4	0,01	65,6	20,4
H_5	4,64	242	22,8
H_6	2,15	199	21,6

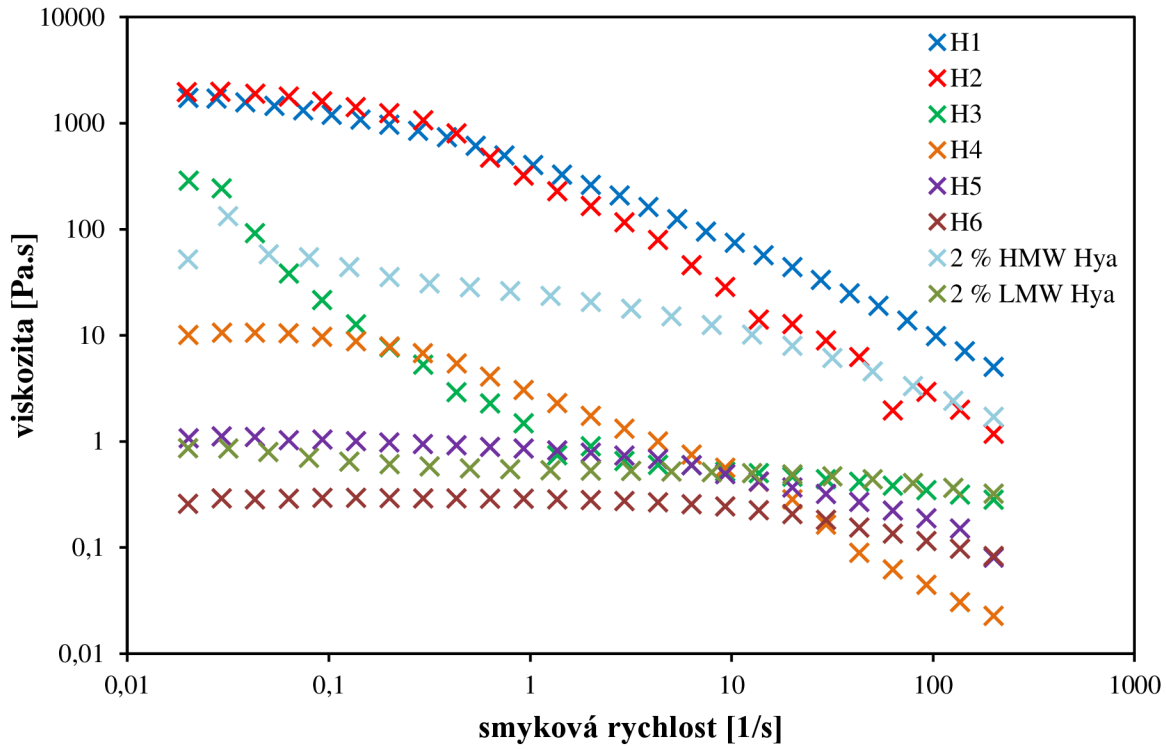
Tokové chování hydrogelů bylo částečně zmíněno v **tabulce 7**. Celá šestice byla také pro charakterizaci vlivu složení podrobena viskozitnímu měření, kdy při dosažení maximální smykové rychlosti 200 s^{-1} dosáhly všechny vzorky nevratné deformace. Vyšší smykové rychlosti nejsou pro daný typ vzorků vhodné, jelikož tyto mají tendenci z měřící instrumentace vylétávat.

Všechny vzorky vykazovaly pseudoplastické chování s newtonským plató při nižších smykových rychlostech, přičemž gely tvořené HMW Hya mají tuto oblast kratší a následný poklest křivek viskozit strmější oproti gelům s LMW Hya. Na druhou stranu však použití vyšších molekulových hmotností hyaluronanu nezávisle na použité koncentraci tenzidu zvyšuje viskozitu vzorků při nulové smykové rychlosti (*zero-shear viscosity*) až o dva řády, což přehledně prezentuje **tabulka 11**. Při dosažení maximální smykové rychlosti měření však všechny vzorky poklesnou na téměř totožnou hodnotu viskozity.

Tab. 11: Přehled závislosti zero-shear viscosity na složení vzorků

Vzorek	η [Pa.s]/γ = 0 s^{-1}
H_1	1729 ± 105
H_2	1957 ± 6
H_3	286,9 ± 0,7
H_4	10,8 ± 0,4
H_5	3,29 ± 0,08
H_6	1,12 ± 0,05

Grafické srovnání tokového chování hydrogelů je znázorněno na **obr. 33**. Je zde jasně patrný trend vyšších viskozit pro vzorky vzniklé použitím HMW Hya (H_1, H_2, H_3) oproti jejich nízkomolekulárním protějškům. Taktéž si je zde možno povšimnout výše diskutovaných délek newtonských oblastí. Pro srovnání je zde taktéž uvedena viskozitní závislost 2 % roztoků Hya, které vykazují newtonské chování v celém spektru smykových rychlostí. Roztok HMW Hya o koncentraci 2 % hm. je však sám o sobě dosti viskózní, kdy svými hodnotami přesahuje všechny gely tvořené LMW Hya, v jejichž případě nepomůže ani zpevnění sítě pomocí micel. Extrapolací k nekonečné smykové rychlosti však dostaneme obdobné hodnoty viskozit pro všechny vzorky. Dle uvažování budoucích aplikací tak můžeme složením gelů modifikovat jejich mechanické i tokové vlastnosti. S ohledem na požadovanou degradaci, roztírání či naopak stabilitu můžeme měnit viskozitu v rozmezí pěti řádů.



Obr. 33: Přehled viskozitních závislostí základní šestice v porovnání se zásobními roztoky hyaluronanu

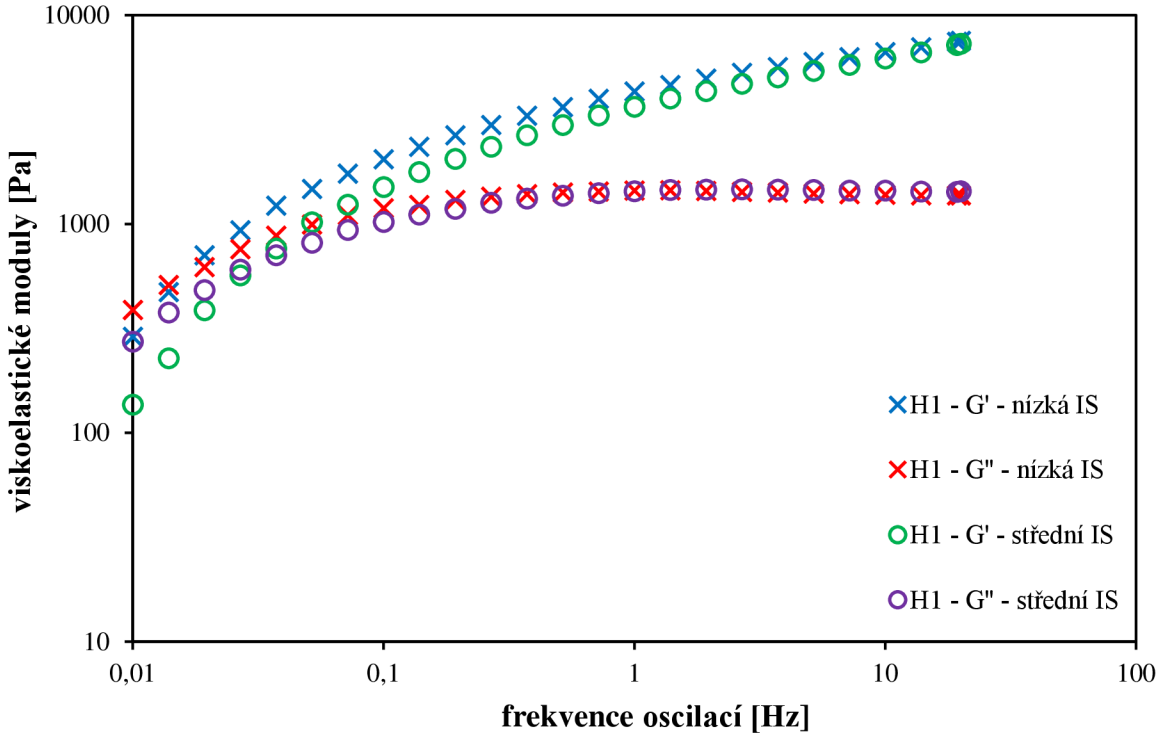
6.1.3 Vliv iontové síly prostředí

Jako standardní prostředí pro přípravu gelů se využívá roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, který simuluje fyziologický roztok. Ze zkušenosti a z literatury [93, 98] víme, že pro vznik gelové fáze je právě určité rozmezí iontové síly nutné, kdy nízkomolekulární elektrolyt snižuje nábojové repulze na nabitých skupinách polymerního řetězce, čímž mu umožnuje se více sbalit a zaplést do gelové sítě. Naopak vysoká iontová síla, přesahující určitou kritickou hodnotu, má za následek zánik separované fáze. Pro prozkoumání tohoto vlivu byla tedy připravena sada základní šestice vzorků lišící se pouze v koncentraci prostředí (roztoku NaCl). Koncentrace vstupních komponent (polymer + tenzid) zůstaly stejné jako v předchozích měřeních. Kompletní přehled experimentu shrnuje **tabulka 12**. Barevně jsou označeny koncentrace prostředí, kdy byl ještě pozorován gelotvorný proces.

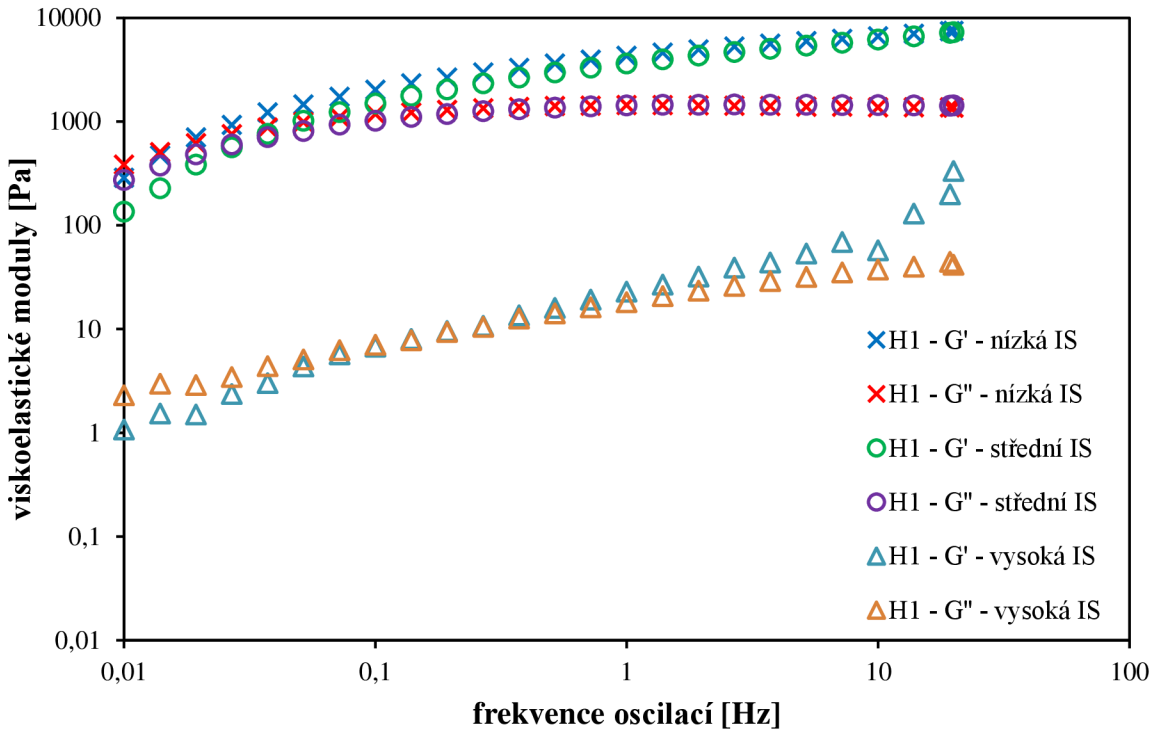
Tab. 12: Přehled vzorků pro zkoumání vlivu iontové síly prostředí

Číslo vzorku	Vzorek	NaCl (c [mol/l])
1	H_1	0,05
2	H_1	0,15
3	H_1	0,3
4	H_1	0,5
5	H_1	1
6	H_2	0,05
7	H_2	0,15
8	H_2	0,3
9	H_2	0,5
10	H_2	1
11	H_3	0,05
12	H_3	0,15
13	H_3	0,3
14	H_3	0,5
15	H_3	1
16	H_4	0,05
17	H_4	0,15
18	H_4	0,3
19	H_4	0,5
20	H_4	1
21	H_5	0,05
22	H_5	0,15
23	H_5	0,3
24	H_5	0,5
25	H_5	1
26	H_6	0,05
27	H_6	0,15
28	H_6	0,3
29	H_6	0,5
30	H_6	1

Viskoelastické vlastnosti hydrogelů tvořených HMW Hya jsou silně závislé na iontové síle prostředí. Použití nižší iontové síly (0,05 M NaCl) způsobilo mírné zvýšení viskoelastických modulů oproti klasické iontové síle (0,15 M NaCl), přičemž od bodu překřížení modulů převládal elastický modul v celé škále frekvencí. Bod překřížení pro nižší koncentraci prostředí byl také mírně posunut k vyšším hodnotám frekvencí. Z výše popsaného je patrné, že pro gelový proces stačí minimální iontová síla prostředí pro odstínění nábojových repulzí polárních skupin komponent hydrogelu, aby byl tento schopen utvořit plnohodnotnou síť a z hlediska polohy bodu překřížení i absolutní hodnoty modulů dokonce nepatrně pevnější gel. Námi používaná koncentrace 0,15 M však simuluje fyziologický roztok pro uvažování medicínských aplikací těchto druhů hydrogelů. Na **obr. 34** je vidět srovnání nízké a střední iontové síly (0,05 M vs. 0,15 M) prostředí a její nepatrný vliv na mechanické vlastnosti gelů, jež byly popsány výše.



Obr. 34: Srovnání mechanických vlastností vzorku H_1 při nízké a střední IS prostředí

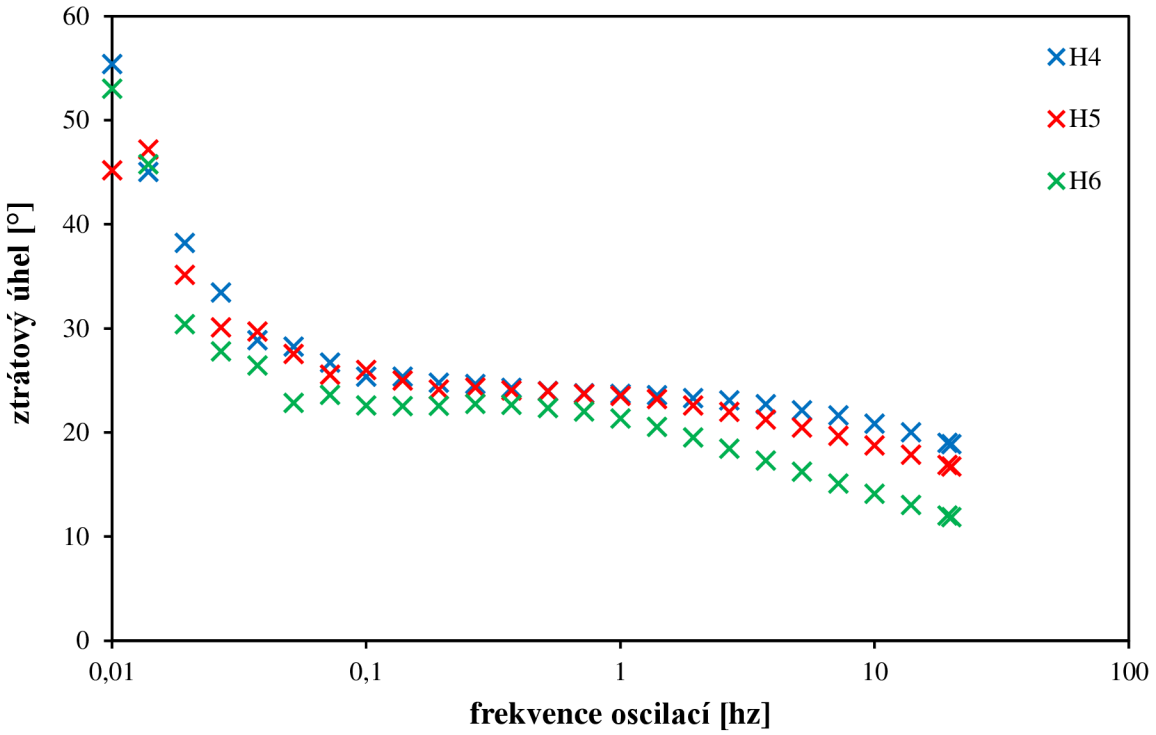


Obr. 35: Srovnání mechanických vlastností vzorku H_1 při nízké, střední a vysoké IS prostředí

Z **obr. 35** je patrné, že jako kritická hodnota iontové síly se pro vzorky tvořící HMW Hya stala hodnota 0,3 M NaCl. Oba viskoelastické moduly byly při této hodnotě posunuty o dva řády níže, přičemž pro širokou škálu frekvence oscilací převládal viskozitní modul nad elastickým. Tak vysoká IS již způsobovala, že se vzorky chovaly více jako viskózní kapaliny nežli elastické gely. Nad touto hodnotou již nebyl pozorován gelační proces. Průběh křivek a jejich závislost na IS pro zbylé dva z trojice HMW Hya gelů byl obdobný jako zde prezentovaný pro vzorek H_1, s tím rozdílem, že nejpevnější vzorek H_2 vykazoval ještě nárůst absolutní hodnoty modulů zhruba o 20 % oproti nejkoncentrovanějšímu kolegovi.

V případě gelů tvořených nízkomolekulárním Hya se objevil podobný trend, kdy nižší koncentrace NaCl (0,05 M) dokázala síť natolik vyztužit, že při vyšších frekvencích již převládal elastický modul nad viskozitním. Jako kritická se zde však koncentrace snížila na námi používanou 0,15 M, při které opět převládá mírně tekuté chování popsané v kapitole 6.1.2. Ukázka srovnání ztrátových úhlů gelů při použití LMW Hya (H4, H_5 a H_6) při nejnižší použité iontové síle je znázorněna na **obr. 36**. I zde si prostřední vzorek H_5 zachovává nejvyšší absoultní hodnoty modulů, přičemž frekvence bodu překřížení i vzájemné polohy obou modulů jsou u všech vzorků takřka totožné.

Výše popsané odpovídá obecnému vlivu elektrolytu na stabilitu nabitých koloidů, které tuto vykazují právě v určitém rozmezí koncentrace. Při nadbytku elektrolytu dochází ke koagulaci koloidů.



Obr. 36: Srovnání mechanických vlastností vzorků H_4, H_5 a H_6 při nízké IS prostředí

Vypočtené hodnoty mesh size pro 15 výsledných vzorků schopných gelace odpovídá mechanickým vlastnostem popsaným výše. Pro standardní iontovou sílu (NaCl = 0,15 M) odpovídá její hodnota dříve naměřeným datům, prezentovaným v **tabulce 10**. V případě nižší iontové síly, při které se u všech vorků zlepšily mechanické vlastnosti, co do tuhosti a rigidity gelové sítě, se hodnota mesh size snížila. To odpovídá větší propletenosti gelové sítě, čili menším prostorovým doménám mezi uzly a zlepšení mechanických vlastností. V případě vyšší iontové síly, která představovala kritickou hranici gelotvorného procesu, se naopak hodnota mesh size zvětšila, odpovídajíce postupnému rozplétání gelové sítě, zvětšení prostoru mezi uzly a ztekucení vzorku či úplnému zabránění gelace. Přehled výsledných hodnot mesh size vzorků v závislosti na intové síle prostředí je zobrazen v **tabulce 13**.

Tab. 13: Přehled vzorků pro zkoumání vlivu iontové síly prostředí

Číslo vzorku	Vzorek	NaCl (*c* [mol/l])	Mesh size [nm]
1	H_1	0,05	8,18
2	H_1	0,15	8,26
3	H_1	0,3	23,05
6	H_2	0,05	7,93
7	H_2	0,15	16,49
8	H_2	0,3	24,33
11	H_3	0,05	9,73
12	H_3	0,15	29,34
13	H_3	0,3	39,93
16	H_4	0,05	8,53
17	H_4	0,15	11,64
21	H_5	0,05	6,84
22	H_5	0,15	13,28
26	H_6	0,05	8,86
27	H_6	0,15	15,36

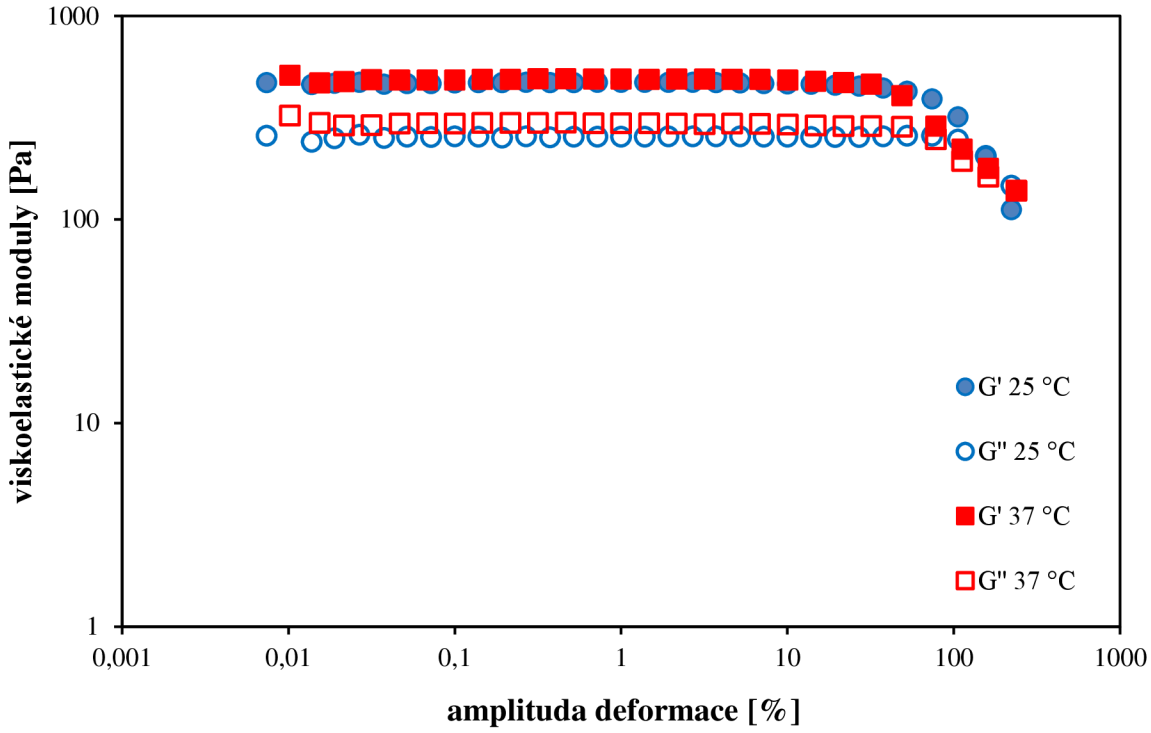
6.1.4 Vliv teploty

Pro uvažování medicínských či kosmetických aplikací fázově separovaných hydrogelů nám použití hyaluronanu, jakožto strukturního materiálu, zajišťuje potřebnou biokompatibilitu. Dále je však nutné zjistit, jak se dané gely budou chovat při teplotě lidského těla. Proto byla záměrně proměřena reologie základní sady vzorků při teplotě 37 °C a poté byly výsledky srovnány s laboratorní teplotou 25 °C.

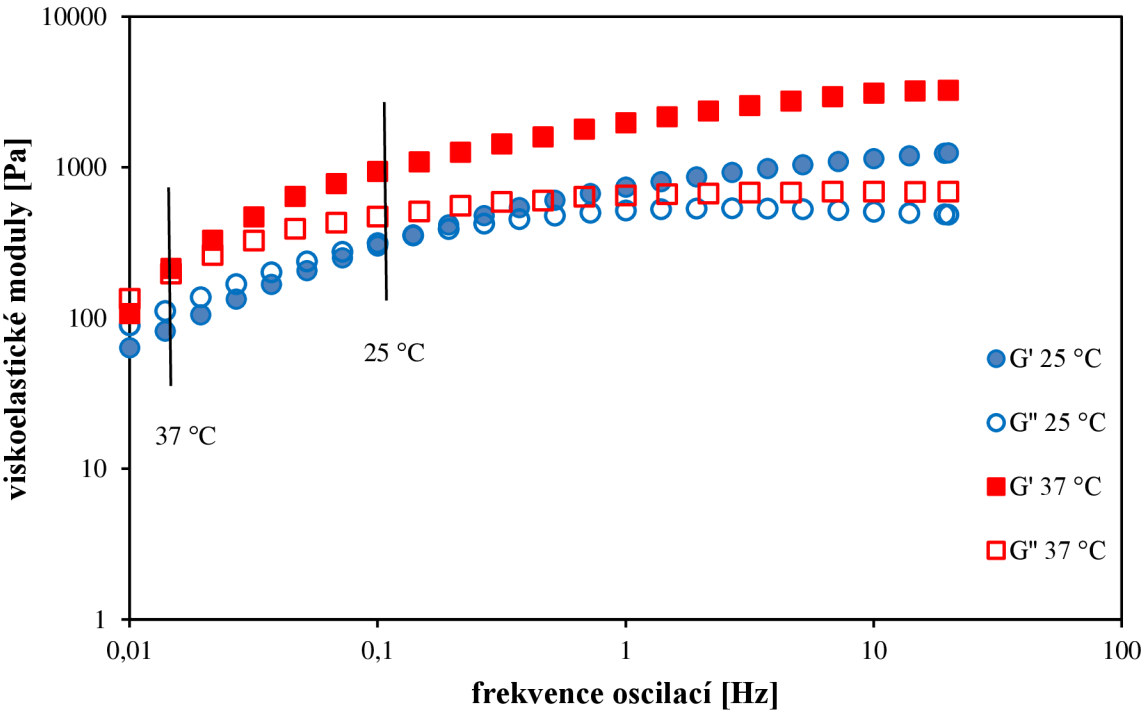
Zvýšení teploty mělo velmi malý vliv na posun modulů a jejich závislosti na amplitudě deformace při prvním typu oscilačních testů, a to pro celou sadu vzorků. Lineární viskoelastická oblast zůstala nezměněna, přičemž absolutní hodnoty všech modulů s teplotou mírně vzrostly. **Obr. 37** prezentuje právě takový druh chování, zde pro příklad reprezentativního vzorku H_1. Stabilita uzlových bodů gelů a tedy jejich celková rigidita při zvýšené teplotě může být, s ohledem na jejich budoucí aplikaci, výhodná.

Teplotní vliv na elastickou deformaci, závislou od frekvence oscilace, silně záležel na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu. V případě gelů tvořených HMW Hya se zvyšující se teplotou rostly absolutní hodnoty obou modulů, především elastického. Bod překřížení byl v tomto případě významně posunut k nižším frekvencím, které značí delší časy působení vloženého napětí. Tento fakt znamená, že zvyšováním teploty, alespoň do určitého bodu, jsme schopni zpevnit strukturu gelů připravených z HMW hyaluronanu, jak je prezentováno na **obr. 38.**

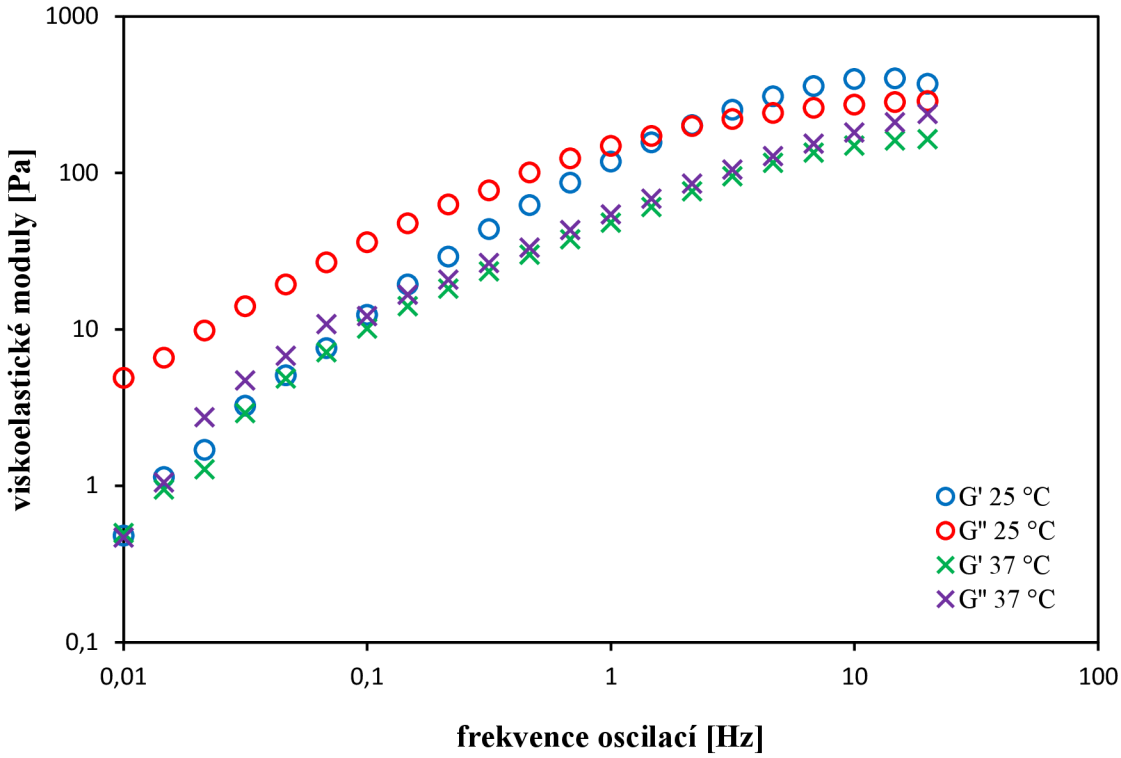
Zvýšení teploty u gelů tvořených nízkomolekulárním hyaluronanem však způsobilo opačnou tendenci. Tvar křivek se téměř nezměnil, naopak absolutní hodnoty modulů klesly téměř o dva řády se současným posunem bodu prekřížení k nižším frekvencím. Na **obr. 39** je vidět typický vliv zvýšené teploty pro trojicí gelů tvořených LMW Hya (H_4,H_5,H_6).



Obr. 37: Srovnání vlivu teploty na mechanické vlastnosti vzorku H_1 – deformační test



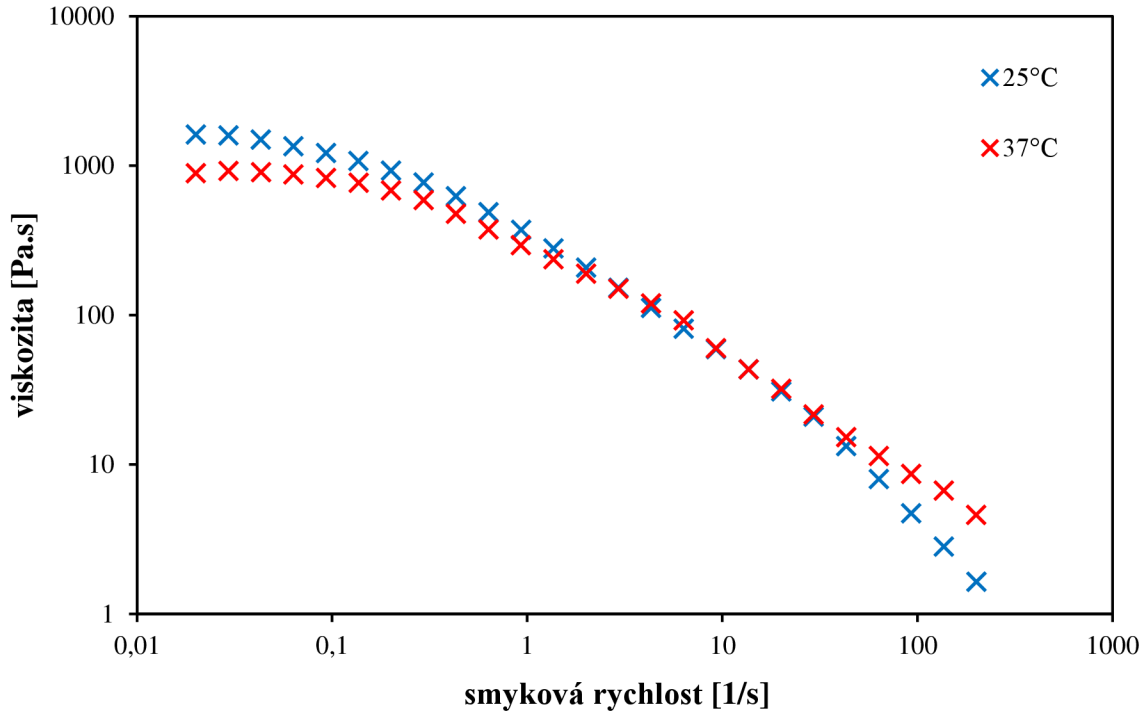
Obr. 38: Srovnání vlivu teploty na mechanické vlastnosti vzorku H_1 – frekvenční test



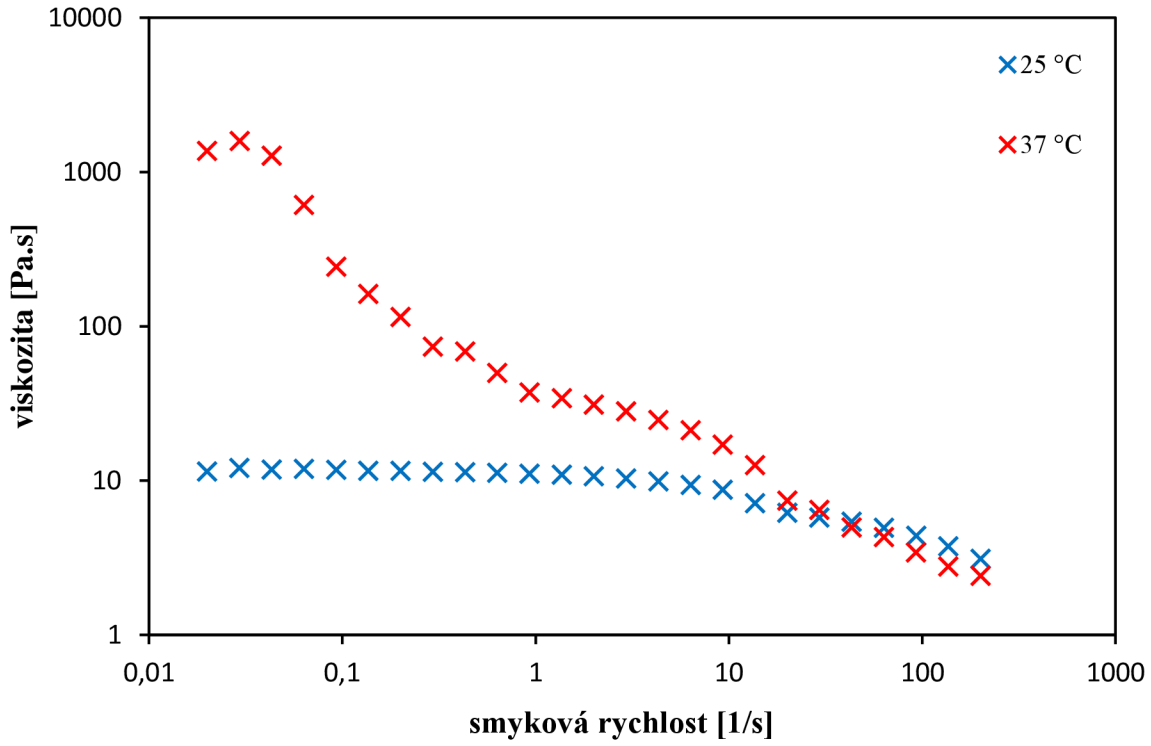
Obr. 39: Srovnání vlivu teploty na mechanické vlastnosti vzorku H_4 – frekvenční test

Molekulová hmotnost hyaluronanu tedy hraje zásadní roli při uvažování vlivu teploty na mechanické vlastnosti hydrogelů. Při zvýšení teploty se v případě kratších řetězců tyto uvolňují a tvoří slabší gelovou síť s postupným ztekucováním vzorku. O tom svědčí i zvětšení vypočtené hodnoty mesh size, která se pro vzorky obsahující LMW Hya zvětšila 2–4krát. Větší prostor v doménách mezi krátkými řetězci nedovoluje pospojovat dostatek vazných míst pro tvorbu elastického tuhého gelu. Na druhou stranu použitím dlouhých řetězců polymeru v podobě vysokomolekulárního hyaluronanu je možno při zvýšení teploty dostat výsledný gel s lepšími mechanickými vlastnostmi, ve smyslu rigidity, než původní vzorek. Nárůst teploty v tomto případě velmi pravděpodobně zvyšuje dostupnost polárních skupin, které se účastní vazebných reakcí, a to díky reorganizaci polymerního řetězce a zvýšení mobility molekul. I tento jev byl potvrzen spočtením hodnoty mesh size, která v případě HMW Hya gelů mírně klesla.

Tokové vlasnosti v případě hydrogelů složených z vysokomolekulárního hyaluronanu nebyly teplotou významně ovlivněny, přičemž všechny tři vzorky vykazovaly téměř shodnou závislost (**obr. 40**). Pro případnou aplikaci do lidského těla je toto chování výhodné pro zachování potřebné viskozity gelu. Vzorky obsahující nízkomolekulární hyaluronan vykazovaly se zvýšením teploty i zvýšení viskozity, někdy až o dva řády. Zároveň se zde projevilo zkrácení newtonského plató, které bylo následováno strmým poklesem křivky viskozitní závislosti. Nutno dodat, že od hodnoty smykové rychlosti cca 10 s^{-1} je trend poklesu totožný pro obě teploty. Zvýšená teplota na počátku měření tak mohla dopomoci k rychlejší relaxaci vzorků gelů obsahujících LMW Hya a tím pádem i k mírnému zvýšení tuhosti. Viskozitní závislosti druhé trojice vzorků byly opět velmi obdobné (**obr. 41**).



Obr. 40: Srovnání vlivu teploty na viskozitu vzorků gelů obsahujících HMW Hya



Obr. 41: Srovnání vlivu teploty na viskozitu vzorků gelů obsahujících LMW Hya

6.1.5 Vliv pH prostředí

Stejně jako při posuzování teplotních vlivů má i prozkoumání chování hydrogelů při rozdílném pH prostředí velký význam pro uvažování v medicínském použití. Jako příklad je možno zmínit

rozdílné pH nádorové tkáně (pH = 5,5) oproti krevní plazmě (pH = 7,3). V tomto případě je posouzení reologického chování, v závislosti na pH, na místě. V závislosti na aplikaci pak můžeme připravit gely, u nichž bude žádoucí degradace za sníženého pH, a tím případné uvolnění v sobě vázané aktivní látky. Pro jiné typy aplikací může být naopak vyžadována stabilita gelové sítě v rozdílném prostředí. Pro nastavení experimentu byly hydrogely podrobeny široké škále pH prostředí, a to jejich přípravou v pufrech, popsaných podrobně v **tabulce 3**.

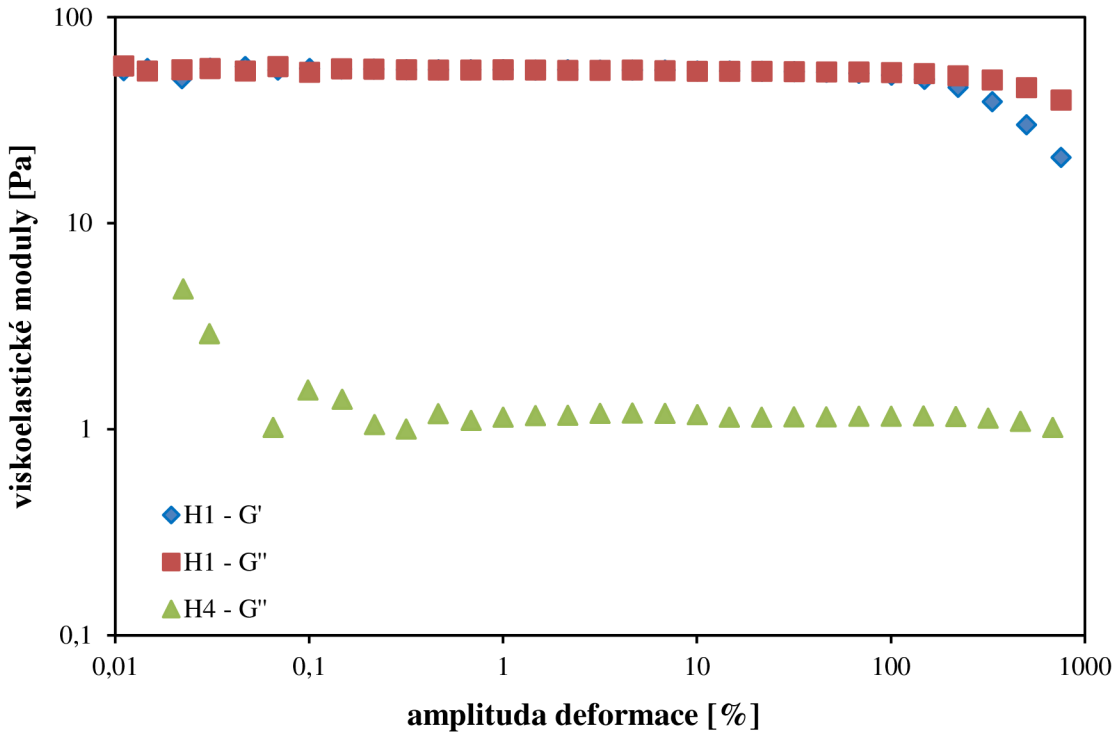
Standardně připravené vzorky vykazovaly, při použití obou typů hyaluronanu a všech koncentrací Septonexu, obecně neutrální pH.

Tab. 14: Přehled hodnot pH pro hydrogely a jejich supernatanty

Vzorek	pH – gel	pH – supernatant
H_1	6,88	7,09
H_2	7,23	7,20
H_3	7,15	7,00
H_4	6,83	7,32
H_5	7,05	7,25
H_6	7,38	7,13

Změny v pH způsobily, v případě deformačního měření, pokles obou modulů a potlačily elastické chování u všech vzorků oproti jejich standardním alternativám. V případě vzorků s HMW Hya způsobila změna pH, a tedy i zvýšení iontové síly pomocí pufrů, nejenom potlačení elastických vlastností snížením absolutních hodnot obou modulů, ale také propad elastického modulu takovou mírou, že téměř dosahoval hodnot ztrátového modulu. Tento jev byl nejmarkantněji pozorován při nejnižším pH (3,5), při němž ještě hyaluronan zcela nedisociuje, a tudíž se nemůže naplno účastnit vazeb s opačně nabitým tenzidem. Výsledný produkt se pak hodnotami modulů i vizuálně jeví více tekutý. Rozsah LVO se však u všech HMW Hya gelů téměř nezměnil oproti standardu. Nejtužší gely vznikly v nejvyšším pH (9), přičemž, jak již bylo popsáno výše, i v tomto případě byly absolutní hodnoty modulů nižší než standardy.

V případě gelů tvořených LMW Hya způsobil jakýkoliv zásah změnou pH u všech vzorků zhoršení elastických vlastností natolik, že vždy převažoval ztrátový modul nad elastickým nebo nebyl druhý zmíněný ani měřitelný. Vizuálně byl gel natolik tekutý, že vykazoval chování spíše viskózní kapaliny. Pro další experimenty proto byly podrobeny testu pH prostředí jen vzorky obsahující HMW Hya. **Obr. 42** prezentuje na ukázku tyto dva typy chování, tedy téměř shodná hodnota viskoelastických modulů v případě gelů s HMW Hya a neměřitelnost elastického modulu u vzorků gelů s LMW Hya



Obr. 42: Deformační test vzorků H_1 a H_4 v celé škále pH (3,5; 5; 7; 9)

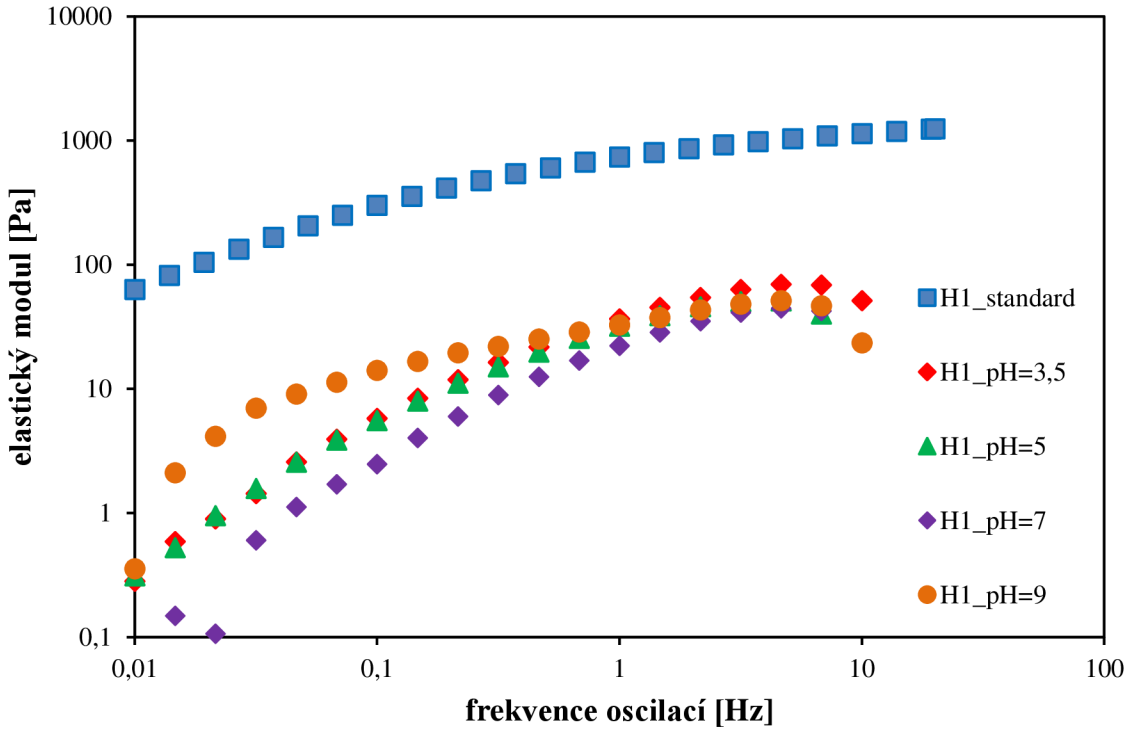
Frekvenční testy potvrdily výsledky předchozích. I v případě vratné deformace vykazovaly gely tvořené LMW Hya velmi viskózní chování při téměř neměřitelných hodnotách elastického modulu, a to pro případ všech vzorků a všech zkoumaných pH. Měření viskoelastických modulů v oblasti elastické deformace pro gely tvořené HMW Hya kopírovalo průběh deformačních měření. Absolutní hodnota obou modulů klesla u všech gelů ve všech zkoumaných pH přibližně o řád, přičemž jejich vzájemná poloha zůstala oproti standardu zachována. Zhoršení mechanických vlastností potvrdily i ostatní hodnoty viskoelastických parametrů, kdy frekvence překřížení modulů se posunula k vyšším hodnotám, tedy kratším časům působení deformace, stejně tak vzrostly, v závislosti na vzorku, hodnoty mesh size, a to čtyř až šestinásobně oproti standardu. Toto odpovídá rozvolněnější gelové síti, kdy větší hodnota mesh size znamená více prostoru v doménách mezi uzly sítě, což může mít za následek zhoršení vazebných vlastností, které se projevuje více viskózním chováním vzorku. **Tabulka 15** shrnuje naměřená číselná data, přičemž hodnoty standardů jsou uvedeny v **tabulce 10**.

Tab. 15: Viskoelastické parametry základní šestice v závislosti na pH prostředí

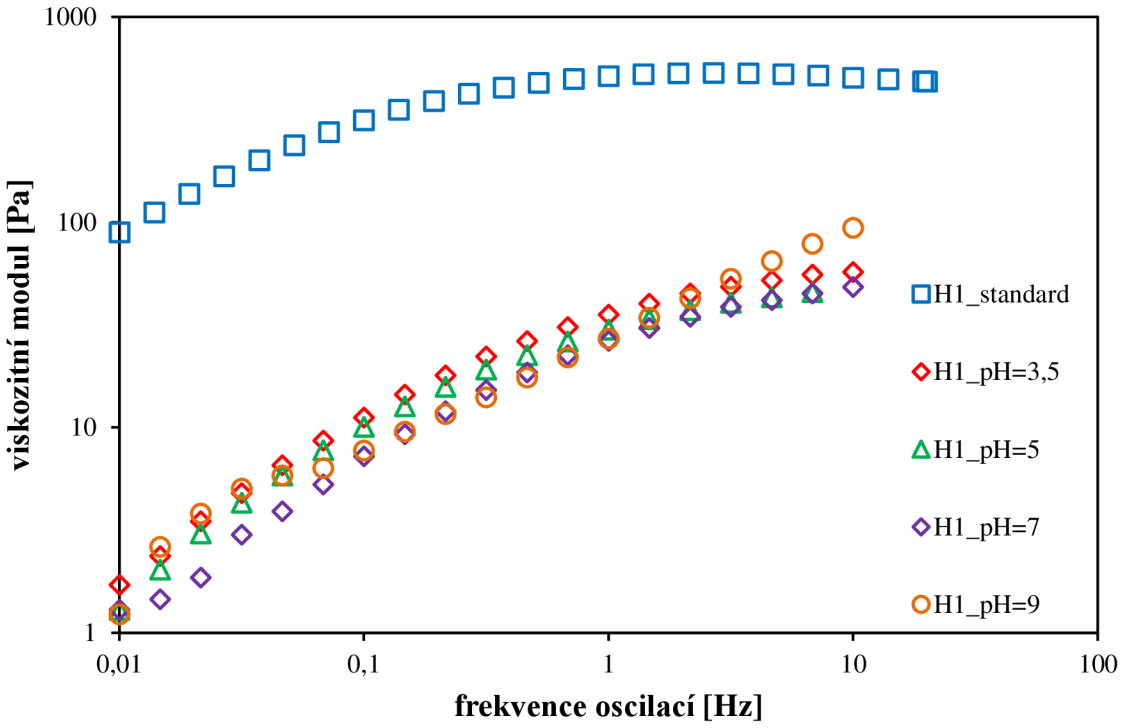
pH	Vzorek	Frekvence bodu překřížení [Hz]	Hodnota bodu překřížení modulů [Pa]	Mesh size [nm]
3,5	H_1	0,95	34,24	48,25
	H_2	1,47	43,19	43,75
	H_3	1,73	29,03	56,58
	H_4	gel nevznikl		
	H_5			
	H_6			
5	H_1	1,18	29,47	52,27

	H_2	0,51	55,82	28,71
	H_3	1,97	35,57	54,93
	H_4	gel nevznikl		
	H_5			
	H_6			
7	H_1	3,16	37,54	56,52
	H_2	1,20	40,19	50,00
	H_3	2,12	27,02	61,19
	H_4	gel nevznikl		
	H_5			
	H_6			
9	H_1	0,65	34,14	57,67
	H_2	18,07	78,23	38,34
	H_3	1,67	19,79	68,41
	H_4	gel nevznikl		
	H_5			
	H_6			

Typický průběh závislostí viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro různá pH je názorně prezentován na **obr. 43** a **obr. 44**, zde pro vzorek H_1 (pro přehlednost je závislost rozdělena na jednotlivé moduly). Ostatní z trojice vzorků vykazovaly velmi podobné chování, co do tvaru křivek i hodnot obou modulů, což je zřejmé i z předchozí tabulky.



Obr. 43: Závislost elastického modulu vzorku H_1 na frekvenci oscilací při různém pH prostředí

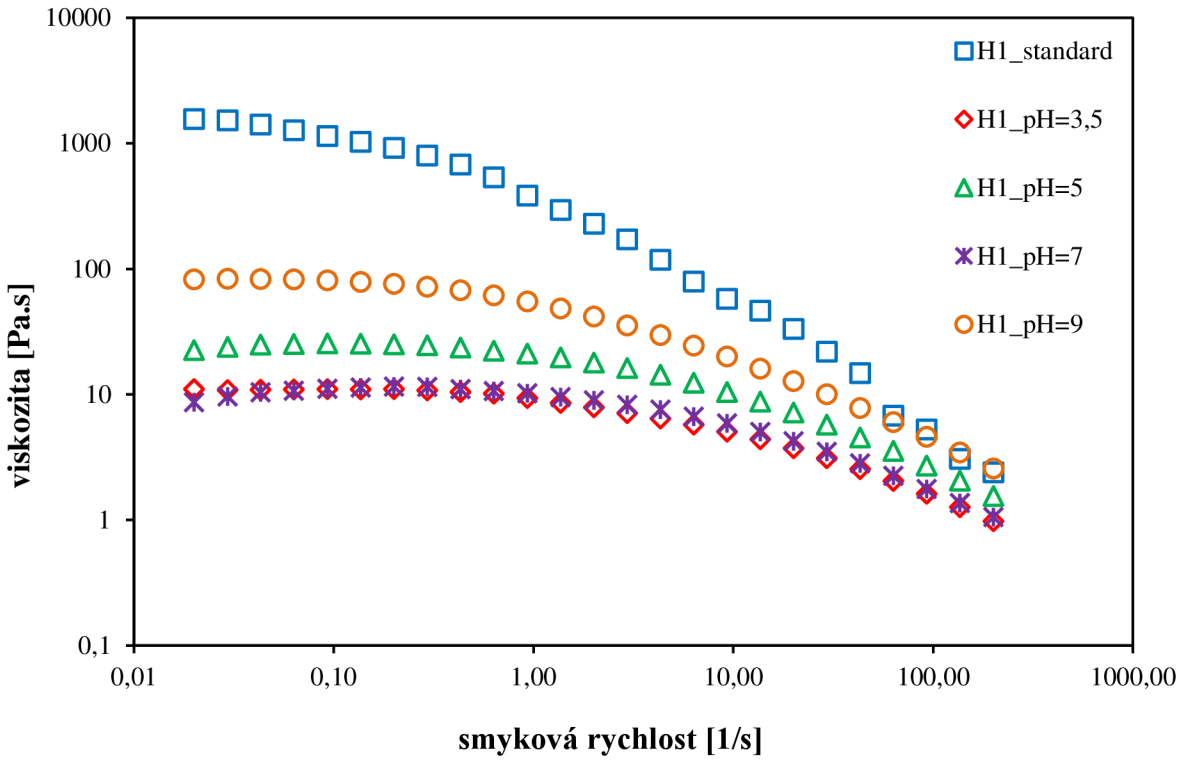


Obr. 44: Závislost viskozitního modulu vzorku H_1 na frekvenci oscilací při různém pH prostředí

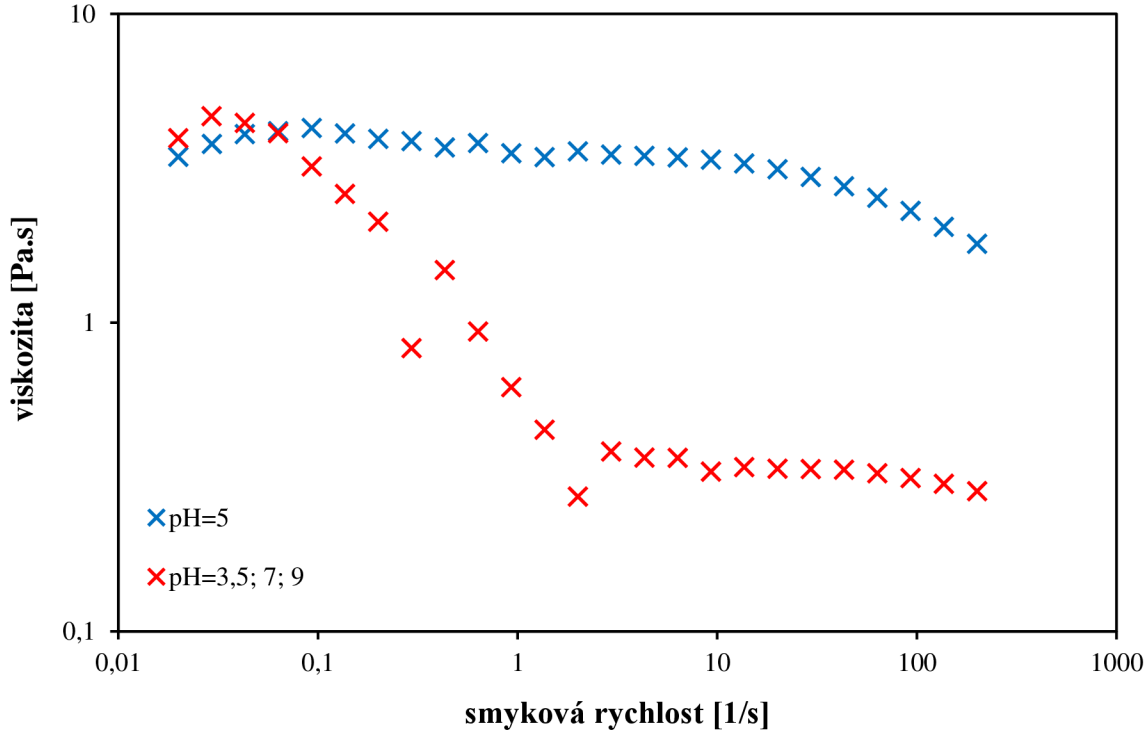
Vliv pH prostředí na tokové vlastnosti hydrogelů taktéž závisel na molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu. Jakýkoliv pH zásah v případě gelů obsahujcích HMW Hya znamenal snížení dynamické viskozity až o dva řády oproti standardnímu vzorku, přičemž tento trend byl zachován pro celou trojici. Všechny vzorky také vykazovaly pseudoplastické chování s newtonským plató při nižších smykových rychlostech. Při vysokých smykových rychlostech a delší době působení deformace naopak vzorky dosahují podobných hodnot viskozity, kdy se jejich křivky závislostí začínají překrývat. Vzrůstající hodnoty pH od 3,5 do 9 mají za následek zvyšování viskozity až o řád (10–100 Pa.s), což může souviset s, již dříve zmíněnou, disociací hyaluronanu, kdy při nižších hodnotách pH této ještě plně nedosáhl a nemůže tak potenciálně využit všechny elektrostatické vazby pro tvorbu gelové sítě. Tento jev pak způsobuje horší mechanické vlastnosti i nižší viskozitu vzorku. Snížená absolutní hodnota viskozity při vlivu jakéhokoliv pH oproti standardu pak pravděpodobně souvisí s vlivem iontové síly samotných pufrů. Popis viskozitní závislosti HMW Hya gelů zobrazje **obr. 45**.

V případě vzorků gelů obsahujících LMW Hya se taktéž objevil propad absolutních hodnot viskozit při nulových smykových rychlostech, a to zhruba o jeden řád. S výjimkou prostředí o hodnotě pH = 5 se u všech vzorků vytratila oblast newtonského plató. Průběh křivek a maximální hodnoty viskozity pak byly pro danou trojici téměř totožné. Před prudkým poklesem viskozity již při nízkých smykových rychlostech se před tímto mohl navíc objevit mírný nárůst hodnot (**obr. 46**). To může vypovídat o relaxaci vzorků a uspořádání gelové sítě v ještě nižších hodnotách deformace. Při vyšších smykových rychlostech však všechny gely základní šestice klesnou na stejnou hodnotu. Pro případ namáhání v podobě např. roztěru kosmetické látky dosáhneme stejného účinku u všech vzorků. Výběrem složení pak můžeme

modulovat tuhost při nulovém namáhání či jiné vlastnosti související s molekulovou hmotností hyaluronanu či koncentrací tenzidu.



Obr. 45: Vliv pH prostředí na tokové křivky vzorku H_1



Obr. 46: Vliv pH prostředí na tokové křivky vzorků gelů s LMW Hya

Výsledky měření vlivu pH prostředí na reologické vlastnosti hydrogelů ukazují, že kromě samotné hodnoty pH použitého pufru musíme brát v potaz také jejich samotné ionty, resp. velikost iontů, i přesto, že použité pufry byly připraveny se stejnou iontovou silou jako roztok NaCl používaný pro standardní šestici. Typický příklad je použití fosfátového pufru, který má přibližně stejné pH jako zkoumaná šestice, přičemž rozdíl ve velikosti a náboji jeho iontů způsobuje odlišné chování, konkrétně zhoršení mechanických vlastností a snížení viskozity.

Nejzásadnější snížení rigidity hydrogelů však bylo pozorováno při použití kyselého pH, kdy toto pravděpodobně protonuje hyaluronan, který není schopný úplné disociace, čímž jsou potlačeny elektrostatické interakce s micelami tenzidu a tím i formování uzlových bodů gelové sítě.

Je tedy vidět, že v závislosti na budoucím použití, můžeme složením gelů modulovat chování v určitém očekávaném prostředí. Stabilita některých vzorků v celé škále pH může být žádoucí stejně tak, jako degradace vzorků s odlišným složením, pro případ např. uvolňovacích aplikací. V případě tokových vlastností je však patrné, že nehledě na použitý gel, dosáhnou všechny velmi podobné viskozity při maximálních smykových rychlostech měření. Pro případ roztěrových či tlačných operací tak můžeme volit potřebné složení gelu nezávisle na tokových vlastnostech v daném pH prostředí.

6.1.6 Vliv přidaných vícemocných iontů

Pro stanovení chování vzorků hydrogelů v rozdílném prostředí byla připravena sada každé šestice gelů s přídavkem Ca^{2+}, Mg^{2+} a Fe^{3+} iontů, dle návodu popsaném v kapitole 5.2.3.

Přítomnost vícemocných iontů ovlivnila vizuální vzhled i reologické chování šestice hydrogelů v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu a použité koncentraci tenzidu. V případě deformačních testů zvětšil jakýkoliv přídavek iontů délku LVO oproti standardu, přičemž tato byla posléze nezávislá na druhu použitého iontu, jak je prezentováno v **tabulce 16**.

Tab. 16: Přehled oblastí LVO v závislosti na iontovém složení prostředí

Vzorek	Lineární viskoelastická oblast [%]			
	Standard	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Fe^{3+}
H_1	19	76	75	104
H_2	4,6	51	226	32
H_3	6,9	29	16	15
H_4	1,9	101	222	gel nevznikl
H_5	4,8	150	217	gel nevznikl
H_6	10	22	gel neznikl	4,7

Z tabulky je patrné, že se snižující se koncentrací tenzidu se snižuje i hodnota LVO. Vliv iontů byl markantnější při použití gelů tvořených LMW Hya. Absolutní hodnota modulů při použití Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů se snížila oproti standardu, přičemž u všech vzorků převažoval viskozitní modul nad elastickým. Z **tabulky 17** je pak patrné i vizuální chování, kdy se díky převaze viskozitního modulu, chovají vzorky více či méně jako viskózní kapalina nežli elastické tuhé těleso. Speciální případ pak představuje použití železitých iontů, které potlačily vznik LMW Hya gelů, s výjimkou jediného případu. To může být způsobeno potlačením elektrostatické interakce polymer-tenzid z důvodu stejného náboje železitého iontu.

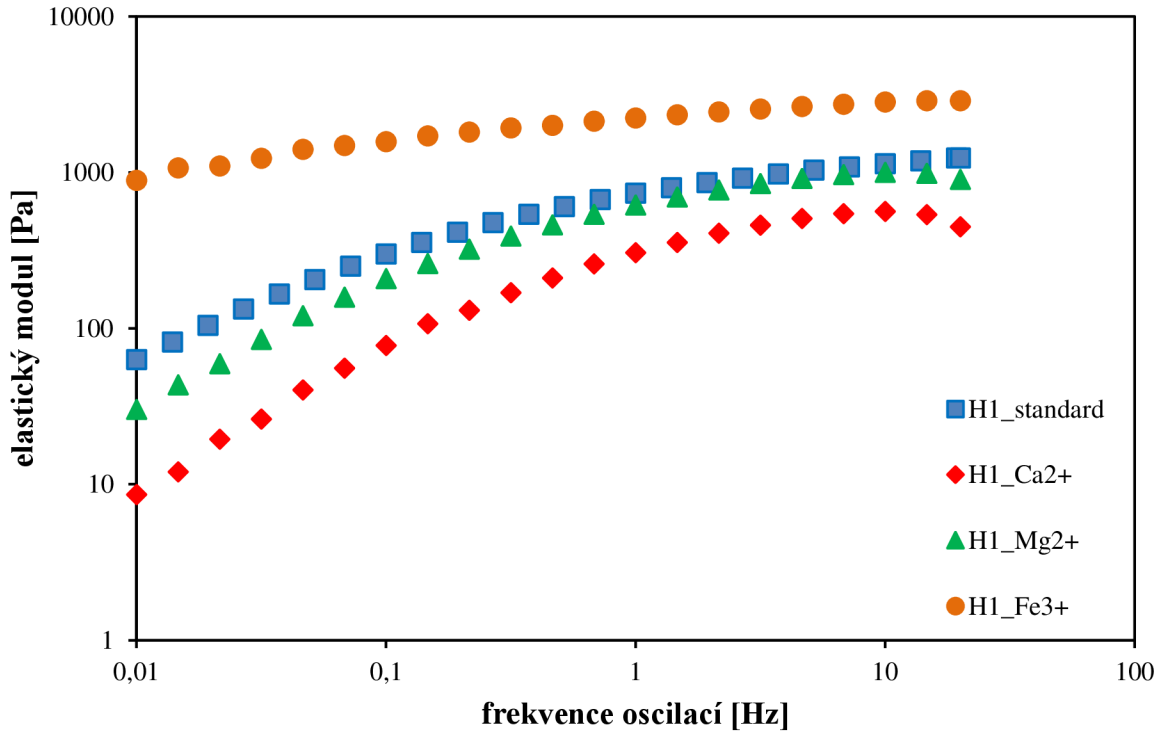
V případě gelů tvořených HMW Hya způsobují opět vápenaté a hořečnaté ionty mírný pokles v absolutní hodnotě obou viskoelastických modulů, přičemž za prodlouženou LVO dochází u hodnoty cca 100 % k rapidnímu poklesu obou modulů. Vizuálně však gely vykazují podobné chování jako jejich standardy. Železité ionty naopak způsobily zabarvení gelů do oranžové barvy a mnohonásobně zvýšily absolutní hodnoty obou modulů. Navíc zde nebyl patrný žádný pokles modulů přes celou škálu měřených amplitud deformací. Výsledné gely zabíraly téměř celý objem vialky a vykazovaly velmi tuhé a plastické chování, kdy se nedaly ukrojit ani špachtlí. Je patrné, že zde má vliv molekulová hmotnost Hya, přičemž zjevné ztužení může být způsobeno známým faktem, že železité ionty jsou schopny samy síťovat řetězce hyaluronanu [117].

Tab. 17: Vizuální charakterizace a viskoelastické chování základní šestice v závislosti na iontovém složení prostředí

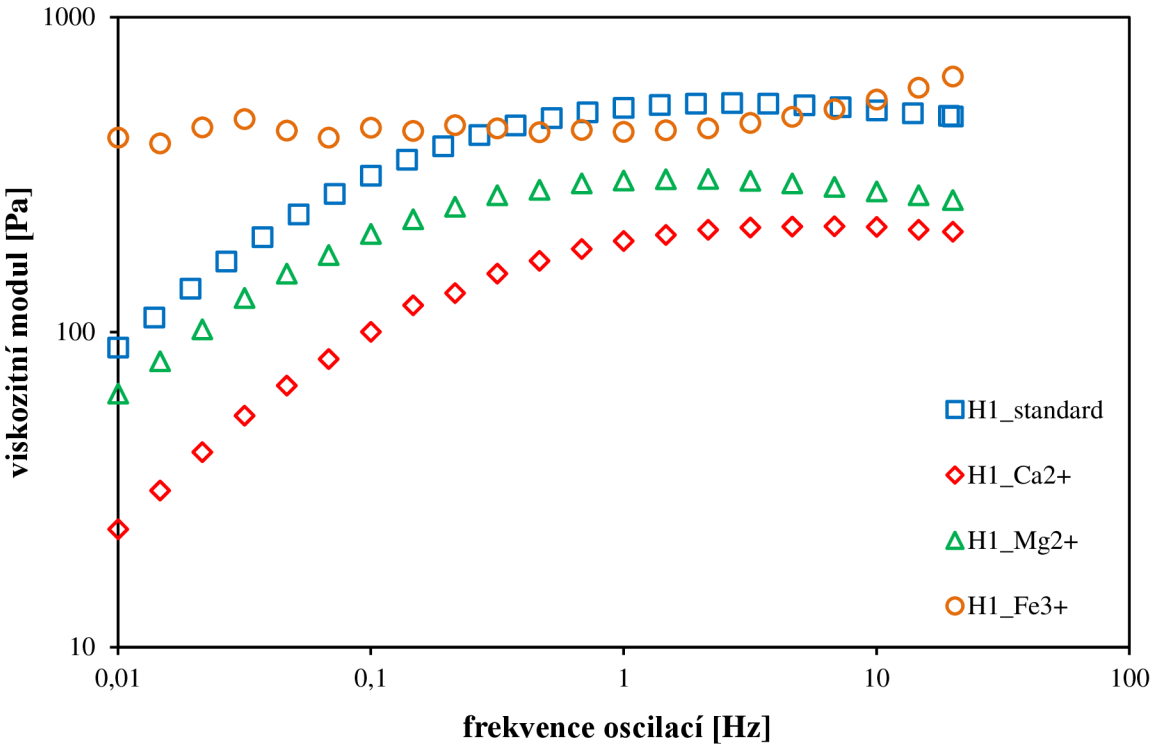
Ionty	Vzorek	Vzhled gelu	Vzhled supernatantu	Množství gelu (cca)	VE chování
Ca^{2+}	H_1	Pevný, mírně zakalený	Čirý	1,5 ml	E
	H_2	Pevný, mírně zakalený	Čirý	1 ml	E
	H_3	Mírně tekutý, zakalený	Zakalený	1 ml	E
	H_4	Mírně tekutý, zakalený	Čirý	1,5 ml	V
	H_5	Mírně tekutý, zakalený	Mírně zakalený	1 ml	V
	H_6	Mírně tekutý, zakalený	Zakalený	0,5 ml	V
Mg^{2+}	H_1	Pevný, mírně zakalený	Čirý	1 ml	E
	H_2	Pevný, mírně zakalený	Čirý	1 ml	E
	H_3	Mírně tekutý, zakalený	Zakalený	0,5 ml	E
	H_4	Mírně tekutý, zakalený	Čirý	1,5 ml	V
	H_5	Mírně tekutý, zakalený	Mírně zakalený	1 ml	V
	H_6	Tekutý, zakalený	Zakalený	0,5 ml	V
Fe^{3+}	H_1	Velmi tuhý	Čirý	3-4 ml	E
	H_2	Velmi tuhý	Čirý	3-4 ml	E
	H_3	Velmi tuhý	Čirý	3-4 ml	E
	H_4	Gel nevznikl, pouze hnědé kulovité sraženiny na spodu vialky			V
	H_5				V
	H_6	Tuhý	Čirý	3-4 ml	E

Frekvenční test pro zkoumání závislosti viskoelastických modulů na vložené elastické deformaci z LVO potvrdil předchozí výsledky z deformačního testu. Železité ionty vykazují opět ztužující efekt u vzorků gelů obsahujících HMW Hya (viz **obr. 47** a **48**, ukázkový vzorek H_1), kdy roste absolutní hodnota elastického modulu nad všechny ostatní, včetně standardu. Bod překřížení obou modulů byl posunut k velmi nízkým hodnotám frekvence oscilací (ve skutečnosti v celé škále měření převažoval elastický modul nad viskozitním), což svědčí o velmi vysoké rigiditě gelové sítě při působení krátkých i dlouhých časů vložené deformace. Bivalentní ionty způsobují mírný pokles absolutních hodnot viskoelastických modulů s nepatrným posunem frekvencí bodu překřížení k nižším hodnotám (viz **tabulka 18**). Velikost mesh size se pro jejich případ téměř nemění od hodnot standardních vzorků, což vyplývá z předchozích faktů, kdy použitím tohoto prostředí nejsou téměř ovlivněny viskoelastické vlastnosti základní šestice gelů. Jak bylo zmíněno dříve, železité ionty jsou schopné síťovat řetězce hyaluronanu, kdy pro HMW Hya gely zůstává tento trend ve velikosti mesh size zachován, jelikož se hodnoty příliš nemění od standardu. Je tedy patrné, že síťování těmito ionty vytvoří dodatečné vazby bez zásahu do velikosti a hustoty domén mezi uzly gelové sítě.

Pro případ LMW Hya gelů, kdy železité ionty zabránily gelačnímu procesu je dle očekávání hodnota mesh size vyšší, jak prezentuje **tabulka 19**. U gelů tvořených LMW Hya je také patrný vliv koncentrace tenzidu, a to při použití vápenatých iontů, kdy s jejím snížením klesají hodnoty frekvencí bodu překřížení viskoelastických modulů. Při použití hořečnatých iontů pro LMW Hya trojici gelů tento trend patrný není.



Obr. 47: Závislost elastického modulu vzorku H_1 na frekvenci oscilací při různém iontovém složení prostředí



Obr. 48: Závislost viskozitního modulu vzorku H_1 na frekvenci oscilací při různém iontovém složení prostředí

Tab. 18: Body překřížení *základní šestice v závislosti na iontovém složení prostředí*

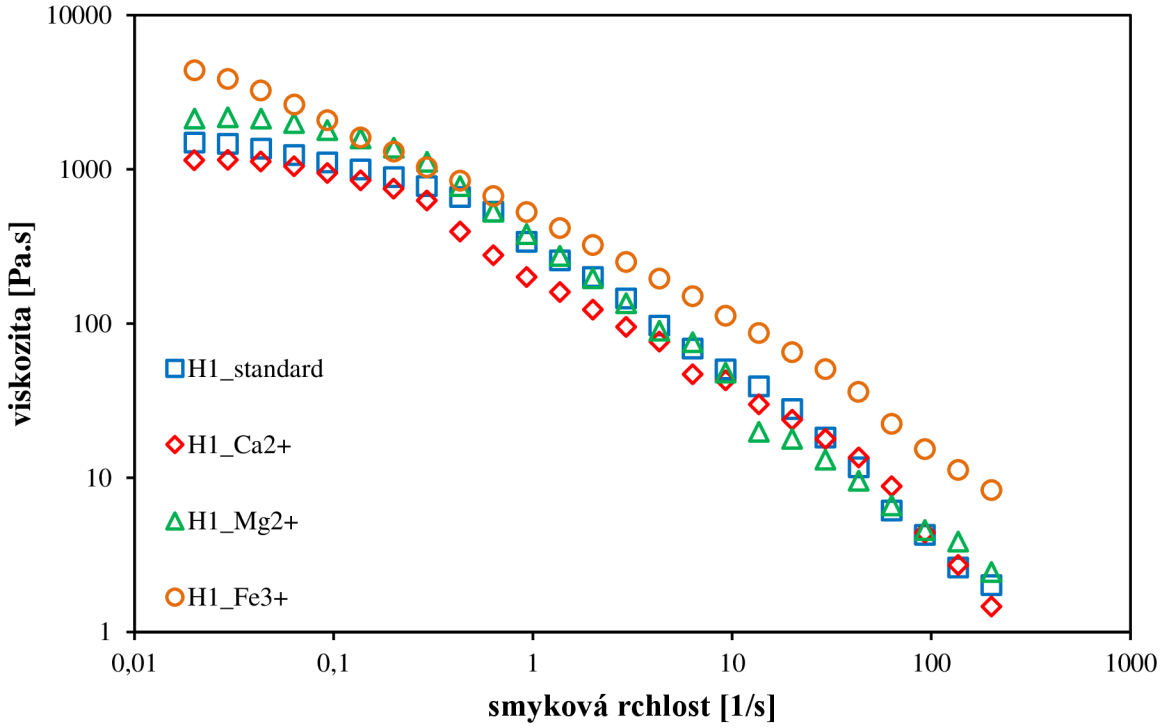
Vzorek	Bod překřížení viskoelastických modulů (cross point)							
	Standard		$CaCl_2$		$MgCl_2.6H_2O$		$FeCl_3$	
	Frekvence [Hz]	Moduly [Pa]	Frekvence [Hz]	Moduly [Pa]	Frekvence [Hz]	Moduly [Pa]	Frekvence [Hz]	Moduly [Pa]
H_1	0,14	324	0,16	206	0,09	201	0,01	228
H_2	0,10	288	0,07	207	0,14	246	< 0,01	-
H_3	0,05	314	0,05	256	0,05	154	< 0,01	-
H_4	0,01	65,6	19,9	478	0,11	90,9	0,12	75,4
H_5	4,64	242	6,51	584	0,15	89,7	0,12	74,5
H_6	2,15	199	2,55	522	0,11	73,6	0,05	76,2

Tab. 19: Mesh size základní šestice v závislosti na iontovém složení prostředí

Vzorek	Mesh size [nm]			
	Standard	$CaCl_2$	$MgCl_2.6H_2O$	$FeCl_3$
H_1	13,01	17,80	16,57	16,01
H_2	14,56	15,82	15,93	20,55
H_3	16,41	15,23	17,64	21,54
H_4	20,42	22,39	22,08	37,99
H_5	22,81	16,93	21,91	38,20
H_6	21,63	15,40	19,43	37,92

Prostředí, obsahující dvojvazné ionty, mělo velmi malý vliv na výsledné tokové křivky, a to u celé šestice gelů (HMW i LMW Hya gely). Pro první trojici (H_1, H_2, H_3) je výsledná viskozita i průběh tokových křivek téměř obdobný jako u standardního vzorku, tedy výskyt newtonského plató v oblasti nižších smykových rychlostí s pseudoplastickým chováním a poklesem viskozity při vyšším namáhání. V maximálních hodnotách smykových rychlostí, použitých při měření, pak standard, i modifikované gely přídavkem dvojmocných iontů, klesnou na velmi podobnou hodnotu viskozity. Přídavek železitých iontů zde neměl tak zásadní vliv jako u deformačních měření, kdy pro HMW Hya gely nedochází k rapidnímu nárůstu viskozity, jak by se očekávalo. Průběh této tokové křivky však výrazně zkracuje newtonské plató, přičemž je patrný téměř okamžitý pokles s narůstající smykovou rychlostí (**obr. 49**). Zajímavý je také jev, kdy se snižující se koncentrací tenzidu roste viskozita při nulových smykových rychlostech tzv. zero-shear viscosity, a to pro všechny zkoumané ionty a celou šestici gelů, s výjimkou přítomnosti Mg^{2+} iontů a gelu tvořeného nejnižší koncentrací tenzidu s HMW Hya, kdy tento dosáhne nejnižší hodnoty viskozity (**tabulka 20**).

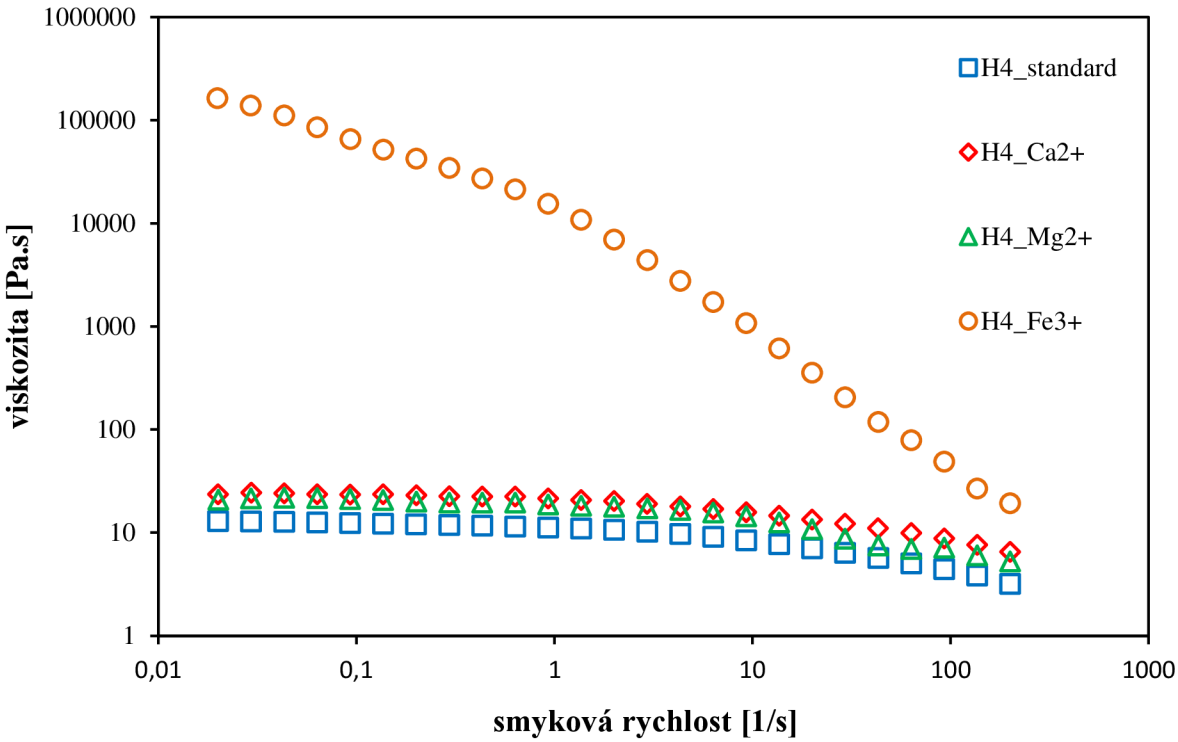
Pro případ gelů tvořených nízkomolekulárním hyaluronanem dochází k mírnému zvýšení zero-shear viscosity u celé trojice gelů, a to při použití dvojvazných iontů v prostředí. Rozdíl při použití těchto iontů je zanedbatelný. Oproti HMW Hya gelům však zde, u jejich nízkomolekulárních protějšků, je vliv přídavku železitých iontů ($FeCl_3$) velmi výrazný, kdy tento zvyšuje viskozitu gelů v celém rozsahu smykových rychlostí až o 4 řády, a to i oproti HMW Hya gelům. Zde bereme v potaz, že byla změřena viskozita jak gelového vzorku H_6, tak i viskózních sraženin vzorků H_4 a H_5. **Obr. 50** prezentuje tento jev pro gely obsahující nízkomolekulární hyaluronan, konkrétně ukazkový vzorek H_4.



Obr. 49: Vliv iontového prostředí na tokové křivky HMW Hya gelů (vzorek H_1)

Tab. 20: Přehled viskozitních parametrů vzorků v závislosti na iontovém protředí

Vzorek		η [Pa.s]/γ = 0 s^{-1}	η [Pa.s]/γ = ∞ s^{-1}
$CaCl_2$	H_1	1364	6,31E-08
	H_2	7298	1,95
	H_3	9657	3,62
	H_4	24,75	4,84E-01
	H_5	96,11	3,60
	H_6	155,8	5,28
$MgCl_2.6H_2O$	H_1	2476	1,07
	H_2	3684	2,12
	H_3	1032	1,74E-06
	H_4	21,11	3,90
	H_5	31,22	2,81E-05
	H_6	150,5	2,40
$FeCl_3$	H_1	6344	9,47E-07
	H_2	6173	1,68E-06
	H_3	7214	0,05
	H_4	1,18E+05	3,65E-04
	H_5	1,33E+05	0,04
	H_6	3,35E+05	0,06



Obr. 50: Vliv iontového prostředí na tokové křivky LMW Hya gelů (vzorek H_4)

6.2 Analytická část

V následující kapitole budou diskutovány analytické techniky, které byly, s podporou kolegů účastnících se projektu 16-12477S, použity pro zkoumání strukturních vlastností a složení představených hydrogelů. Jedná se zejména o infračervenou spektroskopii, modifikovanou Mahrousovu metodu, iontovou chromatografii a optickou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem. První dvě zmíněné se zabývají především koncentračním složením hlavních komponent (Hya + tenzid) v supernatantech nad gelem, z čehož můžeme usuzovat samotné složení gelů, resp. kolik % původních stavebních látek je potřeba na tvorbu gelu. S ohledem na daná fakta můžeme modifikovat vlastnosti gelů přidáním či odebráním vstupních komponent z důvodu změny reologie či antiseptických vlastností. Pomocí iontové chromatografie a optické emisní spektrometrie byly stanoveny ionty, které přísluší konkrétní stavební jednotce v celém systému. Dle toho je pak možno stanovit koncentrační obsah příslušné složky – hyaluronanu, Septonexu či prostředí v gelu a supernatantu. Veškerá předložená data jsou z důvodu spolupráce více lidí předložena v originální podobě.

6.2.1 Infračervená spektroskopie

Metoda ATR-FTIR spektroskopie byla použita pro celou sadu vzorků, tzn. gely H_1–H_6. Podrobný popis přípravy i vyhodnocení dat je popsán v kapitole 5.3.3. Předložená data jsou také součástí publikace, která je obsažena v příloze (viz kapitola 12) [118].

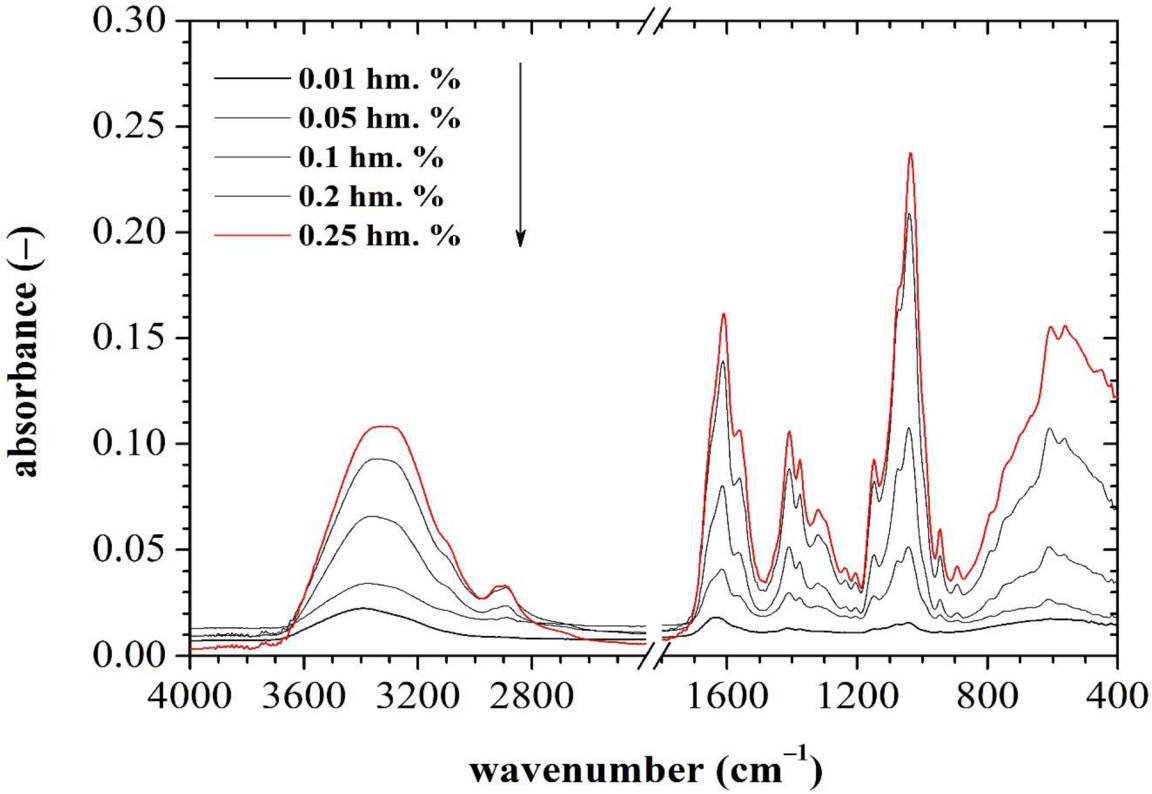
Z ukázky kalibračního měření LMW a HMW hyaluronanu, prezentovaného na **obr. 51** a **52**, jsou vidět nejdůležitější vlnočty vibračních pásů, jejichž účast se vyskytuje i pro vzorky hydrogelů. Jedná se zejména o pásy alifatických částí molekul, hydroxylových nebo polysacharidových skupin.

Všechna spektra hydrogelů obsahují široký pás vlnočtu 3 400–3 300 cm^{-1}, který odpovídá natahování O–H vazeb kapalné vody. Přítomnost molekul vody je také zastoupena u vlnočtu 1 645 cm^{-1}, kdy se jedná o valenční vibraci vodíkových vazeb, které tvoří dimer vody. Alifatický řetězec se nachází v rozmezí vlnočtů 2 960–2 840 cm^{-1}, kde jsou pozorovány ostré píky v hodnotách 2 919 a 2 850 cm^{-1}, které znázorňují symetrickou valenční vibraci methylenových C–H skupin. Absorpční pás antisymetrické valenční vibrace byl u hodnoty 2 956 cm^{-1} pozorován pouze v případě LMW Hya gelů (H_4, H_5, H_6), jak je vidět na **obr. 52**. Deformační vibrace $–CH_2–$ a $–CH_3$ skupin se nacházejí u hodnot vlnočtů 1 470 a 1 465 cm^{-1}. Zde byl opět pozorován vliv molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu, a to tak, že s jejím zvyšováním rostla intenzita daných píků. U všech hydrogelů se pak projevila také deformační vibrace methylových skupin daná vlnočtem 1 377 cm^{-1}.

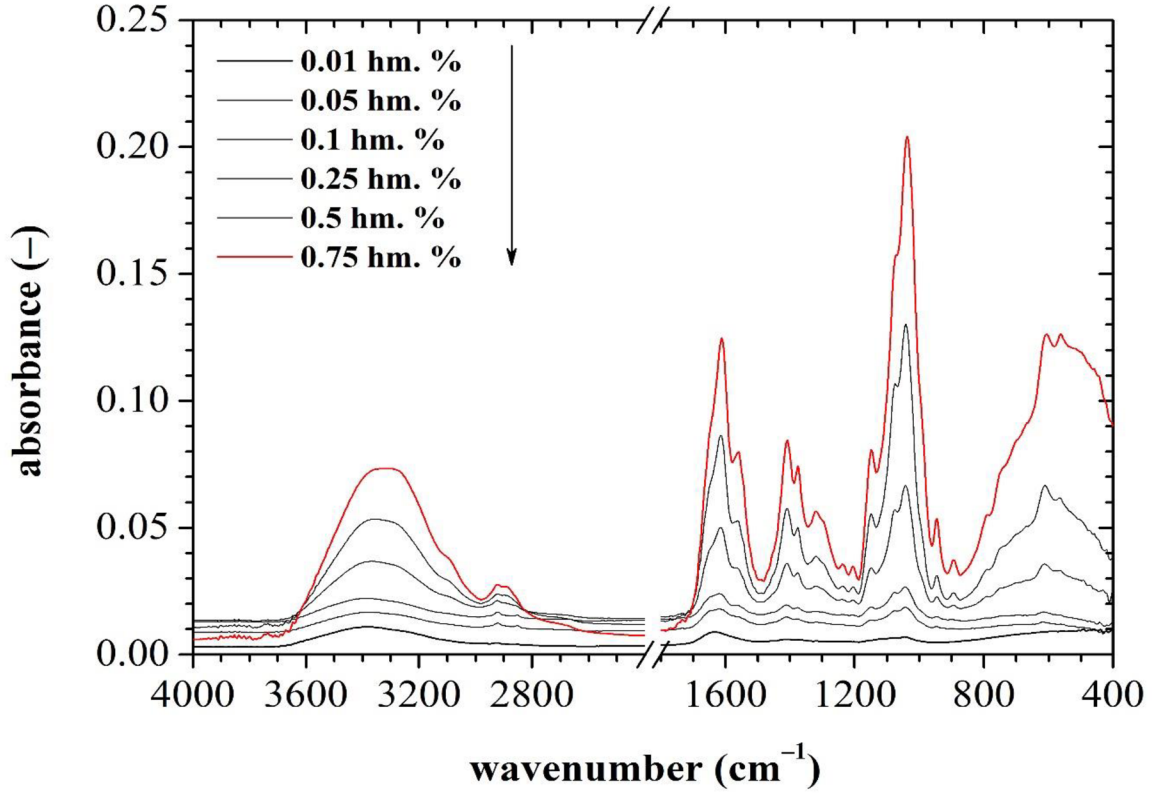
Na **obr. 53**, který prezentuje kalibrační spektra Septonexu, jsou vidět stejně významné pásy vibrací, popsané výše. Přítomnost dlouhého uhlovodíkového řetězce se zde projevuje deformační vibrací C–H skupin při vlnočtu 719 cm^{-1}. Další takové píky lze naléz u hodntoy vlnočtu 1 300 a 1 315 cm^{-1}.

Všechny hydrogelové vzorky obsahují ostrý intenzivní pík v oblasti vlnočtu 1 734 cm^{-1}, který reprezentuje ethyl esterové funkční skupiny. Esterové skupiny jsou také zastoupeny dvěma pásy vlnočtů 1 241 a 1 190 cm^{-1}, přičemž první jmenovaný pramení z valenčních vibrací C–O skupin alifatických esterů a druhý popisuje valenční vibraci C–N skupin terciárních aminů. Všechny hyaluronové hydrogely pak také obsahují přítomnost valenční vibrace karboxylového aniontu, a to při vlnočtech 1 610 a 1 405 cm^{-1}. Méně intenzivní pás vibrací se nachází při vlnočtu 1 562 cm^{-1}, který je připisován sekundární amidové skupině. Valenční vibrace glykosidové skupiny C–O–C je ve spektru vidět při vlnočtu 1 140 cm^{-1}. Unikátní vibrace pro hyaluronové hydrogely se pak nachází v oblasti otisku prstu, při vlnočtech 1 100–900 cm^{-1},

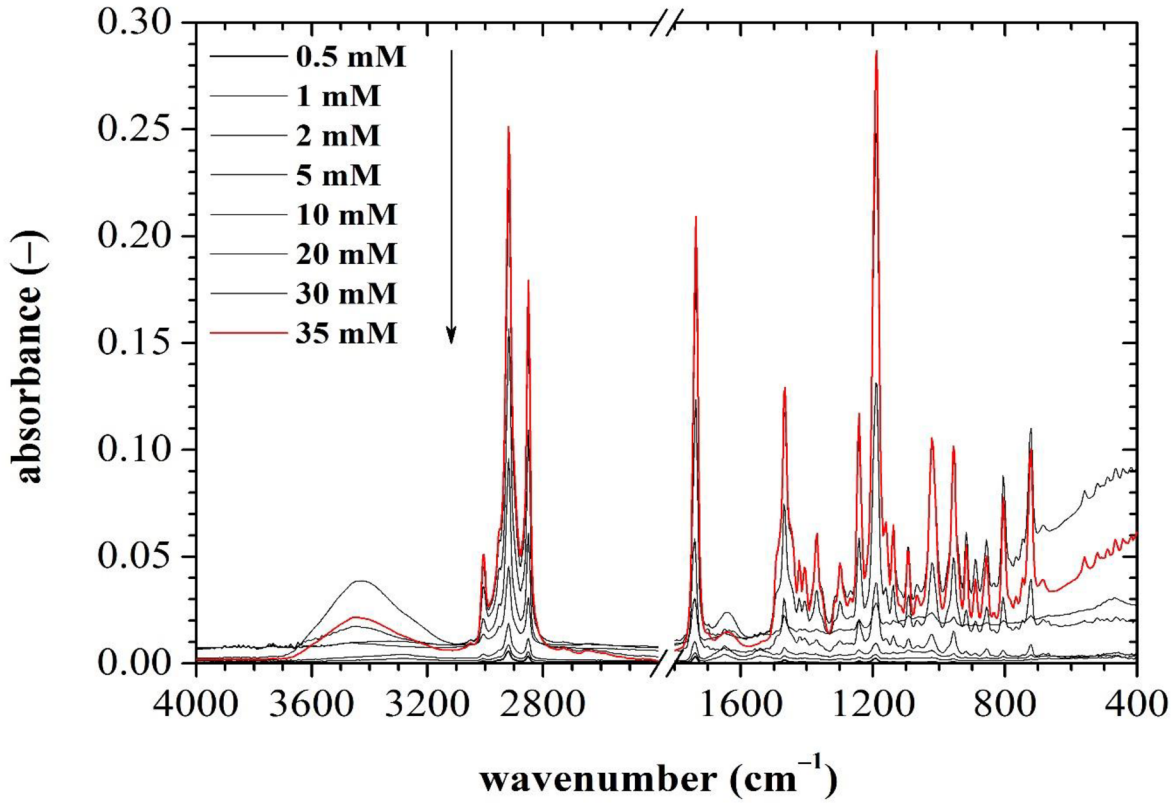
konkrétně je zde patrný ostrý intenzivní pík v hodnotách 1 041–1 032 cm^{-1}. Tento pás odpovídá C–O vibracím různých hydroxylových skupin.



Obr. 51: IČ-ATR spektrum roztoku HMW hyaluronanu



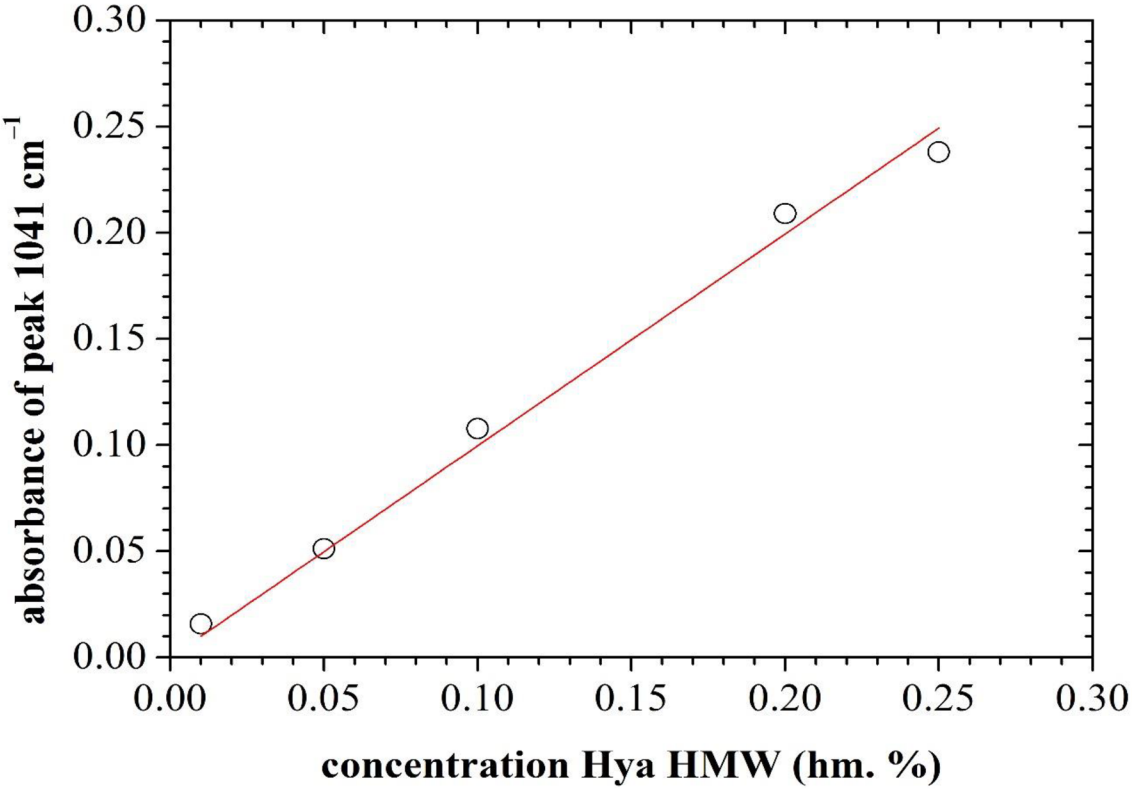
Obr. 52: IČ-ATR spektrum roztoku LMW hyaluronanu



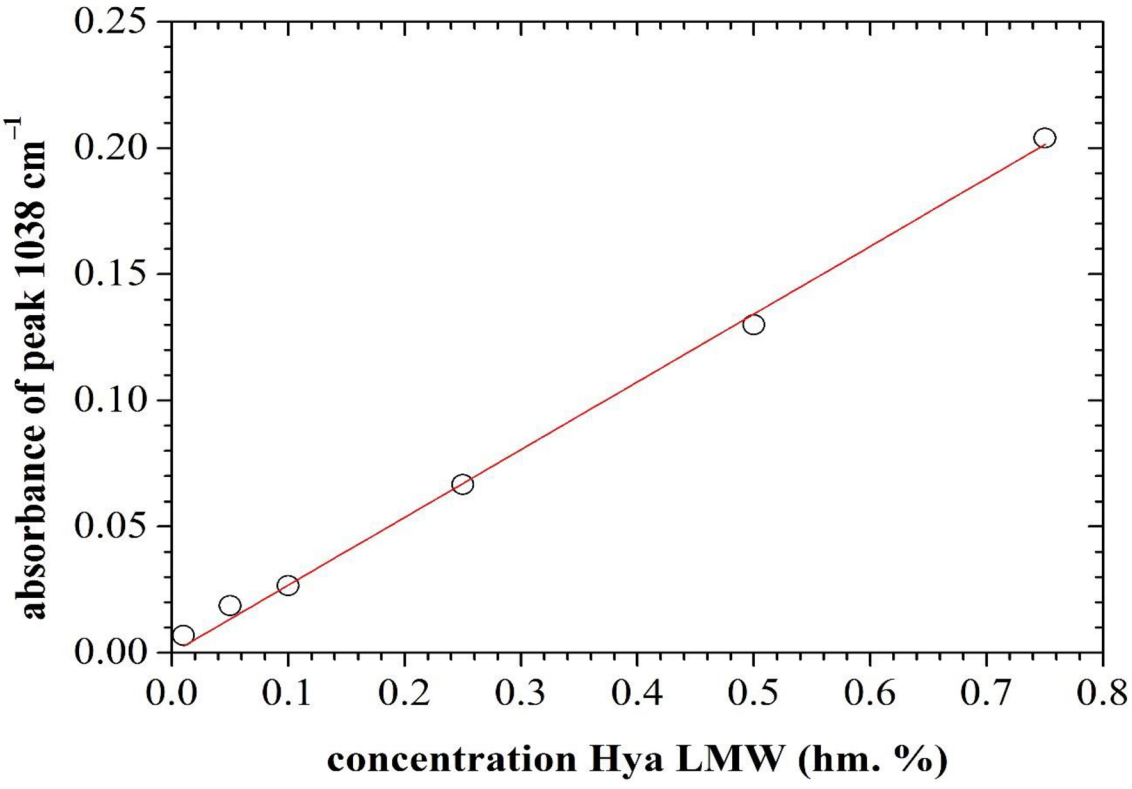
Obr. 53: IČ-ATR spektrum roztoku Septonexu

Po změření absorpčních spekter kalibračních roztoků hyaluronanu vyplynulo, že nejspolehlivější vibrační pásy se nacházejí v oblasti vlnočtů 1 130–1 065 cm^{-1} a 1 085–1 020 cm^{-1}. První rozmezí odpovídá vibraci C–OH v sekundárních alkoholech, a také vibraci glykosidické skupiny C–O–C. Druhé pak odpovídá vibraci C–OH v primárních alkoholech. Z předchozích obrázků je patrné, že pro čitelnost píků je vhodnější použití vyšší koncentrace, než námi uvedené limitní 0,01 % hm., a to minimálně 0,1 % hm. I tak však byla vytvořena lineární kalibrace, kdy pro následné výpočty byly vybrány konkrétní píky při vlnočtech 1 041 cm^{-1} pro případ HMW Hya gelů a 1 038 cm^{-1} pro případ LMW Hya gelů, jak znázorňují **obr. 54** a **55**. Vzhledem k lineární závislosti a vysoké hodnotě spolehlivosti (R^2 = 0,999) můžeme konstatovat, že touto metodou jsme schopni stanovit koncentraci neznámého vzorku hyaluronanu ve vodném roztoku již od koncentrace 0,01 % hm. do hodnoty přibližně 1 % hm., pravděpodobně i vyšší.

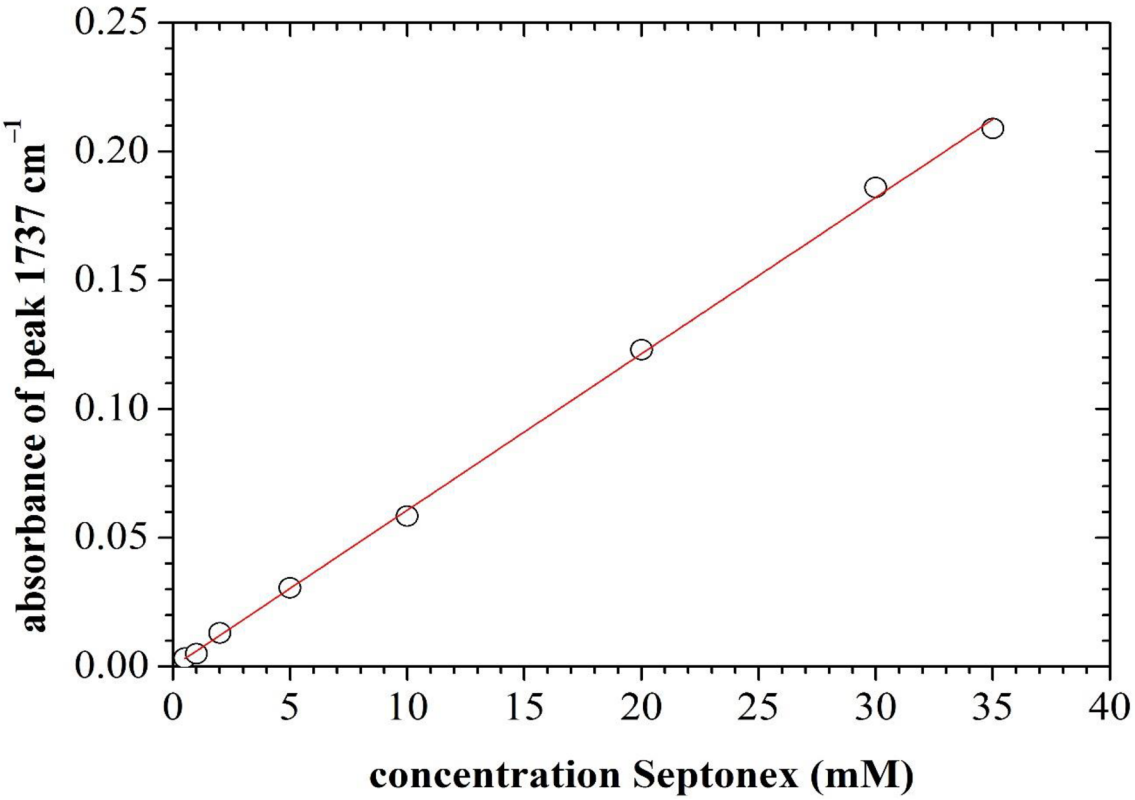
Pro případ Septonexu se jako nejspolehlivější charakteristické pásy jeví ty, které se nacházejí v rozmezí vlnočtů 1 750–1 690 cm^{-1} a 1 300–1 150 cm^{-1}, kdy oba zmíněné odpovídají vibraci nasyceného esteru. Konkrétní hodnota, použitá pro výpočet kalibračních přímek, byla zvolena 1 737 cm^{-1}, kdy tato měření opět vykazovala lineární závislost s vysokou hodnotou spolehlivosti (**obr. 56**). Z výsledného je patrné, že jsme touto metodou schopni zjistit neznámý obsah Septonexu ve vzorku s citlivostí až na minimální hodnotu koncentrace 0,5 mM. Z předchozích zkušeností na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně je známé, že námi použitou maximální hodnotu koncentrace, 35 mM, můžeme několikanásobně překročit, až k měření hodnot okolo koncentrace 150 mM.



Obr. 54: Kalibrační závislost HMW Hya



Obr. 55: Kalibrační závislost LMW Hya



Obr. 56: Kalibrační závislost Septonexu

Veškerá naměřená data jsou přehledně prezentována v **tabulce 21**. První tři sloupce označují navážky či zvážené výsledné množství roztoků hyaluronanu, Septonexu a supernatantu, vzniklého fázovou separací nad gelem. Výsledná koncentrace hyaluronanu v % hm. a Septonexu v mM je obsažena v supernatantu gelů a byla vypočtena pomocí kalibračních křivek při měření vzorků gelů, jejichž supernatantové složení nebylo známo. Procentuální přepočtení obsahu haluronanu či Septonexu v supernatantu (nebo gelu) bylo, pro první z nich, provedeno hmotnostním poměrem, pro druhý v pořadí poměrem látkových množství, při uvažování jednotkové hustoty roztoků. Toto procentuální zastoupení je vztaženo na původní navážku komponent, tzn. kolik % z hmotnosti (Hya) nebo látkového množství (Septonex) použitého pro tyto navážky roztoků přešlo do supernatantu. Zbytek do sta procent se poté nachází v gelu. Pětkrát opakované měření vzorku H_1, pro potvrzení reprodukovatelnosti, vykazuje mírnou odchylku od původního vzorku základní šestice. Jednalo se však o nově namíchanou sadu, která byla změřena v jiný den. S ohledem na proměnlivost podmínek je odchylka dat v rámci jednotek procent zanedbatelná. Samotná pětice pak vykazuje téměř totožné hodnoty.

Jak je patrné z experimentů základní šestice, obsah hyaluronanu v supernatanu se zásadně zvyšuje u vzorků H_5 a H_6. To potvrzují i reologická měření, kdy zjevně menší obsah hyaluronanu v gelu způsoboval jeho horší mechanické vlastnosti, naopak velmi viskózní supernatant byl naopak způsoben právě přebytkem hyaluronanu v něm. Pro dané dva kandidáty je vidět, že procentuální zastoupení Hya v supernatantu dosahuje téměř 50 %. Ve výsledku to může znamenat, že při takto malých koncentracích nedosahuje síť hyaluronanu požadovaného počtu vazných míst pro navázání micel tenzidu a tvorbu uzlů gelové sítě, proto je přebytečný hyaluronan nevyužit a vyloučen do supernatantu. Obsah Septonexu v supernatantu tomuto faktu taktéž nasvědčuje, kdy dosahuje hodnot okolo 20 %. Stejný jev je pozorován u vzorku

H_3. Zde je ovšem obsah Hya v supernatantu relativně nízký, což nasvědčuje využití veškerého potřebného Septonexu (cca 80 %) na tvorbu elektrostatických interakcí, přičemž zbytek je opět vyloučen do supernatantu. U nejpevnějších vzorků H_1 a H_2, příp. i H_4, je vidět očekávaný trend, kdy téměř všechno množství vstupních komponent bylo použito na tvorbu hydrogelu.

Tab. 21: Složení gelů stanovené metodou infračervené spektroskopie

Vzorek	Hya [g]	Sept [g]	Sup [g]	*c* Hya [% hm.]	*c* Sept [mM]	Hya v sup [%]	Sept v sup [%]
H_1	3,16	2,94	4,67	0,0383	10,80	2,82	8,57
H_2	3,09	2,94	4,98	0,1010	7,94	8,14	13,44
H_3	3,07	2,95	4,99	0,0859	6,57	6,99	22,20
H_4	2,84	2,95	4,46	0,1648	13,40	12,93	10,13
H_5	2,94	2,95	4,92	0,5576	10,66	46,67	17,77
H_6	3,10	2,95	5,50	0,5807	6,81	51,50	25,41
Reprodukovatelnost							
H_1 (1)	3,16	2,95	4,26	0,0187	13,60	1,26	9,83
H_1 (2)	3,24	2,96	4,18	0,0195	14,84	1,26	10,48
H_1 (3)	3,10	2,96	4,08	0,0211	15,64	1,39	10,79
H_1 (4)	3,14	2,93	3,89	0,0188	14,02	1,16	9,29
H_1 (5)	3,34	2,92	4,13	0,0186	13,48	1,15	9,55

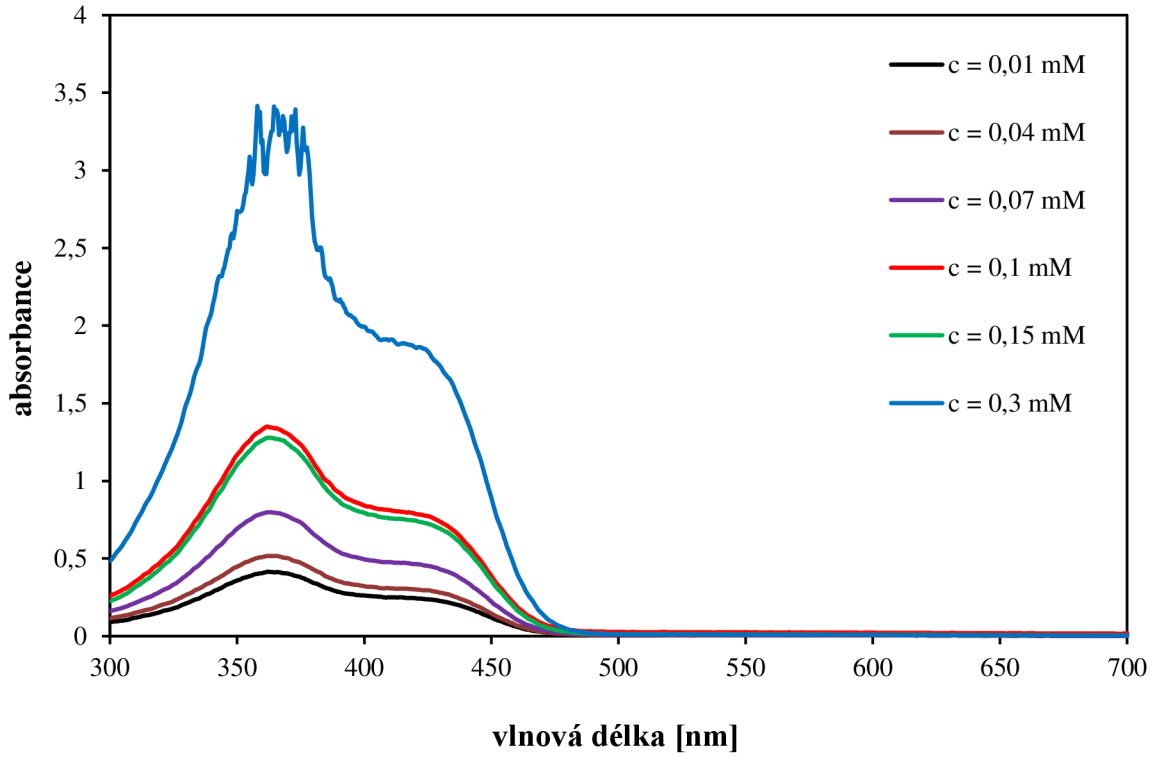
Z výsledků této metody je patrné, že je možné ji použít jako levnou a dobře přístupnou pro stanovení složení neznámých vzorků tohoto typu. Citlivost i rozsah měření je, pro případ hydrogelů, uspokojivá s ohledem na budoucí aplikace. Měřením bylo dokázáno, že jsme schopni stanovit koncentrace hyaluronanu v rozmězí 0,05–1 %, velmi pravděpodobně i vyšší, a to nehledě na použitou molekulovou hmotnost. Pro případ Septonexu se jednalo o rozmezí přibližně 1–50 mM. Z předchozí zkušenosti je i zde pravděpodobné použití vyšších koncentrací, až do hodnot 150 mM.

Stanovení přesného složení hydrogelů je důležité pro pochopení jejich vnitřní struktury. Z toho se pak odvíjí možnost a zvážení použití určitého potřebného množství materiálu při uvažování jejich potenciálu na poli medicínských aplikací, zejména při řešení nežádoucích účinků či ekonomické stránky.

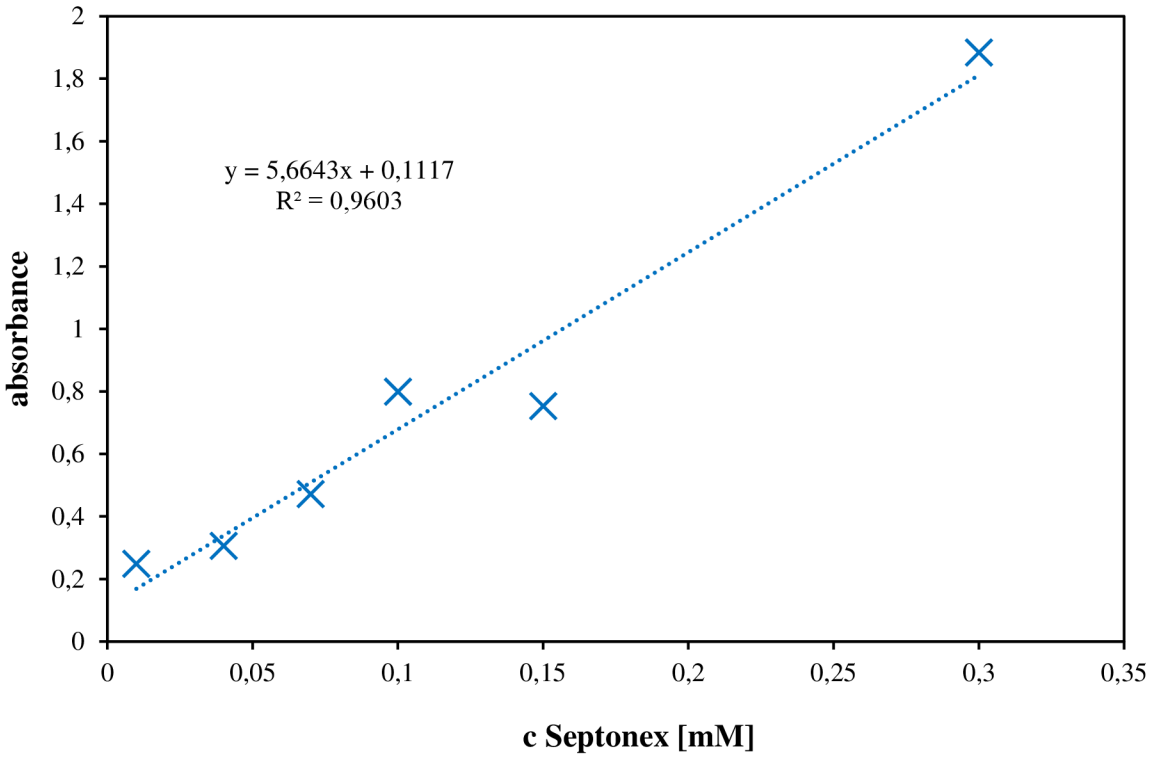
6.2.2 Modifikovaná Mahrousova metoda

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že se tato metoda používá pro stanovení neznámé koncentrace tenzidu v roztoku, a to pomocí tvorby jeho komplexu s kyselinou pikrovou. V našem případě bylo cílem stanovit distribuci tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid, konkrétně u vzorků výše popsaných hydrogelů (tedy Septonex-hyaluronan). Tím je poté možno zjistit procentuální zastoupení vstupních komponent pro potřebnou tvorbu gelů, z čehož vyplývá případná úspora materiálu či modifikace vlastností. Po předchozí zkušenosti s touto metodou na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně, a to jak s tenzidem CTAB, tak se Septonexem, byla tato metoda provedena pětkrát, pro reprezentativní vzorek gelu H_1, kdy byla ověřena její funkčnost a použitelnost. Výsledná data byla porovnána s výsledky infračervené spektroskopie, popsané v kapitole 6.2.1. Podrobný postup přípravy vzorků a nastavení přístroje pro aplikování Mahrousovy metody je popsán v kapitole 5.3.4.

Pro stanovení neznámého obsahu Septonexu v roztoku supernatantu je nejprve nutné sestavit závislost absorbance na koncentraci vzorku v daném koncentračním rozmezí, tedy sestrojit kalibrační křivku. Ta byla připravena pro sadu vzorků Septonexu o koncentracích 0,01; 0,04; 0,07; 0,1; 0,15 a 0,3 mM. Absorpční spektra koncentrační řady Septonexu jsou zobrazena na **obr. 57**, přičemž samotnou závislost absorbance na koncentraci prezentuje **obr. 58**.



Obr. 57: Absorpční spektra koncentrační řady Septonexu v komplexu s kyselinou pikrovou

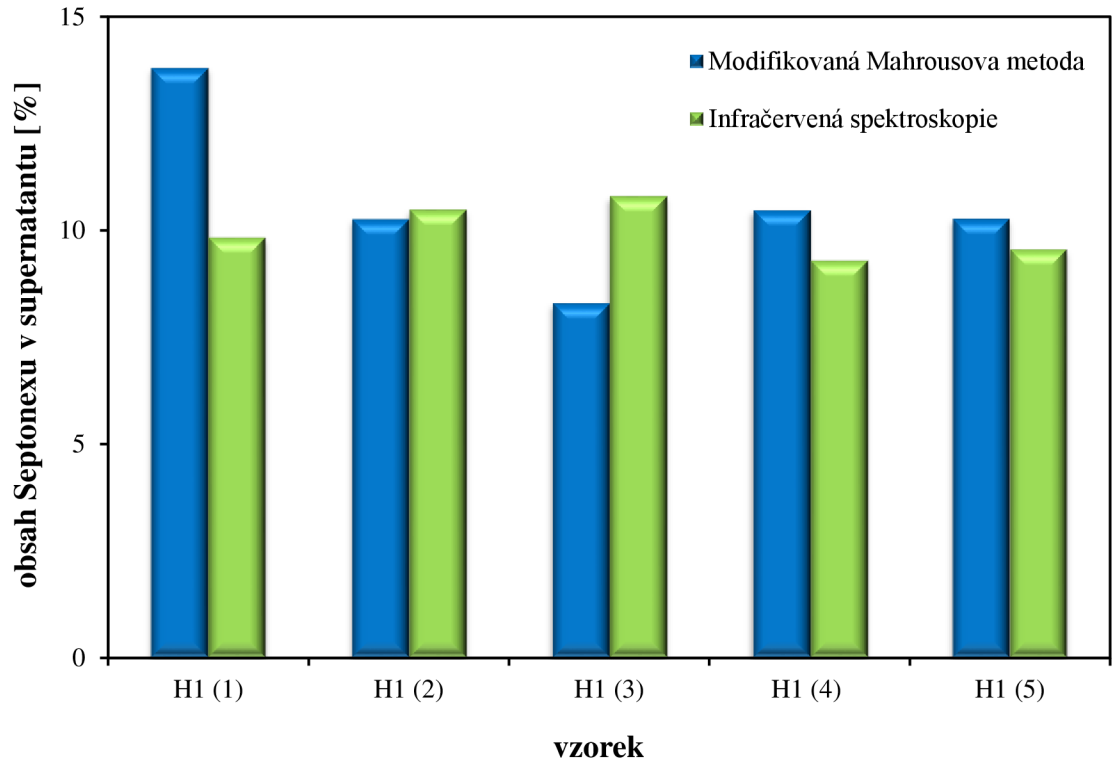


Obr. 58: Kalibrační křivka Septonexu v 0,15 M NaCl

Z tvaru křivek absorpčních spekter Septonexu v komplexu s kyselinou pikrovou je patrné, že se vzrůstající koncentrací tenzidu vzrůstá i absorbance. Tento fakt vyplývá z Lambert-Beerova zákona. Maximum absorpčního spektra vzorků se pohybuje v rozmezí hodnot vlnových délek 360 až 364 nm. Dle literatury i předchozích zkušeností však byla zvolena detekční vlnová délka 415,5 nm, kdy je absorbance nižší a je proto možné vyhodnotit i vzorky s vyšší koncentrací, než při vlnové délce 360 nm. Stejná detekční vlnová délka byla použita i pro stanovení neznámé koncentrace Septonexu ve vzorcích supernatantů. Pro toto měření byly vzorky Septonexu o neznámé koncentraci zředěny 50krát. Všechny vzorky byly v průběhu měření váženy. Z kalibrační závislost byly posléze vypočteny hodnoty neznámých koncentrací Septonexu. **Tabulka 22** prezentuje výsledné procentuální poměry látkových množství Septonexu v gelu či supernatantu. Data byla porovnána i s výsledky infračervené spektroskopie (poslední sloupeček tabulky). Přehledněji jsou dané hodnoty vidět i na **obr. 59**.

Tab. 22: Stanovení koncentrace Septonexu v supernatantu gelů

Vzorek	Sept ve vzorku [mmol]	A [415,5 nm]	Sept v sup [mM]	Sept v sup [mmol]	Sept v gelu [%]	Sept v sup (Mahrous) [%]	Sept v sup (FTIR) [%]
H_1 (1)	3,16	2,27	19,09	0,081	86,20	13,80	9,83
H_1 (2)	3,09	1,67	13,75	0,061	89,74	10,26	10,48
H_1 (3)	3,07	1,36	11,05	0,049	91,71	8,29	10,79
H_1 (4)	2,84	1,71	14,06	0,061	89,53	10,47	9,29
H_1 (5)	2,94	1,64	13,48	0,061	89,73	10,27	9,55



Obr. 59: Srovnání obsahu Septonexu v supernatantu gelů změřeného pomocí Mahrousovy metody a FTIR

Z tabulky i grafu je patrné, že modifikovaná Mahrousova metoda je spolehlivá pro stanovení neznámých koncentrací tenzidu ve vzorku, a to v rozpětí přibližně 0,01–0,2 mM, bez nutnosti ředění. Při očekávání vyšší koncentrace je nutno vzorky zředit v požadovaném poměru 50krát, 100krát či vícekrát a toto poté zahrnout do výpočtu.

Z výsledků vyplývá uspokojivá shoda naměřených dat touto metodou v porovnání s předchozí infračervenou spektroskopií, kdy se výsledný obsah Septonexu v supernatantu či gelu lišil v řádu jednotek procent. S ohledem na dynamiku systémů, které se v závislosti na okolních podmínkách či přípravě mohou nepatrně lišit reologicky či homogenizací vnitřních komponent, a kdy nelze nikdy připravit dva naprosto totožné vzorky, nehledě na množství instrumentálních kroků v průběhu Mahrousovy metody, je tato shoda dat více než vyhovující. Zároveň tyto závěry taktéž korelovaly s předchozí zkušeností s podobnými systémy na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně, a to jak při použití gelů tvořených obdobně hyaluronanem a Septonexem, které byly připraveny a změřeny před několika lety, stejně tak při použití strukturně podobného tenzidu CTAB namísto Septonexu ve struktuře gelu. To dokazuje možnost použít Mahrousovu metodu jako primární nebo jako kontrolní pro dané typy experimentů, kdy právě zjištění vnitřní struktury gelů je žádoucí s ohledem na jejich budoucí aplikace a modulace vlastností. Její nevýhoda však spočívá ve větším množství úkonů a celkovém času celé měřící operace, stejně tak ve vyšší spotřebě materiálu.

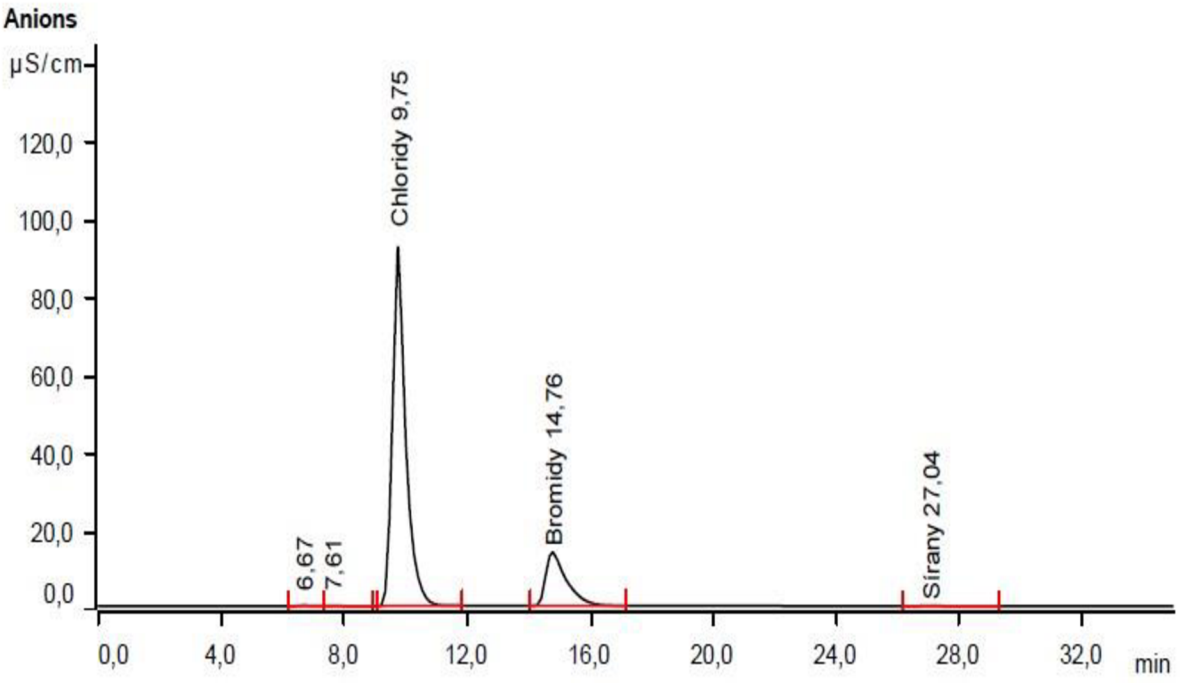
6.2.3 Stanovení anorganických iontů

Jako doplňkové analytické metody byly vybrány iontová chromatografie a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, obě pro stanovení anorganických iontů ve vzorcích supernatantů našich hydrogelů. Popis metod, nastavení přístrojů i příprava vzorků jsou popsány v kapitole 5.3.5. Měření bylo provedeno vícekrát v rozmezí několika let, a to pro

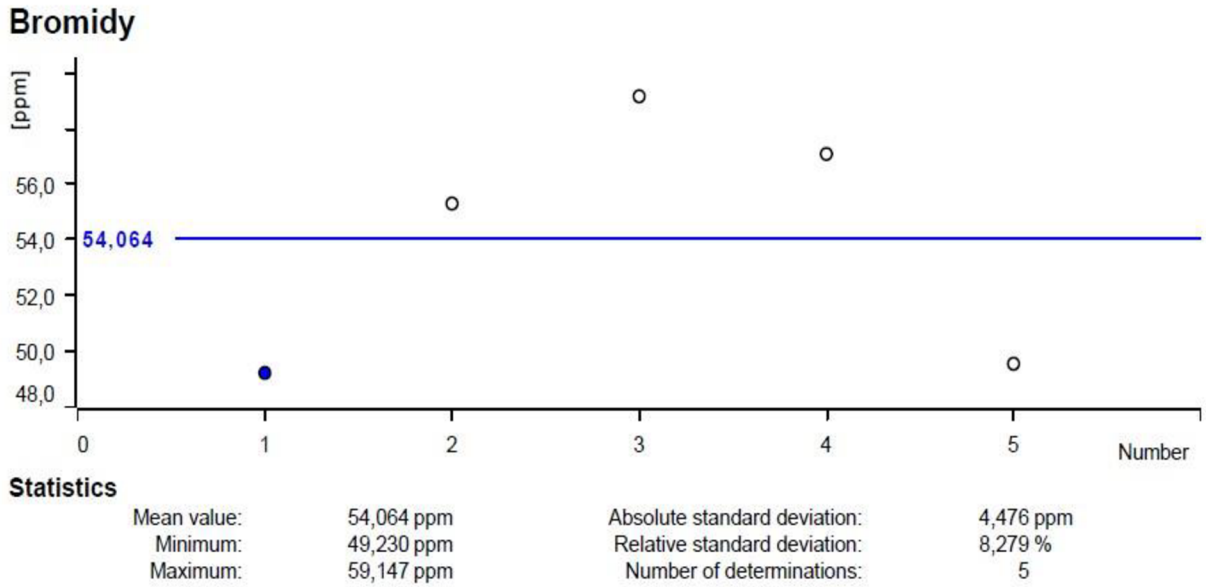
supernatanty hydrogelů, které byly požadovaně zředěny. V některých případech, zejména u vzorků H_5 a H_6, nemohlo být, v závislosti na jejich zakalení, měření provedeno, což je zaznamenáno ve výsledkových tabulkách (**nd** – *not detected*). Toto je dáno velkou dynamikou systému, podmínkami přípravy, např. teplotou v laboratoři atd. Je možné, že se z reologického hlediska gel chová stejně, ovšem čirost a homogenizace vstupních materiálů mohou být rozdílné. Nepatrný obsah nehomogenizovaných celků v supernatantech pak u takto citlivých metod dělá problém. Vzorek H_1 byl také změřen několikrát v samostatných sadách pro kontrolu reprodukovatelnosti metody.

Jako první byl vyhodnocen obsah **bromidových aniontů** v roztocích supernatantů, pro vzorky H_1–H_6. Jak již bylo řečeno v kapitole 5.3.5., jejich obsah přímo odpovídá obsahu Septonexu ve vzorku supernatantu. Z toho pak lze usuzovat kolik, z jeho vstupního množství, je zakomponováno do struktury gelu.

Samotný výpočet neznámého obsahu ve vzorku probíhá z retenčních časů, které software přepočte na jednotky *ppm*, tedy $mg.dm^{-3}$. Následně je zohledněno případné ředění vzorku a vydělením této koncentrace molární hmotností stanovovaného analytu (Septonexu) dostáváme molární koncentraci $mol.dm^{-3}$. Ukázka typického chromatogramu vzorků gelů je prezentována na **obr. 60**, kde je vidět současné stanovení chloridů. Průběh a odchylky měření pro 5krát stanovený vzorek H_1 je zobrazen na **obr. 61**. Pro daný typ nejideálnějšího vzorku hydrogelu je patrná velmi dobrá shoda měření s chybou okolo 8 %.



Obr. 60: Typický chromatogram vzorků hydrogelů H_1–H_6



Obr. 61: Reprodukovatelnost měření vzorku H_1, převzato z vyhodnocovacího softwaru chromatografu

Výsledné hodnoty stanovení obsahu bromidových iontů, a tedy Septonexu, v průběhu tří let a při různém zředění jsou zobrazeny v **tabulce 23**. Zvýrazněné sloupečky zobrazují porovnání s metodou infračervené spektroskopie, symbol **nd** představuje vzorky, u nichž neproběhlo měření z důvodu zakalení. **Tabulka 24** potom zobrazuje porovnání všech tří použitých metod na reprezentativním vzorku hydrogelu H_1. Ten byl změřen pětkrát pro posouzení reprodukovatelnosti. Opět je zde zahrnut obsah pomocí molární koncentrace i procentuální zastoupení.

Tab. 23: Obsah bromidových iontů a Septonexu ve vzorcích hydrogelů stanovený pomocí IC a FTIR

Vzorek	IC – koncentrace iontů a ředění					FTIR	
	c Br^- [mM] (250x)	*c* Br^- [mM] (100x)	*c* Br^- [mM] (50x)	Průměr *c* Br^- [mM]	Br^- v sup [%]	*c* Sept [mM]	Sept v sup [%]
H_1	10,42	12,03	13,97	12,14	9,63	10,80	8,57
H_2	6,49	5,96	6,74	6,39	10,82	7,94	13,44
H_3	3,01	3,22	3,71	3,31	11,18	6,57	22,20
H_4	13,37	13,16	12,78	13,10	9,90	13,40	10,13
H_5	7,29	**nd**	**nd**	7,29	12,15	10,66	17,77
H_6	4,31	**nd**	**nd**	4,31	16,08	6,81	25,41

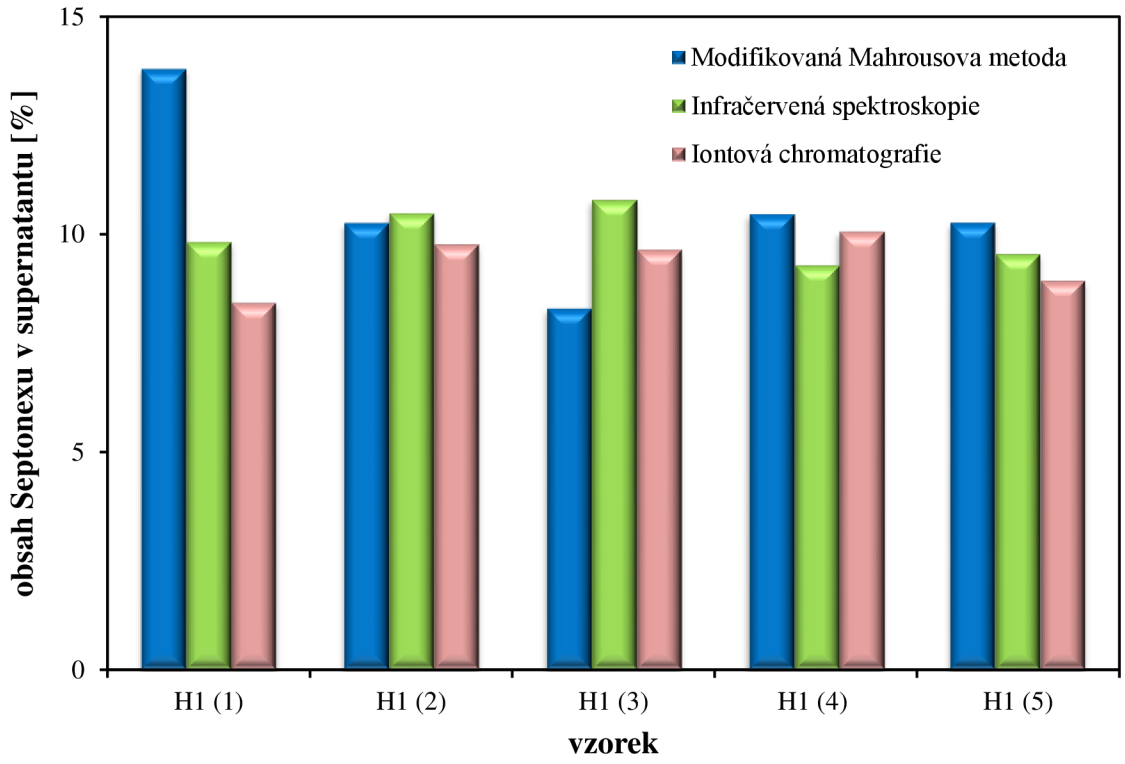
Tab. 24: Reprodukovatelnost měření pro stanovení obsahu Septonexu v supernatantech

Vzorek	IC		FTIR		Mahrous	
	c Br^- [mM]	Br^- v sup [%]	*c* Sept [mM]	Sept v sup [%]	*c* Sept [mM]	Sept v sup [%]
H_1 (1)	11,65	8,42	13,60	9,83	19,09	13,80
H_1 (2)	13,09	9,77	14,84	10,48	13,75	10,26
H_1 (3)	13,99	9,65	15,64	10,79	11,05	8,29
H_1 (4)	13,51	10,06	14,02	9,29	14,06	10,47
H_1 (5)	11,73	8,94	13,48	9,55	13,48	10,27

Při pohledu na **tabulku 23** je patrná velmi dobrá shoda výsledků stanovení obsahu bromidových iontů ve vzorku supernatantu pomocí iontové chromatografie v průběhu několika let. Tentýž vzorek připraven v různém čase, v různých laboratorních podmínkách vykazuje rozptyl hodnot v jednotkách procent. Opět je zde patrný nárůst procentuálního zastoupení Septonexu, který byl vyloučen do supernatantu, což znamená jeho menší množství při tvorbě samotné gelové sítě a zhoršování mechanických vlastností. Tento jev byl již popsán v předcházejících kapitolách.

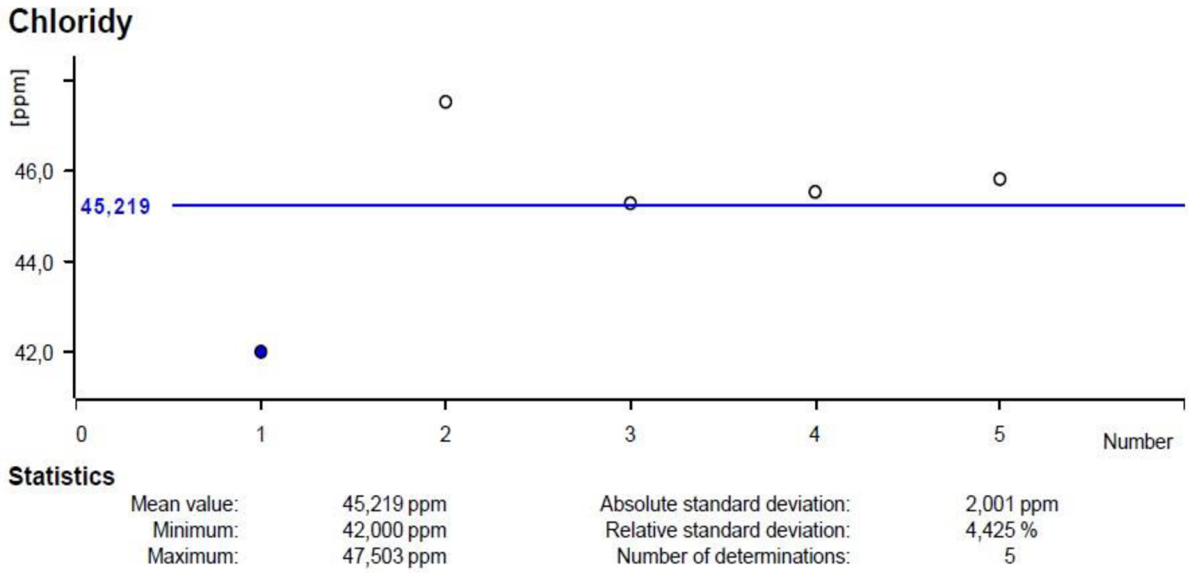
V případě vzorků H_5 a H_6 se několikrát stalo, že je nebylo možno změřit, z důvodu nedokonalé homogenizace a zakalení. Tento fenomén byl dříve také popisován s ohledem na jejich reologické chování, jež tyto vykazovaly spíše jako viskózní kapalina. Samotné nejzředěnější vzorky gelů (H_3 a H_6) se potom také vymykají, při srovnání celé šestice, s daty naměřenými pomocí infračervené spektroskopie. S ohledem na jejich reologickou dynamiku je toto chování opodstatněné. Jelikož se v této analytické části jednalo o pilotní experimenty, bylo by v budoucnu vhodné měření mnohonásobně zopakovat.

Samotné srovnání všech tří metod na reprezentativním vzorku H_1 pak ukazuje, že data z iontové chromatografie korelují s uspokojivou shodou. Graficky je toto znázorněno na **obr. 62**. Pro případ Septonexu je tedy možné tuto metodu použít jako primární či doplňkovou pro dané *„ideální“* (H_1, H_2, H_4) vzorky.



Obr. 62: Srovnání obsahu Septonexu v supernatantu gelů změřeného pomocí Mahrousovy metody, FTIR a IC

Následující stanovení **chloridových aniontů** probíhalo stejně jako u předchozích, bromidových. Celá šestice hydrogelů byla v průběhu několika let proměřena na iontové chromatografii, přičemž reprezentativní vzorek H_1 byl pro kontrolu reprodukovatelnosti opět změřen pětkrát v sadě. **Obr. 63** prezentuje na ukázku výstup z chromatografického softwaru tohoto měření.



Obr. 63: Reprodukovatelnost měření vzorku H_1, převzato z vyhodnocovacího softwaru chromatografu

I v tomto případě vidíme chybu měření v rozmezí jednotek procent. Samotný obsah chloridů v roztoku supernatantu by měl odpovídat také obsahu NaCl, příp. korelovat s množství sodíkových kationtů Na^+. To se ovšem může lišit, jelikož sodíkovými ionty přispívá do celkové koncentrace i samotný hyaluronan. Více však bude probráno v poslední části této kapitoly.

Změřené hodnoty obsahu chloridových aniontů, tedy teoreticky NaCl v supernatantu, jsou prezentovány v **tabulce 25**, přičemž vzorky H_5 a H_6 vykazovaly stejné problémy jako v předchozím měření. **Tabulka 26** potom přidává údaje o reprodukovatelnosti měření v případě vzorku H_1.

Tab. 25: Obsah Cl^- iontů ve vzorcích hydrogelů stanovený pomocí iontové chromatografie

Vzorek	IC – koncentrace iontů a ředění						
	c Cl^- [mM] (250x)	*c* Cl^- [mM] (100x)	*c* Cl^- [mM] (50x)	Průměr *c* Cl^- [mM]	Cl^- (NaCl) v sup [mmol]	Počáteční *n* NaCl [mmol]	Cl^- (NaCl) v sup [%]
H_1	79,83	78,57	81,02	79,81	0,37	0,90	41,51
H_2	80,62	80,51	84,04	81,72	0,41	0,90	45,21
H_3	64,83	81,43	86,49	77,58	0,39	0,90	43,07
H_4	78,38	75,10	79,03	77,50	0,35	0,90	38,44
H_5	82,21	**nd**	**nd**	82,21	0,40	0,90	44,94
H_6	85,81	**nd**	**nd**	85,81	0,47	0,90	52,38

Tab. 26: Reprodukovatelnost měření pro stanovení obsahu NaCl v supernatantech

Vzorek	*c* Cl^- [mM]	Cl^- (NaCl) v sup [mmol]	Počáteční *n* NaCl [mmol]	Cl^- (NaCl) v sup [%]
H_1 (1)	71,82	0,31	0,90	34,01
H_1 (2)	81,23	0,34	0,90	37,72
H_1 (3)	77,41	0,32	0,90	35,09
H_1 (4)	77,84	0,30	0,90	33,61
H_1 (5)	78,32	0,32	0,90	35,92

Jak vyplývá z obou tabulek, koncentračně i procentuálně jsou chloridové ionty, a tedy teoretický obsah NaCl, rozdělen ve vzorku rovnoměrně, zhruba 50:50, a to i při faktu, že supernatantu vzniká objemově zhruba 2krát více než gelu. Odchylka v měření je opět velmi uspokojivá v řádu jednotek procent. Pokud bychom hledali nějaký trend, je možno konstatovat, že nejméně chloridových iontů či molekul NaCl se v supernatantu nachází u vzorků H_1 a H_4, a to 35–41 % (z původního látkového množství veškerého NaCl, použitého na tvorbu gelu). Na obsah v gelu tedy přichází 59–65 %, což je cca o 10 % více než u ostatních vzorků. Tento přebytek, ať elektrostaticky nebo stericky vázaný, může mít v, tak již husté síti gelu, efekt na jeho dodatečném ztužení. Proto nemusí být náhoda, že se tato vyšší hodnota vyskytuje právě u reologicky nejpevnějších vzorků. Přítomnost nízkomolekulárního elektrolytu má také za následek snižování CMC tenzidu, z důvodu stínění elektrostatických repulzí polárních hlav. V tomto případě by přítomnost NaCl v síti gelu mohla podpořit další interakci micel Septonexu s hyaluronanem. Postupně tekutější chování vzorků gelů se snižujícím se obsahem NaCl v gelu, dle tabulky, by tomuto trendu odpovídalo.

Posledními stanovenými ionty byly **sodné kationty**, a to při použití optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Následující **tabulka 27** opět prezentuje změřený obsah sodíku v, námi připravených a naředěných, vzorcích supernatantů a následně vypočtený poměr obsahu sodíku v supernatantu a gelu vzhledem k původnímu množství. Zde je třeba podotknout, že do původního množství je nutno zahrnout i příspěvek sodných kationtů navázaných na hyaluronan. Ovšem na jednu disacharidovou jednotku připadá jeden atom sodíku, což hmotnostně dělá pouze 2,74 %, proto se původní látkové množství změní až na pozici řádu statisícin. Ná výsledný poměr tedy tento fakt nemá vliv. Jediný vzorek, který se vymyká trendu, je H_3 při 100násobném zředění. Zde se velmi pravděpodobně jednalo o chybu měření, proto nebyl daný bod, jako odlehlý, zahrnut do výpočtu průměru. **Tabulka 28** opět přidává údaje o reprodukovatelnosti vzorku H_1

Tab. 27: Obsah Na^+ iontů ve vzorcích hydrogelů stanovený pomocí ICP-OES

Vzorek	ICP-OES – koncentrace iontů a ředění						
	c Na^+ [mM] (250x)	*c* Na^+ [mM] (100x)	*c* Na^+ [mM] (50x)	Průměr *c* Na^+ [mM]	Na^+ (NaCl) v sup [mmol]	Počáteční *n* NaCl [mmol]	Na^+ (NaCl) v sup [%]
H_1	56,12	42,85	60,09	53,02	0,25	0,90	27,58
H_2	47,79	46,27	55,97	50,01	0,25	0,90	27,66
H_3	31,03	102,26	21,63	26,33	0,14	0,90	14,62
H_4	51,06	47,17	61,20	53,14	0,24	0,90	26,36
H_5	43,50	46,42	56,56	48,83	0,24	0,90	26,69
H_6	41,28	46,35	54,51	47,38	0,26	0,90	28,92

Tab. 28: Reprodukovatelnost měření pro stanovení obsahu Na^+ v supernatantech

Vzorek	*c* Na^+ [mM]	Na^+ (NaCl) v sup [mmol]	Počáteční *n* NaCl [mmol]	Na^+ (NaCl) v sup [%]
H_1 (1)	54,06	0,23	0,90	25,60
H_1 (2)	62,13	0,26	0,90	28,85
H_1 (3)	61,99	0,25	0,90	28,10
H_1 (4)	61,59	0,24	0,90	26,60
H_1 (5)	61,08	0,25	0,90	28,01

Reprodukovatelnost měření opět dokazuje velmi dobrou shodu, stejně tak je vidět, že, podobně, jako v případě chloridů, je obsah zastoupení téměř stejný u celé šestice. Výjimku tvoří pouze hydrogel H_3, kde dochází k poklesu obsahu sodných kationtů v supernatantu, tím pádem se z nich více dostává do gelu. Nasnadě může být rozvolněnější síť gelu, které koreluje s viskóznějším chováním tohoto nejzředěnějšího vzorku, která nebrání iontům dostat se ke stále velkému počtu vazných míst při použití HMW Hya. Obecně nižší obsah sodíkových kationtů v supernatantu oproti chloridovým aniontům tedy pravděpodobně znamená, že pro samotné množství NaCl jsou směrodatné právě první jmenované. Zhruba 10% rozdíl chloridových aniontů mohl interagovat s micelami Septonexu, kde se mohl vyměnit s protiionty bromu (Septonex má přebytek kladných nábojů oproti záporným nábojům na hyaluronanu – viz **tabulka 4**). Tyto micely se taktéž mohou začlenit do sítě gelu stericky. V obou případech však

úbytek sodíku v supernatantu (ve formě NaCl či Na^+, příp. i NaBr), oproti výchozímu množství, naznačuje, že tento má tendenci se začleňovat do sítě hyaluronanu v gelech a dodatečně ji vyztužovat, ať již reakcemi s hyalurananem, s protiionty micel Septonexu či sterickým uvězněním v síti gelu. Jak bylo zmíněno dříve, pro tvorbu gelů je nutná určitá iontová síla. Do budoucna by ovšem bylo zajímavé zkusit tato měření při použití jiného prostředí, např. $CaCl_2$. V kapitole 6.1.6. bylo popsáno, že s daným typem iontů je možno gel vytvořit, ovšem už nebyl prostor zkoumat rozložení dvojmocných vápenatých iontů mezi gel a supernatant.

Na závěr se dá konstatovat, že metody pro stanovení anorganických iontů, zejména optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a iontová chromatografie, jsou, do určité míry, konkurenceschopné pro strukturní analýzu daných typů vzorků. S ohledem na velkou dynamiku systémů je však jejich primární použití nevhodné. Při přípravě gelových vzorků totiž může každá jeho vstupní komponenta s kladným nábojem (Na^+, $Septonex^+$) interagovat se stavebními látkami o záporném náboji ($hyaluronan^-$, Cl^-, Br^-), což má za následek minimálně šest možných kombinací sloučenin. Ve výsledku tedy systém nevypadá jako jednoduchý Septonex-hyaluronový gel obklopený prostředím NaCl. Jak již bylo zmíněno dříve, protiionty se mohou vzájemně vyměňovat, příp. uzavírat do gelové sítě i stericky. Analytické stanovení pomocí anorganických iontů nám tedy nemůže přesně sdělit, do které, z právě vzniklých sloučenin, patří námi studovaný ion.

I přes překvapivě uspokojivou shodu výsledků s předchozími metodami je pro strukturní analýzu těchto typů systémů vhodnější použít první dvě popsané metody, tedy infračervenou spektroskopii a Mahrousovu metodu, které jsou citlivé na konkrétní funkční skupinu či vzniklý komplex.

6.3 Antimikrobiální testy

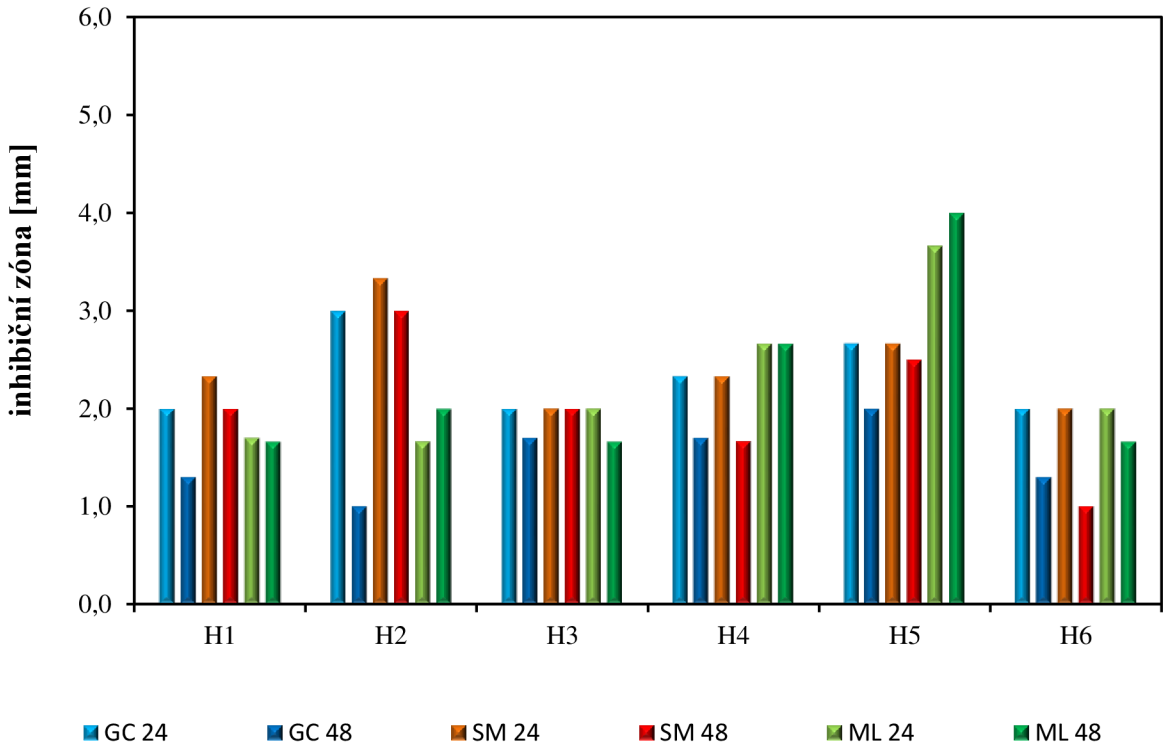
Antimikrobiální aktivita byla zkoumána u všech vzorků hydrogelů, kdy s ohledem na jejich složení, resp. tenzidovou složku Septonexu, se tato očekává. Samotné vstupní komponenty, tedy roztoky hyaluronanu a Septonexu byly těmto testům také podrobeny. Veškerá příprava a nastavení experimentu je podrobně popsáno v kapitole 5.3.6, kdy byly použity dva typy testů, a to *agarová difúzní metoda* a *bujónová diluční metoda*. Antimikrobiální aktivita byla zkoumána proti dvěma kmenům bakterií – grampozitivní *Micrococcus luteus* a gramnegativní *Serratia marcescens*. Z kvasinkových kmenů byl použit kmen *Candida glabrata*.

První typ testu se specializuje na měření průměru inhibičních zón okolo místa nanesení studovaného vzorku. Naměřené hodnoty přehledně shrnuje **tabulka 29**.

Tab. 29: Antimikrobiální aktivita testovaných hydrogelů

Vzorek	Průměr inhibiční zóny [mm]					
	Micrococcus luteus		*Serratia marcescens*		*Candida glabrata*	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
H_1	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0	2,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6
H_2	1,7 ± 0,6	2,0 ± 0,0	3,3 ± 0,6	3,0 ± 0	3,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
H_3	2,0 ± 0,0	1,7 ± 0,6	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0	2,0 ± 0,0	1,7 ± 0,6
H_4	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6	2,3 ± 1,0	1,7 ± 0,6
H_5	3,7 ± 0,6	4,0 ± 0	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	2,7 ± 1,0	2,0 ± 0
H_6	2,0 ± 1,0	1,7 ± 0,6	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0	2,0 ± 1,0	1,3 ± 0,6

U všech testovaných hydrogelů byl zaznamenán antibakteriální i antimykotický účinek. Obecně nejvyšší antimikrobiální účinek vykazoval vzorek H_5, následován vzorkem H_2 a H_4. Přičemž vzorek H_4 vynikal spíše antibakteriálním účinkem a vzorek H_2 antimykotickým. Je však nutné říci, že rozdíly mezi jednotlivými vzorky nebyly příliš výrazné. Některé rozdíly mohou být také způsobeny větší chybou při aplikaci vzorků. Je však patrné, že dané vzorky mají dostatek Septonexu, jehož micely mohou být vázány ve struktuře i stericky. Následným vymýváním ze sítě, pomocí difúze, tak mohou vykazovat vyšší aktivitu než např. vzorky H_3 a H_6, u kterých je vyrovnán poměr nábojů. Zajímavé také je si povšimnout změny při dvojnásobné době inkubace. Některé vzorky mohou zrelaxovat a uvolňovat větší množství Septonexu do okolí, tudíž je následná aktivita vyšší (viz průměr inhibiční zóny u vzorků H_2 a H_5 v případě bakterie *Micrococcus luteus*) nebo může dojít k opačnému efektu, kdy je po delší době struktura gelu již dostatečně homogenizována, zrelaxována a zacelena vůči dalšímu uvolňování Septonexových micel (např. vzorky H_3 a H_6 v případě kvasinky *Candida glabrata*). V případě těchto vzorků konkrétně (H_3, H_6) je také nasnadě obsazení všech funkčních skupin opačnými náboji (poměr nábojů je 1:1), tudíž tyto nemají ani při delším působení tendenci tyto elektrostatické interakce porušovat a vypouštět do okolí antiseptický Septonex. Antimikrobiální aktivita je však pro celou šestici gelů uspokojivá s ohledem na případné medicínské aplikace. Srovnání všech gelů graficky poskytuje **obr. 64**.



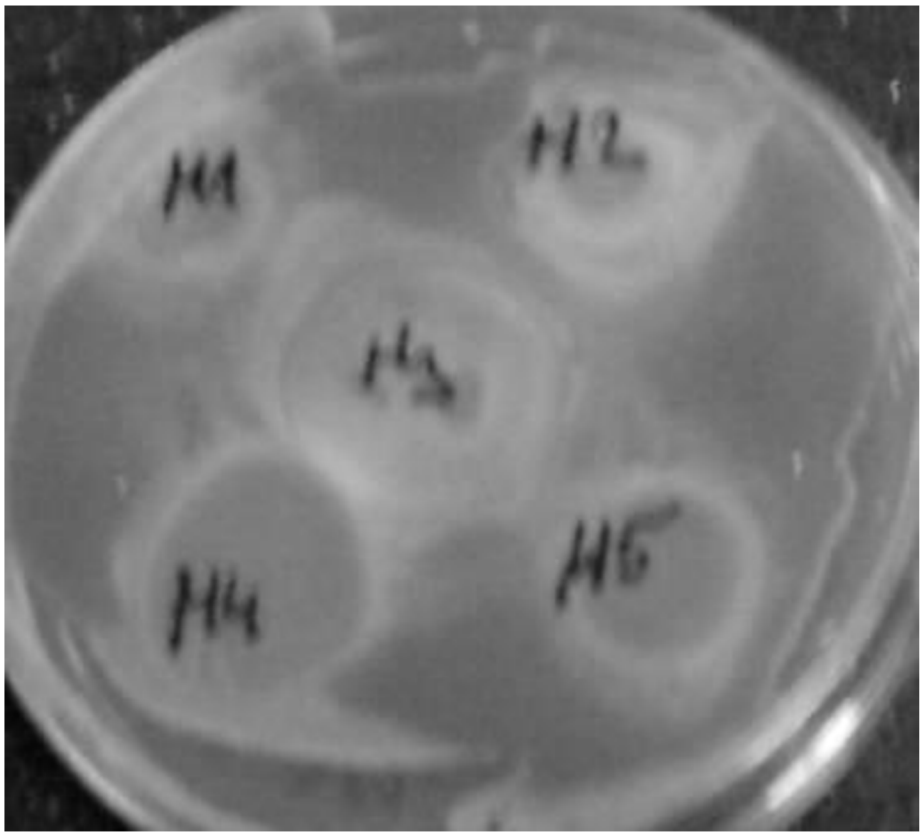
Obr. 64: Antimikrobiální aktivita vzorků hydrogelů

Tab. 30: Antimikrobiální aktivita stavebních komponent hydrogelů

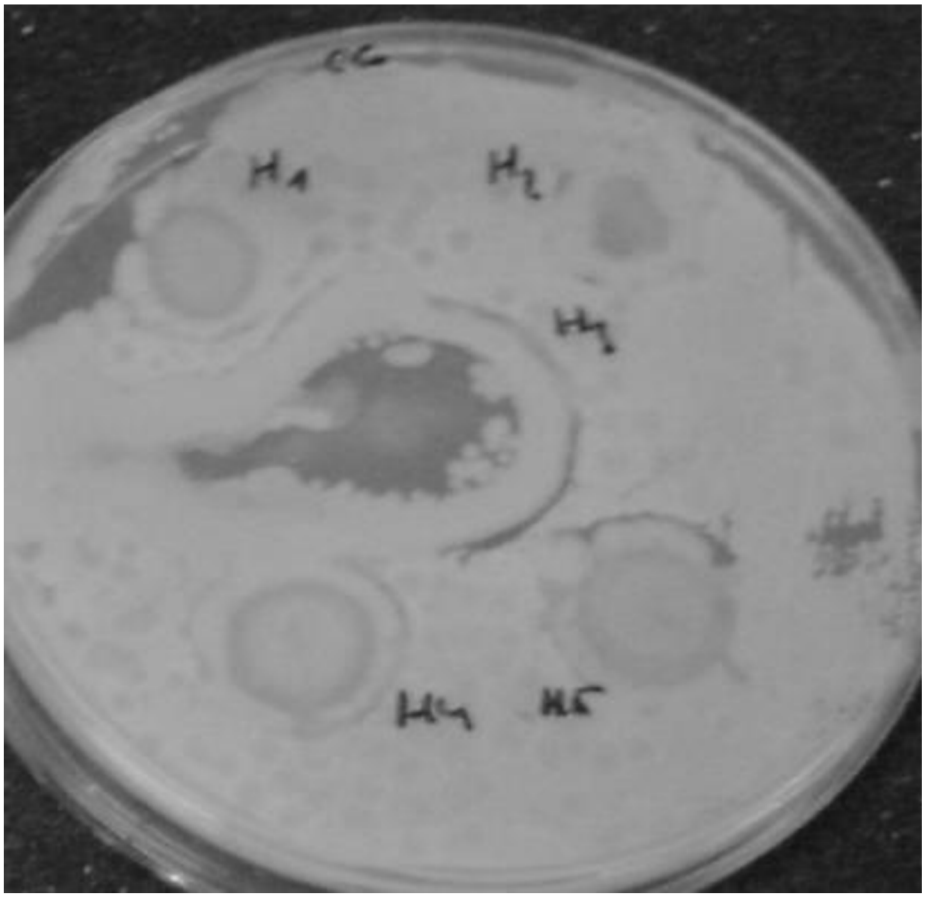
Vzorek	Průměr inhibiční zóny [mm]					
	Micrococcus luteus		*Serratia marcescens*		*Candida glabrata*	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
Sept (25)	2,0 ± 0	2,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,6	4,0 ± 0	4,0 ± 0
Sept (50)	3,0 ± 0	4,3 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,7 ± 0,6	5,0 ± 1,0	5,0 ± 0
Sept (100)	6,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	4,7 ± 0,6	6,0 ± 1,0	6,0 ± 1,0	6,0 ± 0,6
LMW Hya	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**
HMW Hya	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**	**nd**

O tom, že aktimikrobiální aktivitu v hydrogelech představuje právě složka Septonexu, pojednává **tabulka 30**. Ta prezentuje průběh experimentů realizovaných na samotných vstupních komponentech hydrogelů, tedy roztoky Septonexu o koncentracích 25, 50 a 100 mM a roztoky nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 1 % hm. Jak je patrné a očekáváné, tak Septonex vykazuje rostoucí antimikrobiální aktivitu s rostoucí koncentrací a časem, a to u všech kmenů bakterií a kvasinek. Naopak hyaluronan nevykazoval žádnou antimikrobiální aktivitu (značeno **nd** – *not detected*). Vzhledem k jeho polysacharidové povaze je toto logický závěr. Důležitý fakt je ten, že ačkoliv sám žádnou aktivitu nevykazuje tak tuto ani nebrzdí u Septonexu v jeho hydrogelovém komplexu. Ve výsledku je tak možno použít potenciál obou látek, tedy cílení či podpora hojení v podobě hyaluronanu a nosič léčiv či dezinfekce v podobě Septonexu. **Obr. 65–67** prezentují na ukázku inhibiční zóny gelů v Petriho misce u testovaných kmenů mikroorganismů.

Obr. 65: Antimikrobiální aktivita vzorků hydrogelů (Micrococcus luteus)



Obr. 66: Antimikrobiální aktivita vzorků hydrogelů (Serratia marcescens)



Obr. 67: Antimikrobiální aktivita vzorků hydrogelů (Candida glabrata)

Jako druhá byla, jakožto citlivější, použita *bujónová diluční metoda*. Měřeny byly opět všechny vzorky hydrogelů s jejich následným pětinásobným promýváním, stejně tak supernatanty i jejich promyté paralely. Živné médium, naočkované mikroorganismem (MO) a antimikrobiálním vzorkem, bylo inkubováno 24 hodin. Koncentrace mikroorganismů byla sledována pomocí optické hustoty při 630 nm. Výsledky byly porovnány s kontrolním vzorkem a vyjádřeny v procentech. Podrobnější popis přípravy je popsán v kapitole 5.3.6. Antimikrobiální aktivita standardní šestice hydrogelů a vliv promývání je prezentován v **tabulce 31**.

Tab. 31: Antimikrobiální aktivita hydrogelů a vliv promývání

MO	Promývání	Vzorky hydrogelů					
		H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
Micrococcus luteus	0x	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1x	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2x	++++	++++	+++	++++	++++	++++
	3x	++++	++++	+++	++++	++++	+++
	4x	++++	++++	+++	++++	++++	++++
	5x	++++	++++	++	++++	++++	+++
Serratia marcescens	0x	++++	++++	++	++++	++++	++++
	1x	++++	++++	++	++++	++++	+++
	2x	++++	+++	+	++++	++++	+++
	3x	++++	+++	+	++++	++++	++
	4x	++++	+++	+	++++	++++	+++
	5x	++++	++++	+	++++	++++	+++
Candida glabrata	0x	+++	++	+	++++	++	++
	1x	+++	++	+	+++	++	+
	2x	+++	+	+	+++	++	–
	3x	++	+	+	+++	++	–
	4x	++	+	–	++	+	–
	5x	++	+	–	++	+	–
Inhibiční efekt: 0–20 % (–); 20–40 % (+); 40–60 % (++); 60–80 % (+++); 80–100 % (++++)							

Výsledky ukazují, že všechny testované hydrogely vykazují inhibiční efekt růstu u všech předložených kmenů mikroorganismů. Efekt promývání se výrazně neprojevuje u grampozitivních i gramnegativních bakterií, a to v případě všech vzorků hydrogelů, s výjimkou vzorku H_3. Ten patrně nemá, s ohledem na poměr nábojů, přebytek stericky vázaných micel, proto od druhého promytí dochází k poklesu antibakteriální účinnosti na limitní hranici. Zmíněné kmeny bakterií se však zdají být na Septonex velmi citlivé, proto i jeho snížená koncentrace ve vzorcích po vyšších stupních promytí dostačuje na inhibici jejich růstu.

Rozdílněhý efekt lze pozorovat u kvasinkového kmene *Candida glabrata*, který se zdá být odolnější vůči nižším koncentracím Septonexu, způsobeným již po cca druhém či třetím promytí hydrogelů. I zde je však patrný vliv složení gelů, kdy nejkoncentrovanější vzorky s přebytkem Septonexu, jež je schopen, po sterickém vázání, difundovat do média, vykazují až 100% účinnost inhibice. Podobný trend jako samotné vzorky hydrogelů vykazují i jejich supernatanty, jak prezentuje **tabulka 32**.

Tab. 32: Antimikrobiální aktivita supernatantů a vliv promývání

MO	Promývání	Vzorky supernatantů					
		H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
Micrococcus luteus	0x	++++	++++	++	++++	++++	++++
	1x	++++	+++	++	++++	++++	+++
	2x	++++	++	+	++++	++++	+++
	3x	++++	++	++	++++	++++	++
	4x	++++	++	+	++++	++++	+++
	5x	++++	+	-	++++	++++	++
Serratia marcescens	0x	++++	++++	++	++++	++++	+++
	1x	++++	+++	++	++++	+++	+++
	2x	++++	+++	+	++++	++	++
	3x	++++	+	+	++++	++	++
	4x	++++	+	+	++++	++	++
	5x	++++	+	+	++++	++	++
Candida glabrata	0x	++	–	+	++	+	–
	1x	++	–	+	+	–	–
	2x	+	–	–	+	–	–
	3x	–	–	–	+	–	–
	4x	–	–	–	+	–	–
	5x	–	–	–	–	–	–
Inhibiční efekt: 0–20 % (–); 20–40 % (+); 40–60 % (++); 60–80 % (+++); 80–100 % (++++)							

V případě supernatantů je však patrný větší vliv promývání, kdy nejméně koncentrované vzorky H_3 a H_6 razantně snižují svoji aktivitu při vícenásobném promytí. Nejkoncetrovanější vzorky H_1 a H_4, s přebytkem Septonexu, jsou schopny do supernatantu stále uvolňovat jeho signifikantní množství, a to i při pátém promytí. Analytická měření stanovení obsahu Septonexu v supernatantu toto potvrzují. V případě odolnějšího kmene kvasinky již promytí supernatantů způsobuje nedostatečné množství Septonexu pro účinnou inhibici růstu. Vliv promývání má však simulovat dlouhotrvající působení gelů v místě účinku. Antimikrobiální aktivita pro aplikační dobu 48 hodin je tedy dostatečná u všech vzorků. To je výhoda pro budoucí použití, kdy je možno zvolit jakékoliv, zrovna potřebné, složení hydrogelů. Samotná minimální inhibiční koncentrace byla, pro Septonex, stanovena na hodnotu nižší než 1 mM, a to vůči všem kmenům mikroorganismů. Je tedy patrné, že pro účinný efekt stačí minimální dávka. Od toho by se měl odvíjet výběr gelů pro případnou aplikaci.

Výsledky antimikrobiálních měření naznačují velký potenciál zkoumaných hydrogelů do budoucích aplikací. Micely Septonexu schopné zapouzdřit aktivní látku a zároveň dezinfikovat okolí vhodně sekundují síti hyaluronového řetězce, jež svými bioaktivními a biokompatibilními vlastnostmi zajišťuje cílení do postižení tkáně a podporu hojení.

7 ZÁVĚR

Cílem předložené dizertační práce bylo vhodně charakterizovat základní chemicko-fyzikální vlastnosti hydrogelů na bázi biopolymerů a tenzidů. Právě interakce polymerů s tenzidy je ve vědeckém světě předmětem mnoha zájmů, kdy použitím vhodných typů látek, koncentrací a správnou volbou prostředí lze touto metodou připravit fyzikálně síťované hydrogely. Jejich unikátní viskoelastické vlastnosti a schopnost pojmout velké množství vody je řadí na nezastupitelnou pozici v oblasti potravinářství, kosmetického či farmaceutického průmyslu nebo medicínských aplikací. V posledním jmenovaném příkladě roste jejich význam jako *scaffoldů* pro tkáňové inženýrství, v oftalmologii, mokrém hojení ran či cílené distribuce léčiv. Hlavní myšlenkou cílené distribuce léčiv je vytvořit hydrogel či komplex z takových komponentů, jež dokážou zapouzdřit aktivní látku, většinou micely tenzidů, a zároveň zajistit biokompatibilitu, příp. cílení do postižené tkáně. To může být uskutečněno výběrem vhodného biopolymeru, který tvoří síť gelu. Téma práce se tedy může zdát široké a nekonkrétní. Po výběru komponent hydrogelů, stanovení podmínek prostředí a metod charakterizace se však práce zužuje do specifického výzkumu konkrétního systému, potenciálně použitelného v popsaných aplikacích.

Po provedení hluboké rešerše je patrný fakt, že i přes vysoký potenciál systémů jsou tyto předmětem více či méně omezeného zájmu. V literatuře se však vyskytují potvrzené, opakující se závěry, zejména s ohledem na výběr metody pro charakterizaci systému a vhodných látek pro medicínsko-biotechnologické použití hydrogelů.

Jako jeden z vhodných kandidátů pro post polymeru tvořícího gelovou síť se jeví aniontový polysacharid hyaluronan, který byl také vybrán pro tuto práci. Jedná se o hydrofilní, tělu vlastní látku, která, díky svým viskoelastickým vlastnostem a, v závislosti na molekulové hmotnosti, plní řadu funkcí. Unikátní je však jeho citlivost na receptory CD44 a RHAMM, které jsou hojně exprimovány nádorovou tkání. Interakcí hyaluronanu s opačně nabitým tenzidem poté taktéž odpadá jeho nutnost chemické modifikace pro uplatnění v biotechnologiích.

Po předchozích zkušenostech ze školícího pracoviště Fakulty chemické VUT v Brně, kdy se výzkum dotýkal více tenzidů, bylo rozhodnuto pro jeden konkrétní typ, jehož hydrogely budou charakterizovány podrobně. Proto byl vybrán kationtový karbethopendeciniumbromid, známý též pod názvem Septonex. Tento tenzid vyniká svými antiseptickými a dezinfekčními účinky, které by ve výsledném hydrogelu mohly představovat výhodu oproti strukturně podobným analogům.

Z rešerše vyplynuvší charakteristické metody se primárně zaměřují na stanovení mechanických vlastností a vlivu různých podmínek na ně. Podrobnější analýza může obsahovat spektrální metody určené strukturním experimentům. Proto je i tato práce dělena do tří částí. Hlavní část se zaměřuje právě na reologické metody a zkoumání modulace mechanických vlastností změnami složení či prostředí hydrogelů. Právě stanovení pevnosti či tekutosti vzorků, jejich stabilita či labilita v různém prostředí a modulovatelnost těchto vlastností složením gelů je klíčové pro designování dalších experimentů a jejich případné uvažování v průmyslovém využití. Po senzorické a viskoelastické analýze přichází na řadu hlubší strukturní průzkum, jehož cílem bylo stanovit přesnější složení gelů, resp. rozložení vstupních komponent mezi gel a supernatant. Toto bylo provedeno spektrálními či chromatografickými metodami zejména při stanovení jedné látky a dopočtení druhé, příp. stanovení obsahu charakteristického prvku, který je vázán na té či oné komponentě. Závěrečná část práce se zabývá antimikrobiální aktivitou gelů, jež je předpokládána a ideálně vyžadována s ohledem na obsah Septonexu ve vnitřní struktuře vzorků.

Pro samotnou tvorbu hydrogelu je nutné, aby koncentrace tenzidu přesahovala jeho kritickou micelární koncentraci. Druhý důležitý fakt, který v literatuře potvrdil již ***K. Thalberg*** [93, 98] je, že pro vznik gelové fáze je nutné určité rozmezí iontové síly, kdy nízkomolekulární elektrolyt snižuje nábojové repulze na nabitých skupinách polymerního řetězce, čímž mu umožnuje se více sbalit a zaplést do gelové sítě. Právě to, společně s vlivem složení gelů, bylo obsahem prvotních experimentů. Vybraná šestice hydrogelů byla tvořena dle návodu v kapitole 5.2.6, a to čtyřmi různými metodami. Jednalo se o metodu *suché* a *mokré* cesty s následným stáním či odstředěním vzorků. Předchozí zkušenost vyzdvihovala především mokrou cestu přípravy, tedy míchání zásobních roztoků látek, kdy docházelo k dokonalejší homogenizaci vstupních komponent. V případě Septonexových gelů však amplitudové deformační testy i frekvenční testy prokázaly nezávislost použité metody přípravy, kdy tyto vykazovaly stejnou hodnotu amplitudy deformace, resp. bodu překřížení modulů při stejné frekvenci oscilace. Toto může být způsobeno zejména jemností práškové formy Septonexu oproti ostatním, strukturně obdobným, tenzidům. Díky tomu je možno dosáhnout dokonalé homogenizace i při suché cestě metody přípravy. Vliv způsobu přípravy na tokové vlastnosti sady základní šestice vzorků koreluje s předchozími měřeními. Výjimku tvoří pouze použití centrifugy, kdy toto způsobuje tlakové nahromadění většího množství gelu v jednotkovém objemu, čím zvyšuje tuhost gelů. Vliv centrifugy na zvýšení viskozity je patrné pouze u mokré cesty, kdy jsou práškové formy vstupních komponent dokonale rozpuštěny a homogenizovány v roztoku, přičemž při použití nízkomolekulárního Hya je toto zvýšení mnohem významnější než při použití vysokomolekulárního Hya, kdy metoda přípravy nemá téměř vliv.

Závislost mechanických vlastností hydrogelů na jejich složení je odvozena od použité molekulové hmotnosti Hya a koncentraci Septonexu. Obecně vyšší molekulová hmotnost Hya a vyší koncentrace Septonexu způsobují vznik rigidních gelů, vykazujících chování elastického tuhého tělesa. Jedná se zejména o vzorky H_1, H_2 a H_4, kdy elastický modul převažuje nad ztrátovým v celém rozpětí amplitudy deformace. Přehledněji tyto fakta prezentuje kapitola 6.1.2, resp. **tabulka 8** a **9**. Tekutější chování zředěnějších vzorků potvrzují také změřené hodnoty mesh size, tedy velikosti domén mezi řětězci, které rostou s klesající koncentrací tenzidu ve vzorcích. Větší doménový prostor v síti gelu potvrzuje řidší síť, která nevykazuje takovou pevnost. Hodnoty viskozit standardní šestice gelů se v závislosti na složení mohou lišit až o tři řády, korelující s oscilačními testy, ovšem při přiblížení k nekonečné smykové rychlosti se hodnoty viskozit liší maximálně o dva řády. Nehledě na složení lze tedy při smykových aplikacích použít všechny gely jako konzistentní náhrady.

Potvrzení Thalbergovy hypotézy se věnovala další kapitola. Celá šestice gelů byla připravena v rozmězí iontové síly 0,05–1 M. Obecně byla limitní iontová síla právě naše používaná, tedy 0,15 M. Použití vyšších hodnot IS způsobilo zhoršení mechanických vlastností, které se projevilo poklesem viskoelastických modulů či převýšení viskozitního modulu nad elastickým. Zajimavý jev se objevil při použití nízké iontové síly (0,05 M) u gelů tvořených HMW Hya, což způsobilo mírné zvýšení viskoelastických modulů oproti klasické iontové síle (0,15 M NaCl), přičemž od bodu překřížení modulů převládal elastický modul v celé škále frekvencí. Podobný trend se projevil i u gelů s nízkomolekulárním Hya, kdy nižší koncentrace NaCl (0,05 M) dokázala síť natolik vyztužit, že při vyšších frekvencích již převládal elastický modul nad viskozitním. Klasicky se totiž tyto vzorky chovali jako viskózní kapalina.

Pro uvažování medicínských aplikací je nutné zjistit, jak se dané gely budou chovat při teplotě lidského těla. Následující sada testů, která je podrobně popsána v kapitole 6.1.4 se tedy věnovala proměření reologie základní šestice vzorků při 37 °C, jejíž výsledky byly porovnány

s hodnotami při laboratorní teplotě 25 °C. Vliv teploty neměl významný efekt na mechanické vlastnosti hydrogelů, přičemž se lišil s použitou molekulovou hmotností Hya. V případě gelů tvořených HMW Hya se zvyšující teplotou rostly absolutní hodnoty obou modulů, především elastického. Bod překřížení byl v tomto případě významně posunut k nižším frekvencím, což znamená, že zvyšováním teploty jsme schopni mírně zpevnit strukturu gelů s HMW Hya. V případě LMW Hya gelů byl tento trend opačný, kdy se zvýšením teploty došlo ke snížení absolutních hodnot viskoelastických modulů. Toková závislost se pro případ HMW Hya gelů s teplotou výrazně neměnila. Vzorky obsahující nízkomolekulární hyaluronan však vykazovaly se zvýšením teploty i zvýšení viskozity, což mohlo být způsobeno urychlenou relaxací na počátku měření.

Pro zkoumání vlivu pH prostředí byly připraveny hydrogely v rozdílném prostředí pufrů, které jsou popsány v **tabulce 3**. Tyto experimenty jsou stejně důležité jako zkoumání vlivu teploty, a to zejména pro medicínské aplikace. Je známo, že např. nádorová tkáň disponuje nižším pH nežli krevní plazma. Stabilita či rozpad gelů v takovém prostředí je pak esenciální pro uvažování případného uvolňování aktivních látek. U všech typů vzorků způsobila změna pH, a tedy i iontové síly díky pufrům, pokles absolutních hodnot elastických modulů, což vykazuje zhoršení mechanických vlastností. U LMW Hya gelů byl tento jev natolik markantní, že po změně pH vždy převažoval viskozitní modul nad elastickým a výsledné gely vykazovaly spíše chování viskózních kapalin. V případě HMW Hya gelů byl tento efekt pozorován při nejnižším pH (3,5), při němž ještě hyaluronan zcela nedisociuje a tudíž se nemůže naplno účastnit vazeb s opačně nabitým tenzidem. Frekvenční testy potvrdily výsledky deformačních, kdy šestice vykazovala obdobné chování i v oblasti vratné deformace. Tokové vlastnosti po zásahu pH odpovídaly předchozím dvěma metodám. Obecný pokles viskozity a zhoršení mechanických vlastností, které se projevilo větší tekutostí, se vyskytlo u všech vzorků.

Poslední myšlenka, hodna prozkoumání metodou reologie, byla zaměnění prostředí standardního 0,15 M NaCl za soli s vícevaznými ionty. Konkrétně byly použity Ca^{2+}, Mg^{2+} a Fe^{3+} ionty prostředí namíchané na stejnou iontovou sílu. První dva jmenované působily vesměs mírné snížení absolutních hodnot viskoelastických modulů, přičemž průběh viskozitní závislosti zůstal nezměněn. Železité ionty měly za následek mnohonásobné ztužení gelů na jedné straně, zatímco u některých vzorků zabránily vzniku gelů vůbec. Samotné ztužení gelů může vyplývat z faktu síťování hyaluronanu těmito železitými ionty. Podrobnější popis je popsán v **tabulce 17** poslední reologické kapitoly 6.1.6. Závěrem reologické části nelze konstatovat, že zhoršení či zlepšení mechanických vlastností, v závislosti na určitém parametru, je dobré nebo špatné. Vyplývá z toho pouze fakt, že jsme schopni modulovat mechanické vlastnosti dle vlastní potřeby a v závislosti na budoucí aplikaci. To nabízí daným systémům široké pole působnosti v průmyslu či medicíně.

Analytická část se zaměřila na hlubší prozkoumání struktury gelů, obecně tedy stanovení poměru rozdělení vstupních komponent mezi gel a supernatant. Z výsledného, a ze znalosti poměru nábojů, lze pak uvažovat nejnižší možné koncentrace pro vznik gelu o určitých mechanických vlastnostech.

Jako první byla použita metoda ATR-FTIR, a to pro stanovení obsahu hyaluronanu a Septonexu v supernatantech hydrogelů. Lineární kalibrace pro hyaluronan byly proměřeny při vlnočtech 1 041 cm^{-1} a 1 038 cm^{-1} pro případ HMW resp. LMW Hya gelů. Dle linearity kalibrace a hodnotě spolehlivosti jsme touto metodou schopni stanovit koncentrace hyaluronanu v rozmezí 0,01 % hm. až 1 % hm. Pro případ Septonexu se jako nejspolehlivější charakteristické pásy jeví ty, které se nachzejí v rozmezí vlnočtů 1 750–1 690 cm^{-1} a 1 300–

1 150 cm^{-1}, kdy oba zmíněné odpovídají vibraci nasyceného esteru, přičemž byla pro kalibrační výpočet zvolena hodnota 1 737 cm^{-1}. Opět lineární závislost potvrzuje použití této metody pro koncentrace Septonexu v rozmezí 0,5–150 mM. Z výsledků této metody je patrné, že obsah hyaluronanu v supernatantu dosahuje hodnot od jednotek procent až po cca 50 % pro nejzředěnější vzorky. Podobný trend zachovává i Septonex, kdy s klesajícím koncentračním složením gelů, tedy tekutějším reologickým chováním, je jeho obsah v gelech nižší a v supernatantech vyšší. To potvrzuje teorii o menším počtu vazných míst, a tedy horších mechanických vlastnostech.

Modifikovaná Mahrousova metoda proběhla podobně jako stanovení předchozí. Po vytvoření kalibrační závislosti Septonexu, který tvoří barevný komplex s kyselinou pikrovou, byl neznámý obsah Septonexu v supernatantu stanovem spektrofotometricky. Výsledky jsou přehledně prezentovány v **tabulce 22**, kde se nachází také důležité porovnání s infračervenou spektroskopií. Nutno podotknout, že obě metody dosáhly uspokojivé shody a mohou proto být, v závislosti na dostupnosti, použity jako konkurenceschopné. Nevýhodou Mahrousovy metody je však vyšší spotřeba materiálu, chemikálií a celkově delší čas celé operace.

Jako doplňkové analytické metody byly vybrány iontová chromatografie a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, obě pro stanovení anorganických iontů ve vzorcích supernatantů našich hydrogelů. Jako první byl vyhodnocen obsah bromidových aniontů pro celou šestici gelů, jejichž obsah přímo odpovídá obsahu Septonexu ve vzorku supernatantu. Výsledky opět korespondovaly s předchozími dvěmi analytickými metodami, kdy se rozdíl pohyboval v jednotkách procent. Rozmezí obsahu Septonexu v supernatantu se tak pohybovalo zhruba od 10 do 20 % pro nejpevnější, resp. nejtekutější vzorky. Samotná reprodukovatelnost měření dosahovala velmi dobré shody, s maximální chybou okolo 8 %.

Následně stanovený obsah chloridů by měl korelovat s obsahem NaCl, příp. odpovídat množství sodíkových kationtů Na^+. To se ovšem může lišit, jelikož sodíkovými ionty přispívá do celkové koncentrace i samotný hyaluronan. Z výsledků vyplývá rozdělení chloridových iontů v supernatantu a hydrogelu zhruba v poměru 50:50, a to i při faktu, že supernatantu vzniká objemově zhruba 2krát více než gelu. Odchylka v měření je opět velmi uspokojivá v řádu jednotek procent.

Výsledný obsah sodíkových kationtů byl změřen s přibližně 10% rozdílem oproti chloridovým aniontům, což znamená, že pro samotné množství NaCl jsou směrodatné právě první jmenované. Samotný sodík, ať už ve formě NaCl či Na^+, má tedy pravděpodobně tendenci se začleňovat do sítě hyaluronanu v gelech a tuto dodatečně vyztužovat. S ohledem na dynamiku systémů však nejsou, k jejich studování, metody stanovení anorganických iontů příliš vhodné.

Závěrečná kapitola 6.3 pojednává o antimikrobiální aktivitě hydrogelů, která se s ohledem na obsah Septonexu dopředu očekávala. U celé šestice vzorků byly provedeny dva typy testů, kterými jsou *agarová difúzní metoda* a *bujónová diluční metoda*. Prověřenými byly dva kmeny bakterií, a to *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*, stejně tak jako kvasinka *Candida glabrata*. U všech testovaných hydrogelů byl zaznamenán antibakteriální i antimykotický účinek. Měření samotných vstupních komponentů potvrdilo fakt, že tuto vykazuje hlavně Septonexová složka. Samotný hyaluronan antibakteriální aktivitou nedisponuje.

Výsledky této práce podrobně shrnuly chování konkrétních druhů hydrogelů, jehož komponenty byly zvoleny z patřičných důvodů pro uvažované biotechnologické či medicínské aplikace a mohly by aspoň malým dílem přispět do této zajímavé problematiky plné aplikačního potenciálu. Zároveň se tímto otevírají dveře dalším větvím výzkumu v tomto poli chemie.

8 POUŽITÁ LITERATURA

[1] Schiraldi, Ch., La Gatta,A., De Rosa, M.: *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*, 2010, kap. 20, s. 387–412, ISBN 978-953-307109-1.

[2] Nečas, J., Barošíková, L., Brauner, P., Kolář, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*, 2008, roč. 53, č. 8, s. 397–411.

[3] Meyer, K., Palmer J. W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.*, 1934, č. 107, s. 629–634.

[4] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 30. 4. 2016], http://www.glycoforum.gr.jp/.

[5] Lapčík, L., Jr., Lapčík, L. De Smedt, S., Demeester, J., Chabreček, P.: Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, roč. 98, č. 8, s. 2663–2684.

[6] Scott, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30. 4. 2016], http://www.glycoforum.gr.jp/.

[7] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broadrange of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, č. 29, s. 17–25.

[8] Weigel, P. H.: Bacterial Hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30. 4. 2016], http://www.glycoforum.gr.jp/.

[9] Patil, K. P., Patil, D. K., Chaudhari, B. L., Chincholkar, S. B.: Production of hyaluronic acid from Streptococcus zooepidemicus MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, č. 111, č. 3, s. 286–288.

[10] Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* [online], 2011, roč. 10, č. 1, s. 99, [cit. 30. 4. 2016], ISSN 1475-2859.

[11] Stern, R.: Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie*, 2005, roč. 53, č. 7, s. 372-382. ISSN 03698114.

[12] Lebel, L.: Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, roč. 7, č. 2, s. 221-235, ISSN 0169409x.

[13] Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R., Ghatak, S.: Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*, 2011, roč. 278, č. 9, s. 1429–1443, ISSN 1742464X.

[14] Stern, R.: *Hyaluronan in Cancer Biology*, 1. vyd. Oxford: Elsevier, 2009, 426 s, ISBN 978-0-12-374178-3.

[15] Rah, M.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry*, 2011, roč. 82, č. 1, s. 38–43.

[16] Hira, M.: What is the best way to use hyaluronic acid on the face?. *EHow:how to do just about everything* [online], 1999 [cit. 30. 4. 2016], http://www.ehow.com/.

[17] Puhl, W. Scharf, P.: Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1997, č. 56, s. 637–640.

[18] 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.

[19] Iris, K., Mauck, R. L., Burdick, J. A.: Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, 2011, roč. 32, č. 34, s. 8771–8782.

[20] Collins, M. N., Birkinshaw, C.: Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydrate Polymers*, 2013, roč. 92, č. 2, s. 1262–1279, ISSN 01448617.

[21] Yu-Jin, J., Termsarasab U., Daek-Duk, K.: Hyaluronic acid in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2010, č. 40, s. 33–43.

[22] Šmidrkal, J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*, 1999, s. 421–427.

[23] Bartovská, L., Šišková, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, 4. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2005, ISBN 80-7080-475-0.

[24] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2001, ISBN 80-7080-422-X.

[25] Holmberg, K.: *Surfactans and polymers in aqueous solution*, 2. vyd. Chichester: John Wiley, 2003, 545 s, ISBN 04-714-9883-1.

[26] Steber, J., Berger, H.: Biodegradability of anionic surfactants. *Biodegradability of surfactants,* 1995, s. 134–182.

[27] Salanger, J-L.: *Surfactants: Types and Uses*. Mérida – Venezuela, Universidad de Los Andes, 2002.

[28] Manojlovic, J.: The Krafft temperature of surfactant solutions. *Thermal Science*, 2012, roč. 16, č. 2, s. 631–640.

[29] Strnadová, H., Kvítek, L.: Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. *Chemické listy*, 2009, 315–319.

[30] Thalberg, K., Van Stam, J., Lindblad, C., Almgren, M., Lindman, B.: Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *The Journal of Physical Chemistry*, 1991, roč. 95, č. 22.

[31] Kvítek, L., Panáček, A.: *Základy koloidní chemie,* 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, ISBN 978-80-244-1669-4.

[32] Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. *Malvern.com* [online], 2006 [cit. 24. 2. 2013], http://quimica.udea.edu.co/~coloides/Anexo1.pdf.

[33] Jackson, K.: Dynamický rozptyl světla – Co, jak a proč?. *CHEMagazín*, 2007, roč. 17, č. 1.

[34] Pabst, W., Gregorová, E.: *Charakterizace částic a částicových soustav*, Praha: VŠCHT Praha, 2007.

[35] Atkins, P., de Paula, J.: *Atkins´ physical chemistry,* 7. vyd., Oxford University Press, 2002, Micelle formation, s. 755, ISBN 0-19-879285-9.

[36] Israelachvili, J. N., Marčelja, S., Horn, R. G.: Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1980, roč. 13, č. 2, s. 121, ISSN 0033-5835.

[37] Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., Marangoni, D. G.: Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, 2003, roč. 99, s. 3, ISSN 0260-1826.

[38] Sagalowicz, L., Leser, M. E.: Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid*, 2010, roč. 15, s. 61–72, ISSN 13590294.

[39] Mayers, D.: *Surfactant Science And Technology*, 2006, s. 191–205, ISBN 13 978-0-471-68024-6.

[40] Rosen M. J., Kunjappu J. T.: *Surfactants and interfacial phenomena*, 4. vyd., New Jersey, 2012, ISBN 978-0- 470-54194-4.

[41] Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., Gao, J.: Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery: Expert review. *Pharmaceutical Research,* 2007, č. 24.

[42] 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.

[43] Nagarajan, R., Kalpakci, B.: Viscometric investigation of complexes between polyethyleneoxide and surfactant micelles. *Microdomains in Polymer Solutions*, 1985, roč. 4, s. 369–381.

[44] Degreve, L., Caliri, A.: Geometric constraints in polymer chains: analysis on the pearl-necklace model by monte carlo simulation. *Journal of molecular structure,* 1995, č. 335, s. 123–127.

[45] Petzold, G., Dutschk, V., Mende, M., Miller, R.: Interaction of cationic surfactant and anionic polyelectrolytes in mixed aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, roč. 319, č. 1–3, s.43–50.

[46] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase Behavior of Systems of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: Influence of Surfactant Chain Length and Polyelectrolyte Molecular Weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370–3376.

[47] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*, 1990, roč. 94, č. 10.

[48] Bjoerling, M., Hersloef-Bjoerling, A., Stilbs, A.: NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 1995, roč. 28, č. 20, s.6970–6975.

[49] Hersloef, A., Sundeloef, L. O., Edsman, K.: Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/watersystem. *The Journal of Physical Chemistry*, 1992, roč. 96, č. 5, s. 2345–2348.

[50] Kopecký, F., Vojteková, M., Oremusová, J., Greksáková, O.: Micellization of [1-(Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium Brominde Studied by Conductometry and Potentiometry. *Chem. Papers*, 1993, vyd. 47(1), s. 55–59.

[51] Mohamed, G., El-Shahat, M., Al-Sabagh, A.: Septonex-tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. *Analyst*, 2011, vyd. 136, s. 1488–1495.

[52] Klouda, P.: *Fyzikální chemie*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002, ISBN 80-86369-06-4.

[53] Křížek, T., Coufal, P., Bosáková, Z., Tesášová, E., Sobotníková-Suchánková, J.: Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*, 2009, č. 103, s. 130–135.

[54] Park, K., Shalaby, W. S., Park, H.: *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, Lancaster, PA: Technomic Pub., 1993, 252 s. ISBN 15-667-6004-6.

[55] Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward J. H., Zhang, J.: Physico-chemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, roč. 2, s. 9–29.

[56] Okay, O.: General properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical sensors and Biosensors*, 2009, roč. 6, s. 1–14.

[57] Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S.: *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*, Wrexham United Kingdom, Glyndwr University, 2011.

[58] Zaino, C., Zambito, Y., Mollica, G., Geppi, M., Serafini, M. F., Carelli, V.: A Novel Polyelectrolyte Complex (PEC) Hydrogel for Controlled Drug Delivery to the Distal Intestin. *The Open Drug Delivery Journal*, 2007, roč. 1, s. 68–75.

[59] Hoffman, A. S.: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, roč. 54, č. 1, s. 3–12.

[60] Rosiak, J. M., Yoshii, F.: Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1999, roč. 151, č. 1–4, s. 56–64.

[61] Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A.: Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials*, 2009, roč. 21, č. 32–33, s. 3307–3329.

[62] Macosko, Ch. W.: *Rheology: Principles, measurements, and applications*. Wileyvch, 1994, ISBN I-56081-579-5.

[63] Brummer, R.: *Rheology Esentials of Cosmetic and Food Emulsions*, Berlin: Birkhäuser; 2006.

[64] Hofmann, J., Urbanová, M.: *Fyzika I.* 1. vyd., Praha: VŠCHT Praha, 2005, ISBN: 978-80-7080-777-4.

[65] Wein, O.: *Úvod do reologie*. 1. vyd., Brno: Malé centrum, 1996.

[66] Chen, D. T. N., Wen, Q., Janmey, P. A., Crocker, J. C.,Yodh, A. G.: Rheology of Soft Materials. *Matter Physics*, 2010, roč. 1, s. 301–320.

[67] Mezger, T.: *The Rheology Handbook*. Germany, Hanover, 2011, ISBN 978-3-86630-864-0.

[68] Measurement aparatus: Rotational methods, [online], [cit. 30. 4. 2016], http://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm.

[69] Barnes, H. A., Walters, H., Walters, K.: An Introduction to Rheology. *Elsevier*, 1989.

[70] Štětina, A.: *Fyzikální vlastnosti potravin*. Praha: VŠCHT Praha, 2006.

[71] Hrubý, M., Kučka, J., Kozempel, J., Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, s. 10–16.

[72] Haley, B., Frenkel, E.: Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations*, 2008, č. 26, s. 57–64.

[73] Kwon, G. S., Okano, T.: Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, č. 21, s. 107–116.

[74] Lukyanov, A. N., Torchilin, V., Abadi, F., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs: evaluation of self-aggregation. *Journal of Molecular Liquids*, 2009, roč. 149, s. 1–8.

[75] Henni, W., Deyme, M., Stchakovsky, M., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Aggregation of hydrophobically modified polysaccharides in solution and at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, roč. 281, č. 2, s. 316–324.

[76] Sezgin, Z., Yuksel, N., Baykara, T., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, roč. 64, č. 3, s. 261–268.

[77] Ardakani, B., Karimi, M., Abadi, F., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Effects of hydrophobically modified polymer on nano-structure micelles. *Journal of Molecular Liquids*, 2009, roč. 149, č. 1–2, s. 1–8.

[78] Quan, D., Gang-Biao, J., Kairong, L., Haihua, W.: Preparation of polymeric micelles based on chitosan bearing a small amount of highly hydrophobic Gross. *Carbohydrate polymers*, 2006, roč. 66, č. 4, s. 514–520.

[79] Brown, T.: The development of hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, roč. 9, č. 4, s. 253–260.

[80] Prestwich, G. D.: Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2001, [cit. 30. 4. 2016], http://www.glycoforum.gr.jp/.

[81] Qhattal, H. S. S., Liu, X.: Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of Hyaluronan-grafted liposomes. *Molecular pharmaceutics*, 2011, č. 8, s. 1233–1246.

[82] Chytil, M., Pekař, M.: Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009, roč. 76, č. 3, s. 443–448. ISSN 01448617.

[83] Mravec, F., Pekař, M., Velebný, V.: Aggregation behavior of novel hyaluronan derivatives – a fluorescence probe study. *Colloid and Polymer Science*. 2008, roč. 286, 14–15, s. 1681–1685. ISSN 0303-402x.

[84] Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T., Hennink, W. E.: Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 161, č. 2, s. 680–692.

[85] Tao, Y., Xu, J., Chen, M., Bai, H., Liu, X.: Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*, 2012, roč. 88, č. 1, s. 118–124.

[86] Li, J., Huo, M., Wang, J., Zhou, J., Mohammad, J., Zhang, Y., Zhu, Q., Waddad, A., Zhang, Q.: Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, 2012, roč. 33, č. 7, s. 2310–2320.

[87] Yoon, H. Y., Koo, H., Choi, K. Y., Kwon, I. Ch., Choi, K., Park, J. H., Kim, K.: Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2013, roč. 34, č. 21, s. 5273–5280.

[88] Li, S., Howell, S.: CD44-Targeted microparticles for delivery of cisplatin to peritoneal metastases. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, č. 7, s. 280–290.

[89] Datir, S. R., Das, M., Singh, R. P., Jain, S.: Hyaluronate tethered, "smart" multiwalled carbon nanotubes for tumor-targeted delivery of Doxorubicin. *Bioconjugate chemistry*, 2012, č. 23, s. 2201-2213.

[90] Xu, J., Bai, H., Yi, Ch., Luo, J., Yang, Ch., Xia, W., Liu, X.: Self-assembly behavior between native hyaluronan and styrylpyridinium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 86, č. 2, s. 678–683. ISSN 01448617.

[91] 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.

[92] 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..

[93] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant. *The Journal of physical chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478–1483.

[94] Yin, D., Yang, W., Ge, Z., Yuan, Y.: A fluorescence study of sodium Hyaluronate/surfactant interaction in aqueous media. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s. 1201–1206.

[95] Šimek, V., Leiner, J.; Čapek, A.: Antimicrobial Agents: VI. *Antimycotic Activity and Problems of Resistance*, 1969, s. 314–317.

[96] Sauerová, P., Pilgrová, T., Pekař, M., Kalbáčová, M. H.: Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, č. 103, s. 1276–1284.

[97] Hoare, T. R., Kohane, D. S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, č. 49, s. 1993–2007.

[98] Thalberg, K., Lindman, B.: Gel Formation in Aqueous Systems of a Polyanion and an Oppositely Charged Surfactan. *Langmuir*, 1991, č. 7, s. 277–283.

[99] Barbucci, R., Rappuoli, R., Borzatschiello, A., Ambrosio, L.: Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *J. Biomater. Sci*, 2000, roč. 11, č. 4, s. 383–399.

[100] Barbucci, R., Lamponi, S., Borzacchiello, A., Ambrosio, L., Fini, M., Torricelli, P., Giardino, R.: Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 2002, vyd. 23, č. 23, s. 4503–4513.

[101] Bulpitt, P., Aeschlimann, D.: New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res*, 1999, roč. 47, s. 152–169.

[102] Venerová, T., Pekař, M.: Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydrate Polymers*, 2017, č. 170, s. 176–181.

[103] Bajaj, G., Kim, M. R., Mohammed, S. I., Yeo, Y.: Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 158, č. 3, s. 368–392.

[104] Minaberry, Y., Chiappetta, D. A., Sosnik, A., Jobbagy, M.: Micro/nanostructured Hyaluronic acid matrices with tuned swelling and drug release properties. *Biomacromolecules*, 2013, č. 14, s. 1–9.

[105] Catanzano, O., D'Esposito, V., Acierno, S., Ambrosio, M. R., De Caro, C., Avagliano, C., Russo, P., Russo, R., Miro, A., Ungaro, F., Calignano, A., Formisano, P., Quaglia, F.: Alginate-hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing proces. *Carbohydrate Polymers*, 2015, č. 131, s. 407–414.

[106] Kamoun, E. A., Fahmy, A., Taha, T. H., El-Fakharany, E. M., Makram, M., Soliman, H. M. A., Shehata, H.: Thermo-and pH-sensitive hydrogel membranes composed of poly(N-isopropylacrylamide)-hyaluronan for biomedical applications: Influence of hyaluronan incorporation on the membrane properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, č. 106, s. 158–167.

[107] Gilli, R., Kacuráková, M., Mathlouthi, M., Navarini, L., Paoletti, S.: FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 1994, č. 263, s. 315–326.

[108] Haxaire, K., Maréchal, Y., Milas, M., Rinaudo, M.: Hydration of Polysaccharide Hyaluronan Observed by IR Spectrometry. I. Preliminary Experiments and Band Assignment. *Biopolymers*, 2002, č. 72, s. 10–20.

[109] Wurster, D. E., Werawatganone, P.: Influence of the polymer-micelle interaction on micelle-substrate binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, roč. 99, č. 3, s. 1440–1451.

[110] Černohorský, T.: *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997, ISBN 80-719-4114-X.

[111] Sommer, L.: *Optická emisní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu a vysokoteplotních plamenech*. Praha: Academia, 1992, ISBN 80-200-0215- 4.

[112] Sommer, L.: *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000, ISBN80-214-1742-0.

[113] Churáček, J.: *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha, 1990, ISBN80-030-0569-8.

[114] Tenover, F. C., Swenson, J. M., O'Hara, C. M., Stocker, S. A.: Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical mikrobiology*, 1995, č. 33(6), s. 1524.

[115] Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. W: Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature*, 2008, č. 3, s. 163–175.

[116] Smilek, J., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: Compositional and Temperature Effects on the Rheological Properties of Polyelectrolyte–Surfactant Hydrogels. *Polymers*, 2019, roč. 11, č. 5, s. 927–946.

[117] Garg, H. G., Hales, C. A.: Chemistry and Biology of Hyaluronan. *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands, 2004.

[118] Enev, V., Sedláček, P., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, roč. 575, č. 1, s. 1–9.

9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ATR	attenuated total reflectance – *„zeslabená úplná reflektance“*
ATR-FTIR (IČ-ATR)	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací s technikou ATR
CAC	kritická agregační koncentrace
CD44	specifický receptor pro hyaluronan
CEC	kritická koncentrace elektrolytu
CG	*Candida glabrata*
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTAT	cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonát
DLS	dynamický rozptyl světla
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAG	glykosaminoglykany
HAS1, HAS2, HAS3	hyaluronansyntázy
HMW	vysoká molekulová hmotnost
Hya	hyaluronan
IC	iontová chromatografie
ICAM-1	specifický receptor pro hyaluronan
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IS	iontová síla
LMW	nízká molekulová hmotnost
MIC	minimální inhibiční koncentrace
ML	*Micrococcus luteus*
MO	mikroorganismus
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	povrchově aktivní látka
PEC	hydrogely vzniklé elektrostatickou interakcí mezi polyelektrolytem a tenzidem
PEG	polyethylenglykol
PTX	paclitaxel
RHAMM	specifický receptor pro hyaluronan
SDS	dodecylsíran sodný
SM	*Serratia marcescens*
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast vlnových délek

9.2 Seznam symbolů

Symbol	Význam
a_0	účinný průřez polární hlavou
δ	ztrátový úhel
ε	relativní prodloužení (deformace)

γ_{xy}	smyková rychlost
G_E	Youngův (elastický) modul pružnosti
G'	elastický (paměťový) modul
G''	viskozitní (ztrátový) modul
G^*	komplexní smykový modul
l_c	efekticní délka uhlovodíkového řetězce
p	kritický parametr uspořádání
R_S	rozsah botnání hydrogelů
σ	smykové (tečné) napětí
η_0	zdánlivá viskozita
η	dynamickáviskozita
V	molekulární objem hydrofobní části molekuly
W_D	hmotnost vysušeného hydrogelu
W_S	hmotnost nabotnaného hydrogelu

10 ŽIVOTOPIS

Osobní informace

Jméno a příjmení:	**Tomáš Velcer**
Datum a místo narození:	13. října 1991, Kyjov
Adresa:	Provazní 435, 688 01 Uherský Brod
Telefonní číslo:	+420 775 909 059
E-mail:	xcvelcer@fch.vutbr.cz

Vzdělání

2018 – 2019	**VUT Brno, Institut celoživotního vzdělávání** Studijní program: Studium pedagogických věd – učitelství odborných předmětů pro střední školy Závěrečná práce na téma: Příprava výuky reologie ke studiu medicínských hydrogelů
2016 – současnost	**VUT Brno, Fakulta chemická** Doktorský program: Fyzikální chemie Obor: Fyzikální chemie Dizertační práce na téma: Fyzikální hydrogely na bázi biopolymerů a tenzidů
2014 – 2016	**VUT Brno, Fakulta chemická** Magisterský program: Chemie pro medicínské aplikace Obor: Chemie pro medicínské aplikace Diplomová práce na téma: Hyaluronové hydrogely na bázi CTAT
2011 – 2014	**VUT Brno, Fakulta chemická** Bakalářský program: Chemie a chemické technologie Obor: Chemie pro medicínské aplikace Bakalářská práce na téma: Nosiče na bázi hydrofobizovaného biopolymeru
2003 – 2011	**Gymnázium J. A. Komenského a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Uherský Brod** Maturitní zkouška: český jazyk, anglický jazyk, chemie, biologie

Počítačové znalosti

FluorEssence™, MATLAB, MS Office, OriginPro 8.1, TRIOS, UV Solutions, Zetasizer

Jazykové znalosti

Angličtina: slovem i písmem, úroveň B2
Němčina: slovem i písmem, úroveň A2

Další schopnosti

Řidičský průkaz sk. A, B

11 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

11.1 Impaktované publikace

Smilek, J., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: Compositional and Temperature Effects on the Rheological Properties of Polyelectrolyte–Surfactant Hydrogels. *Polymers*, 2019, roč. 11, č. 5, s. 927–946, ISSN: 2073-4360.

Enev, V., Sedláček, P., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, roč. 575, č. 1, s. 1–9, ISSN: 0927-7757.

Klučáková, M., Jarábková, S., Velcer, T., Kalina, M., Pekař, M.: Transport of a model diffusion probe in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, roč. 573, č. 1, s. 73–79, ISSN: 0927-7757.

11.2 Konferenční příspěvky

11.2.1 Abstrakty a postery na mezinárodních konferencích

Velcer, T., Pekař, M.: Micellar nanocarriers based on hydrophobical hyaluronan. *NANOCON 2019 – Abstracts. 1*, Ostrava, CZ: TANGER Ltd., 2019, s. 123-123, ISBN: 978-80-87294-94-9.

Velcer, T., Pekař, M.: The effect of pH and multivalent ions on the mechanical properties of gels with micellar nanodomains. *NANOCON 2018 – Abstracts. 1*, Ostrava: TANGER Ltd., 2018, s. 106–107, ISBN: 978-80-87294-85-7.

Jarábková, S., Laštůvková, M., Jugl, A., Velcer, T., Smilek, J.: Preparation and research of cosmetic emulsions from solid TiO_2 and emulsions prepared from dispersion of TiO_2. *7th Meeting on Chemistry nad Life 2018 – Book of abstracts*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 77–77, ISBN: 978-80-214-5488-0.

Klučáková, M., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: Transport of organic dyes in bioplymeric hydrogels. *32nd Conference of The European Colloid and Interface society – Book of Abstract*, Ljubljana, 2018, s. 496–496.

Matoušková, P., Mravec, F., Velcer, T., Pekař, M., Jarábková, S.: Antimicrobial activity of polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Book of Abstracts of The 32nd Conference of the European Colloid and Interface Society – ECIS*, 2018, Ljubljana, Slovenia: University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, s. 485–485, ISBN: 978-961-6756-90-7.

Velcer, T., Pekař, M.: Rheological properties of hydrogels based on biopolymer and oppositely charged surfactant. *NANOCON 2017 – Abstracts. 1*, Brno: TANGER Ltd., 2017, s. 129–130, ISBN: 978-80-87294-78-9.

Smilek, J., Velcer, T., Jarábková, S., Mravec, F., Pekař, M.: Flow Behaviour of Highly Viscous Gel-like Material based on Hyaluronan and Surfactant. *Abstracts. 1*, Ostrava: AMOS repro Ltd., 2017, s. 148–148, ISBN: 978-80-87294-78-9.

Pekař, M., Jarábková, S., Velcer, T., Smilek, J., Venerová, T., Mravec, F.: *Polyelectrolyte-surfactant hydrogels – preparation, properties*. Madrid: 2017.

Velcer, T., Pekař, M.: Effect of counterion on rheological properties of hydrogels prepared from hyaluronan and oppositely charged surfactant. *Sborník abstraktů. 1*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, s. 93–93, ISBN: 978-80-214-5488-0.

11.2.2 Příspěvky ve sborníku

Jarábková, S., Laštůvková, M., Jugl, A., Velcer, T., Smilek, J.: Preparation and research of cosmetic emulsions from solid TiO_2 and emulsions prepared from dispersion of TiO_2. *7th Meeting on Chemistry & Life. Czech Chemical Society Symposium Series*, č. 6, Praha: Česká společnost chemická, 2018. s. 493–495, ISSN: 2336-7210.

Velcer, T., Pekař, M.: Effect of counterion on rheological properties of hydrogels prepared from hyaluronan and oppositely charged surfactant. *Sborník příspěvků. 1*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, s. 218–223, ISBN: 978-80-214-5489-7.

11.2.3 Přednášky

Studentská odborná konference Chemie je život 2017 (Brno, Česká republika), přednáška na téma: *Effect of counterion on rheological properties of hydrogels prepared from hyaluronan and oppositely charged surfactant*.

11.3 Účast na projektech

2018	AKTION 79p6, stáž Linz, Rakousko Characterization of hydrogels systems by advanced macro-rheological, micro-rheological and spectroscopic techniques – extension.
2016 – 2018	GAČR 16-12477S, FCH VUT, Brno Hydrogely s integrovanými hydrofobními nanodoménami – struktura, transportní a uvolňovací vlastnosti.
2016 – 2018	MŠMT LO1211, FCH VUT, Brno Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně – udržitelnost a rozvoj.
2016 – 2017	MŠMT HS16659246, FCH VUT, Brno Příprava kosmetické emulze z práškového TiO_2 ve srovnání s emulzí připravované z dispergovaného TiO_2.

11.4 Vedení studentských prací a projektů

2018 – 2019	Gruberová Eliška Konzultant Bakalářská práce na téma: Hydrogely hylauronan-tenzid – fázový diagram
2017 – 2018	Slechanová Veronika Konzultant Bakalářská práce na téma: Stanovení ochranných slunečních faktorů kosmetických emulzí
2017 – 2018	Lehocká Nikol Konzultant Diplomová práce na téma: Agregace hyaluronanu substituovaného palmitoylem

11.5 Absolvované kurzy a stáže

2015	Nanotechnology and Anvanced Materials Intensive course II, Brno, CZ
2015	9th International Conference on Modern Drug Delivery Systems and Recombinant Vaccines**,** Telč, CZ
2015	Malvern a Quantochrome, Brno, CZ
2014	VUT Brno, Fakulta chemická – laboratorní pracovník Téma práce: Optimalizace stanovení rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid)
2013	CPN spol. s. r. o. – laboratorní pracovník (téma práce: Nosiče na bázi hydrofobizovaného hyaluronanu)

12 PŘÍLOHY

Příloha 1: Článek v impaktovaném časopise

Smilek, J., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: Compositional and Temperature Effects on the Rheological Properties of Polyelectrolyte–Surfactant Hydrogels. *Polymers*, 2019, roč. 11, č. 5, s. 927–946, ISSN: 2073-4360.

polymers

MDPI

Article

Compositional and Temperature Effects on the Rheological Properties of Polyelectrolyte–Surfactant Hydrogels

Jiří Smilek *, Sabína Jarábková, Tomáš Velcer and Miloslav Pekař

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic; xcjarabkova@fch.vut.cz (S.J.); xcvelcer@fch.vut.cz (T.V.); pekar@fch.vut.cz (M.P.)

* Correspondence: smilek@fch.vut.cz; Tel.: +420-541-149-483

Received: 25 April 2019; Accepted: 24 May 2019; Published: 27 May 2019

Abstract: The rheological properties of hydrogels prepared by physical interactions between oppositely charged polyelectrolyte and surfactant in micellar form were studied. Specifically, hyaluronan was employed as a negatively charged polyelectrolyte and Septonex (carbethopendecinium bromide) as a cationic surfactant. Amino-modified dextran was used as a positively charged polyelectrolyte interacting with sodium dodecylsulphate as an anionic surfactant. The effects of the preparation method, surfactant concentration, ionic strength (the concentration of NaCl background electrolyte), pH (buffers), multivalent cations, and elevated temperature on the properties were investigated. The formation of gels required an optimum ionic strength (set by the NaCl solution), ranging from 0.15–0.3 M regardless of the type of hydrogel system and surfactant concentration. The other compositional effects and the effect of temperature were dependent on the polyelectrolyte type or its molecular weight. General differences between the behaviour of hyaluronan-based and cationized dextran-based materials were attributed to differences in the chain conformations of the two biopolymers and in the accessibility of their charged groups.

Keywords: Hyaluronan; carbethopendecinium bromide; sodium dodecyl sulphate; diethylaminoethyl-dextran hydrochloride; rheology; hydrogels

1. Introduction

Interactions between polyelectrolytes and oppositely charged surfactants constitute an area of intensive research not only for theoretical reasons but also because of the practical applications of these systems, e.g., in cosmetic, pharmaceutical, and food products [1]. In this work the interactions of polyelectrolytes with surfactants in micellar form are of special interest. Kizilay et al. [1] overviewed the mechanistic and structural features of the complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, including surfactant micelles. The first interaction step is the linking of the colloid and polyelectrolyte, which is described by two types of model—either the "condensation" of polyelectrolyte chains on the surface of colloidal particles or the binding of colloids as "ligands" to host polyelectrolytes. Generally, polyelectrolyte–colloid interactions depend mainly on the charge per polyelectrolyte repeat unit, the ionic strength, pH and the colloid charge density. The effect of the polyelectrolyte molecular weight is usually negligible [1]. Association typically continues in several subsequent steps, controlled also by the concentration of interacting species: non-interacting, individual polymers and colloids (e.g., due to the low concentration of interacting species or the subcritical colloid surface charge density); primary complexes of an intrapolymer type; soluble aggregates; and coacervates (the whole system is separated into two immiscible liquid phases, one of which—the coacervate—is relatively concentrated in macromolecules). Intrapolymer complexes are

formed by individual polymer chains decorated with colloids and have radii similar to those of the maternal polyelectrolyte. Soluble aggregates are formed by the association of primary complexes. Coacervation arises from extended interactions among soluble aggregates (complexes) and is considered to be a true form of liquid–liquid phase separation. In many systems, maximum coacervation is found when the charges of the colloid and polyelectrolyte are neutralized [1]. However, particularly in polyelectrolyte–micelle systems, the coacervation region is broader than the electroneutrality point. Entropic effects, related to counter ion release or the formation of partially charged neutralized droplets also play a role in interactions between oppositely charged polyelectrolyte-colloids [1].

At surfactant concentrations well above the critical micelle concentration, interactions with oppositely charged polyelectrolyte can lead to the separation of a gel-like (viscoelastic) material. Kizilay et al. [2] attributed the viscoelastic properties of coacervate to a "disproportionation" process, during which poly-ions and their counter ions in systems where the poly-ion charge exceeds that of colloids are expelled to domains of 50–300 nm in size. Thus, proximal regions of more complete charge neutralization and higher density are created, which serve as crosslinks in the resulting viscoelastic material. The formation of these domains is driven by similar forces such as the formation of neutral aggregates in solution—the enthalpic contribution of interacting opposite charges—and the entropic contribution from both counter ion release and chain configuration change.

Polyelectrolyte–surfactant gels retain the amphiphilic character of the surfactant building blocks—inside the hydrophilic gel matrix they contain hydrophobic micelle-like domains capable of solubilizing non-polar species [2]. However, these materials are still underexplored and only limited information on their properties can be found in the literature. Perhaps the most information can be found on hyaluronan–cationic surfactant systems. Thalberg and Lindman [3] describe the separation of a few volume percent of a highly viscous gel-like phase after mixing hyaluronan with decyl-, dodecyl, tetradecyl- or cetyltrimethylammonium bromide. Just the gel phase formed by hyaluronan and tetradecyltrimethylammonium bromide was studied by Wong et al. using NMR techniques [4]. They observed that, in the gels, the surfactant molecules formed relatively small micellar aggregates which were bound to the polyelectrolyte chains. The surfactant aggregates seemed to be completely covered with polyelectrolyte chains at polyelectrolyte/surfactant ratios above 0.5 (by weight). Thalberg and Lindman [5] prepared the gels from hyaluronan of various molecular weights and decyl-, dodecyl, or tetradecyltrimethylammonium bromide. The formation of the gel phase was observed for the hyaluronan molecular weight below about 20,000 g·mol^{-1}. No crystalline phases were detected with small-angle X-ray scattering. The gels were able to solubilize a hydrophobic dye (in contrast to hyaluronan–water systems); thus they should contain hydrophobic domains. Proton NMR relaxation revealed the presence of micellar aggregates in the gels. Analogical self-diffusion studies showed that surfactants in micellar solutions had self-diffusion coefficients of the same order of magnitude as those measured in the gels. The surfactant self-diffusion was attributed both to the diffusion of its monomers within the micellar aggregates and to the monomer exchange between different aggregates. Water self-diffusion was reduced in the gels by obstruction and the presence of hydration water within the gel structure.

Buchold et al. [6] investigated hyaluronan–tetradecyltrimethyl ammonium bromide systems at high surfactant concentrations and in the presence of 160 mM NaBr. They also presented a phase diagram covering several decades of surfactant concentration in which a two-phase area can be observed. The authors reported that one of the phases was a turbid, dense gel which was not formed under salt-free conditions, a finding which is consistent with our previous study [7]. However, only single phase solutions with very high surfactant concentrations (245 mM and more) were further investigated in that study [8].

Recently, we reported on the rheological properties of hyaluronan–cetyltrimethylammonium bromide hydrogels and demonstrated how they can be controlled over a broad range of liquid-like to solid-like states by the polyelectrolyte molecular weight [7]. In this work, we focused in more detail on the effects of various processing parameters on the properties of similar gels prepared using

a slightly different cationic surfactant (approved for use in pharmaceutical formulations) and also investigated a reversely charged system—a positively charged polyelectrolyte (cationized dextran) and an anionic surfactant.

2. Materials and Methods

The sodium form of hyaluronan (HYA) was purchased from Contipro (Dolní Dobrouč, Czech Republic) and used as anionic polyelectrolyte without further treatment. In this study, two types of hyaluronan were used, high and low molecular weight hyaluronan (HMW and LMW, respectively). Diethylaminoethyl-dextran hydrochloride (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic, batch BCBQ8681 with 3.0% of nitrogen; DEAED) was used as received as the cationic polyelectrolyte. The exact molecular weights of all polysaccharides were checked by the SEC-MALLS technique and the results are shown in Table S1 (Supplementary Material).

Carbethopendecinium bromide (Septonex, Czech Pharmacopoeia quality), a pharmaceutical cationic surfactant, was purchased from GBNchem (Prague, Czech Republic). Sodium dodecyl sulphate (SDS, ≥99.0%), purchased from Sigma Aldrich (Czech Republic), and was used as received as the anionic surfactant.

The composition of the gel samples was selected on the basis of previous experience and preliminary experiments. Basically, when increasing the concentration of polyelectrolyte at a constant surfactant concentration, or vice versa, the gel started to form at a certain concentration, then its amount increased up to a maximum, after which it decreased upon a further increase in surfactant concentration. Therefore, we selected concentrations at which sufficient amounts of gel were formed and at which the viscosity of the polyelectrolyte solutions was not too high to complicate the mixing and preparation of the samples. The surfactant concentration should be well above its critical micelle concentration (cf. Table 1).

Table 1. Concentrations of initial solutions of hyaluronan (HYA), DEAED (Diethylaminoethyl-dextran hydrochloride), Septonex and SDS (Sodium dodecyl sulphate) used to prepare hydrogels by the solution method.

Sample Name	Hyaluronan		DEAED	Septonex	SDS	Charge Ratio
	HMW (High Molecular Weight)	LMW (Low Molecular Weight)				
	% (*w*/*v*)			mM		
H1	2			200		4.0
H2	2			100		2.0
H3	2			50		1.0
H4		2		200		4.0
H5		2		100		2.0
H6		2		50		1.0
D1			4		400	4.7
D2			4		100	1.2

Hydrogels were prepared in two ways—the solution or powder method. The solution method was based on the simple mixing of the pre-prepared surfactant and polyelectrolyte solutions with the required concentrations. We found that gels could also be prepared by pouring the liquid solvent over the mixture of powdered polyelectrolyte and surfactant; this was called the powder method, which is patent pending [9].

The solution method was realized by mixing a stock solution of polysaccharide and a stock solution of surfactant in a volume ratio of 1:1 in a vial and leaving the vial on a shaker overnight to complete the gelation process and the separation of the gel phase. Stock solutions were prepared in 0.15 M NaCl using deionized water (Purelab Flex, ELGA system), because previous experiments showed that a non-zero ionic strength of the aqueous medium is important for obtaining gel-like materials [7]. The initial concentrations of stock solutions are listed in Table 1. The theoretical charge

ratio was calculated supposing the existence of one charge on each surfactant molecule, one charge per hyaluronan basic dimeric unit (sodium form) with a molecular weight of 401.299 g·mol^{-1}, and one charge per each nitrogen atom in DEAED.

In the powder method, required amounts of biopolymer and surfactant in powder form were weighed directly into the vials. Then, an appropriate volume of 0.15 M NaCl aqueous solution was added. The final concentrations of the resulting mixtures were half of those listed in Table 1. The samples were vortexed briefly and left overnight to complete the gelation process and phase separation.

Alternatively, phase separation in both methods was accelerated by centrifugation. The polysaccharide and surfactant stock solutions were thoroughly mixed in a centrifuge tube and centrifuged at 4000 rpm for 10 min.

The effect of multivalent ions was investigated by preparing samples by the powder method and using corresponding salt solutions ($CaCl_2$, $MgCl_2$ and $FeCl_3$) at a concentration of 0.15 M (instead of NaCl). Similarly, the effect of pH was studied using appropriate buffer solutions of ionic strength 0.15 M. The composition of buffer solutions is summarized in Table S2. In addition, samples in the study of the effect of ionic strength and pH were prepared by the powder method using aqueous solutions of NaCl at different concentrations (0.05–1.0 M).

Rheological measurements were performed on an AR-G2 rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) using steel plate-plate geometry (a diameter of 25 or 8 mm, gap size of 100 µm). Experiments were carried out at least in duplicates, under a controlled temperature of 25 or 37 °C. Each sample was equilibrated for 3 min at the given temperature before measurement (conditioning). The maximum normal force used for compressing the sample did not exceed 5 N. During measurement, a solvent trap was used to prevent water evaporation and subsequent changes in the hydrogel structure. First, the linear viscoelastic region (LVR) was determined by strain sweep tests (deformation of 0.01–1000%, frequency of 1 Hz, 6 points per decade). Viscoelastic properties (elastic and viscous moduli, complex viscosity) as a function of oscillation frequency were then determined by frequency sweep tests in the range of 0.01–20 Hz, the deformation chosen within the LVR (the chosen amplitude of deformation was the same for all frequency sweeps). Steady state shear experiments were performed in the shear rate range of 0.02–200 s^{-1} (logarithmic sweep, 6 points per decade). Each experiment was conducted at least twice. The results are the average of all measurements. The standard deviation did not exceed 7% in either case—frequency or flow measurement.

The fundamental rheological parameters such as relaxation moduli (G) and relaxation time (λ) were calculated from oscillatory measurements with respect to the Maxwell model [10]. For each hydrogel, the mesh size was calculated from the frequency sweep measurements according to Equation (1) [10]

$$\xi = \sqrt[-3]{\frac{G_\infty}{k_B T}} \quad (1)$$

where ξ represents the mesh size calculated in [m], G_∞ is the value of the storage modulus when the plateau has been reached (or, if the plateau is not reached, the value of the storage modulus at the maximum frequency of oscillation), k_B is the Boltzmann constant, and T represents the absolute temperature.

An alternative way of determining the mesh size was also tested. The mesh size was calculated according to Pescosolido et al. [11] On the basis of measurements and rheological investigation, it was concluded that the optimal number of Maxwell elements corresponds to four in order to fit the hydrogel viscoelastic curves. According to this finding, it is possible to calculate the hydrogel shear modulus as the sum of all relaxation moduli.

The mechanical properties of polyelectrolyte–surfactant hydrogels can be analysed using rubber elasticity theory [12]. The application of this theory on biopolymer hydrogels has been questioned. Nevertheless, recent studies [13] have shown that for hydrogels with elastic components, such as the polyelectrolyte–surfactant hydrogels described, this theory can be applied. One of the most important assumptions is that the mechanical properties of hydrogels are determined in the linear viscoelastic

region (the amplitude of deformation in frequency sweep tests must always be chosen from the linear viscoelastic region). If this condition is met, a new parameter—crosslink density (ρ_x)—can be calculated according to Equation (2) [11].

$$\rho_x = \frac{G}{RT} \tag{2}$$

where R is the universal gas constant, T represents the absolute temperature, and G is the shear modulus. From the crosslink density, which can give us information about the density of the junction (unit: mol·m^{-3}), the mesh size can be calculated with respect to Equation (3) [11].

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi \rho_x N_A}} \tag{3}$$

3. Results and Discussion

3.1. The Effect of the Preparation Method

Hydrogels of the same composition were prepared by different techniques, as described in Materials and methods. First, the solution and powder methods were compared. It was found that both methods gave materials with very similar rheological properties in both oscillatory and shear tests, which indicates that a final, equilibrium state was reached. An example can be found in Figure S1 (Supporting material), where the frequency sweep for H1 is shown. The independency of viscoelastic properties on the preparation method was observed for all tested hyaluronan and dextran hydrogels. This fact is important also from the point of view of potential applications—it would not be necessary to prepare a solution but just to mix powders and the liquid dispersion medium directly, which would be more cost-effective.

The separation of hydrogels by free standing, i.e., by gravitation, was rather time consuming (the phase preparation of hydrogels took at least 24 h), which is undesirable with respect to potential commercial production. Therefore, the preparation methods were modified by centrifuging the system after mixing the components. The accelerated separation of the gels did not affect their rheological properties (data not shown).

Thus, the various preparation methods did not affect the mechanical properties of the resulting hydrogels. For further investigations, gel samples were separated by the centrifugation method.

3.2. The Effect of Surfactant Concentration

3.2.1. Oscillatory Tests

Strain sweep measurements primarily give information on the extent of the linear viscoelasticity region, but can also be used to detect the effects of composition. Generally, the surfactant concentration demonstrated a very small effect on the shape of the strain sweep curves and corresponding moduli (an example is given in Figure S2 in Supplementary Material).

The storage modulus of HMW hyaluronan-based gels was higher than the loss modulus throughout the whole linear viscoelasticity region, stressing the gel-like character of all materials. The highest G'/G'' ratio was found for intermediate surfactant concentrations (samples H2, H5), which indicated the increased rigidity of densely crosslinked materials. In contrast, the loss modulus of LMW hyaluronan-based gels was higher than the storage modulus. The length of the linear viscoelasticity region of hyaluronan-based gels was dependent on the surfactant concentration—interestingly, the length increased with the concentration of surfactant for HMW hydrogels and decreased for LMW hydrogels (cf. Table S3 in Supplementary Material). Thus, the hyaluronan molecular weight influenced the structural destruction of the gels—longer chains are necessary to prepare materials with enhanced resistance to the mechanical destruction of their networks. The lowest value of the storage modulus in the linear viscoelasticity region was found for sample H3, where the charge ratio was 1:1. This means

that micelles could be bound both in an electrostatic and steric manner in an excess of surfactants in the case of samples H1 and H2, which possessed the most rigid behaviour.

Hydrogels prepared from DEAED and a lower concentration of SDS (sample D2) exhibited higher absolute values of both moduli (elastic and viscous). The linear viscoelastic region was shorter for the D1 sample. Viscous moduli exceeded elastic moduli during the whole of each measurement and the difference between elastic and viscous moduli was the same for both concentrations of SDS (the example is given in Figure S3 in Supplementary Material).

The frequency sweep is the main method of oscillatory rheometry. The effect of surfactant concentration on frequency sweep results was dependent on the hyaluronan molecular weight. Gels prepared from HMW hyaluronan showed similar shapes of the measured curves (see the example on Figure S4 in Supplementary Material). Also, the modulus value at the crossover point was only weakly dependent on the surfactant concentration. However, the crossover frequency was shifted to higher values with increasing surfactant concentration, i.e., the corresponding relaxation time decreased in the same time (Table S4). The calculated mesh size slightly decreased when the surfactant concentration increased and was generally smaller for HMW hyaluronan gels. The smaller mesh size for HMW hyaluronan gels can be explained by the more dense coiled structure of HMW hyaluronan in comparison with LMW biopolymer, which is subsequently crosslinked by surfactant micelles [14] (see Table 2).

Table 2. Cross-over frequency and modulus, mesh size for all prepared hydrogels.

Sample Name	Cross-over Frequency (Hz)	Cross-over Modulus (Pa)	Mesh Size (nm)
H1	0.14	324.5	13.01
H2	0.10	287.8	14.56
H3	0.05	314.2	16.41
H4	0.01	65.6	20.4
H5	4.64	242.2	22.8
H6	2.15	199.1	21.6
D1	10.00	5765	8.94
D2	6.81	11430	7.12

The sample of HMW hyaluronan gels with the lowest concentration of surfactant (H3) had theoretically saturated all potential sites of electrostatic interactions (the charge ratio was 1). Of course, this supposes the total dissociation and accessibility of all charged groups, which, in real samples, will not likely be attained [6]. Nevertheless, at an increased surfactant concentration, at least some micelles are not bound electrostatically but physically entrapped in the gel network and function like a (nano-sized) filler. This could also explain why the viscoelastic properties change slightly with an increasing concentration of surfactant and why the mesh size is slightly decreased with an increasing concentration of surfactant.

In the case of LMW hyaluronan, almost the same general change in moduli with surfactant concentration as in HMW hyaluronan-based hydrogels was observed. However, due to the shorter chain length, gels with predominantly elastic moduli could be prepared only when using the highest Septonex concentration (200 mM), which means that excess surfactant (micelles), can participate in the network as an elastically active component. Lower concentrations of Septonex (samples H5, H6) caused the loss moduli of hydrogels to be higher over the whole range of frequencies. Materials formed from LMW hyaluronan generally behaved more like a viscoelastic liquid than a (soft) solid.

The values of the principal measured or calculated parameters are given in Table 2. Discrete relaxation spectra were obtained with five elements (see Table S4)—the relaxation spectra for HWM hyaluronan hydrogels practically overlapped and showed a plateau during the first three or four relaxation times followed by a noticeable decrease (Figure S5). In the case of LMW hyaluronan hydrogels, relaxation moduli decreased significantly with increasing relaxation time. This decrease was practically independent of the Septonex concentration.

In the case of DEAED-based hydrogels, increased surfactant concentration significantly changed their rheological behaviour. For samples with lower surfactant concentrations, both viscoelastic moduli were up to one order of magnitude higher than in the case of samples with higher surfactant concentrations; the crossover point was shifted to a somewhat lower frequency with a higher value of crossover modulus (Table 2). Higher moduli values for samples with a lower concentration of surfactant mean tougher hydrogels (Figure 1).

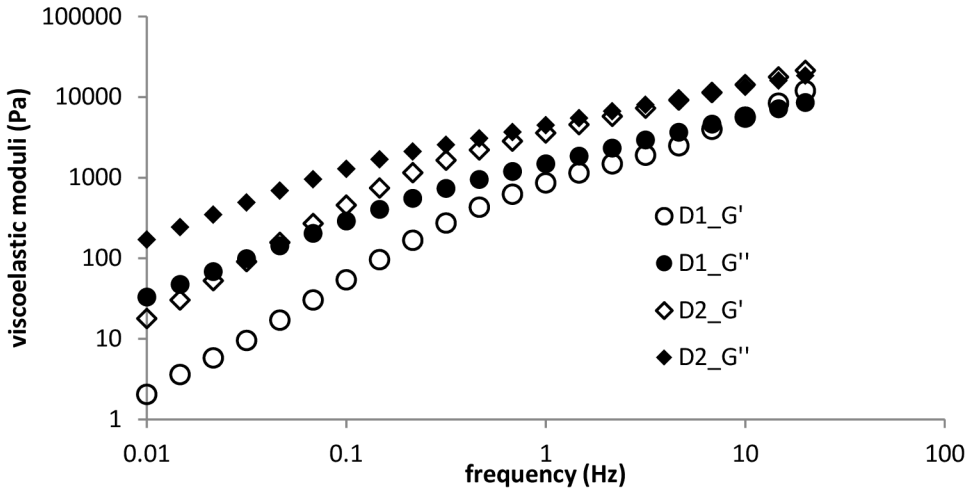


Figure 1. Frequency sweep for diethylaminoethyldextran hydrochoride (DEAE) hydrogels—concentration dependence.

The gels prepared with higher surfactant concentrations also demonstrated a much lower slope in their relaxation spectra (Figure S6 in Supplementary Material), i.e., slower relaxation. In this case, the excess of surfactant functioned much more like a "lubricant" than a reinforcing filler, causing a deterioration in mechanical properties.

3.2.2. Flow Curves

All hydrogels were sufficiently soft to be subject to flow curve measurements. In contrast to oscillatory tests, much bigger deformations are employed in these tests and the network structure is thus definitely disturbed. Generally, using an oscillatory technique, the structure of hydrogels should not be damaged within the linear viscoelasticity region.

All hydrogels demonstrated pseudoplastic behaviour with a Newtonian plateau at low shear rates. An increased surfactant concentration in hyaluronan-based gels resulted in increased zero-shear viscosity (see Table S5 in Supplementary Material); i.e., micelles worked as thickening fillers. LMW hyaluronan hydrogels had lower viscosities than their HMW counterparts, which is attributable to their shorter chain lengths [15,16]. Their HMW counterparts also possessed a much shorter Newtonian plateau and a steeper viscosity decrease after this plateau. DEAED-based hydrogels manifested increased zero-shear viscosity at the lower surfactant concentration, which is consistent with findings in oscillatory tests, whereas the width of the Newtonian region was weakly dependent on the surfactant concentration (Table S5 in Supplementary Material).

The observed pseudoplastic behaviour was a result of relatively weak bonding interactions, which could be relatively easy disrupted by low shear rates. These physical interactions were destroyed at high shear rates and the biopolymer chains in tattered hydrogels were oriented in the direction of flow, decreasing the apparent viscosity.

The differences between the rheological behaviour of hyaluronan- and DEAED-based gels may be attributed to the structural differences in their polysaccharide backbone [17]. Hyaluronan probably possesses more opportunities for hydrogen bonding and forms a single strain alpha helix [18], whereas dextran adopts a ribbon like conformation with two antiparallel chains [19–22]. Further, there should be

differences in the accessibility of the charged groups amenable to electrostatic interactions. Whereas the positively charged groups protrude from the dextran chain, the negatively charged carboxyls on hyaluronan are positioned much closer to its backbone—see the structures in Figure 2. The impact of such accessibility on polyelectrolyte–surfactant interactions was reported by Buchold et al. [6].

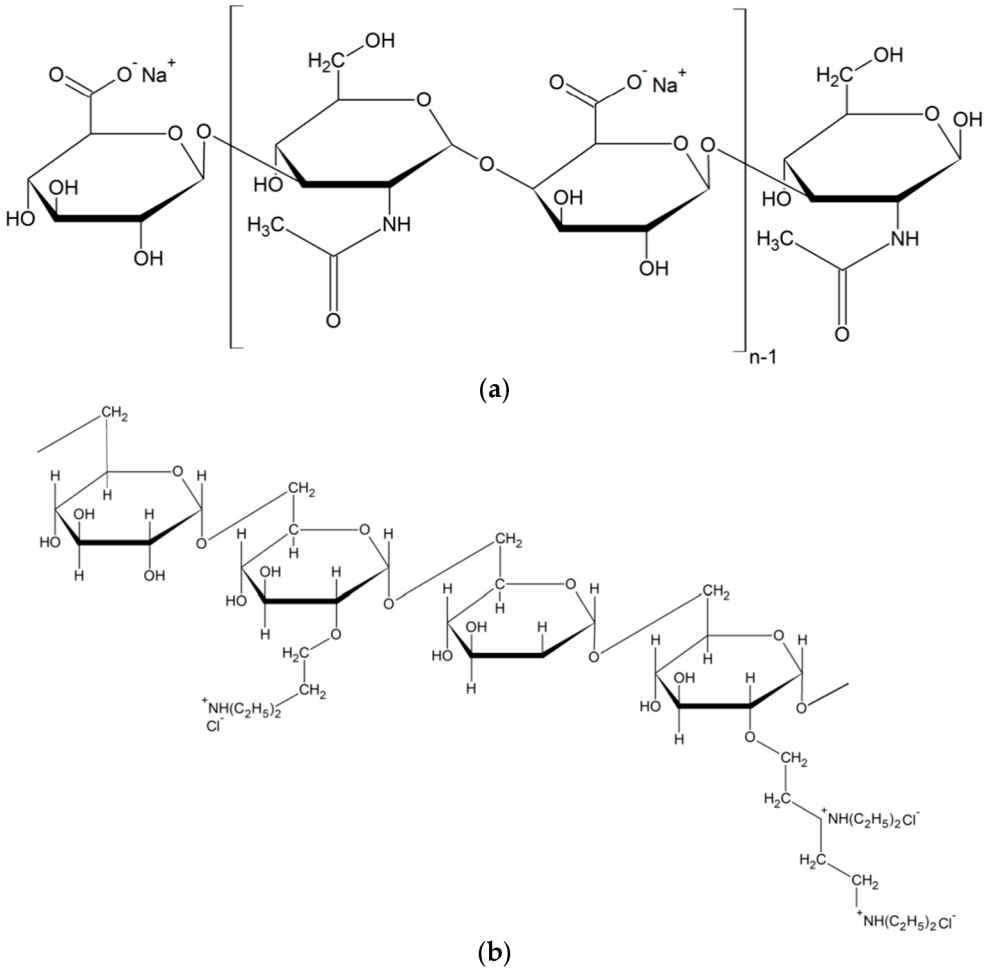


Figure 2. (**a**) Structure of sodium hyaluronate; (**b**) structure of modified dextran (DEAE—diethylaminoethyldextran hydrochoride).

3.3. Effect of Temperature

The viscoelastic properties of biopolymer–surfactant hydrogels were determined at 25 and 37 °C. These temperatures were chosen purposefully, because of the potential dermal applications of these hydrogels. Increased temperature had a very small effect on the strain sweep curves of both LMW and HMW hyaluronan-based hydrogels. The linear viscoelasticity region remained almost unchanged, and moduli very slightly increased with increased temperature in all hydrogels prepared from hyaluronan (for an example see Figure S7 in Supplementary Material).

In the case of DEAED-based hydrogels, the temperature effect on the moduli was rather stronger, while the linear viscoelasticity region also remained almost unchanged for both hydrogels with different concentrations of SDS (an example is shown in Figure S8 in Supplementary Material). Both viscoelastic moduli were slightly shifted to higher values at the elevated temperature.

The temperature effect on frequency sweep measurements was dependent on the hyaluronan molecular weight. In the case of HMW Ha, temperature increased the values of both moduli (more distinctly, the elastic modulus) and shifted the crossover point significantly to lower frequencies; also, the crossover modulus value was decreased (an example is shown in Figure 3a). The relaxation

spectrum remained almost unchanged when the temperature increased (see Figure S9 in Supplementary Material). Thus, to some extent, a higher temperature stiffened the structure of the hydrogel prepared from HMW hyaluronan.

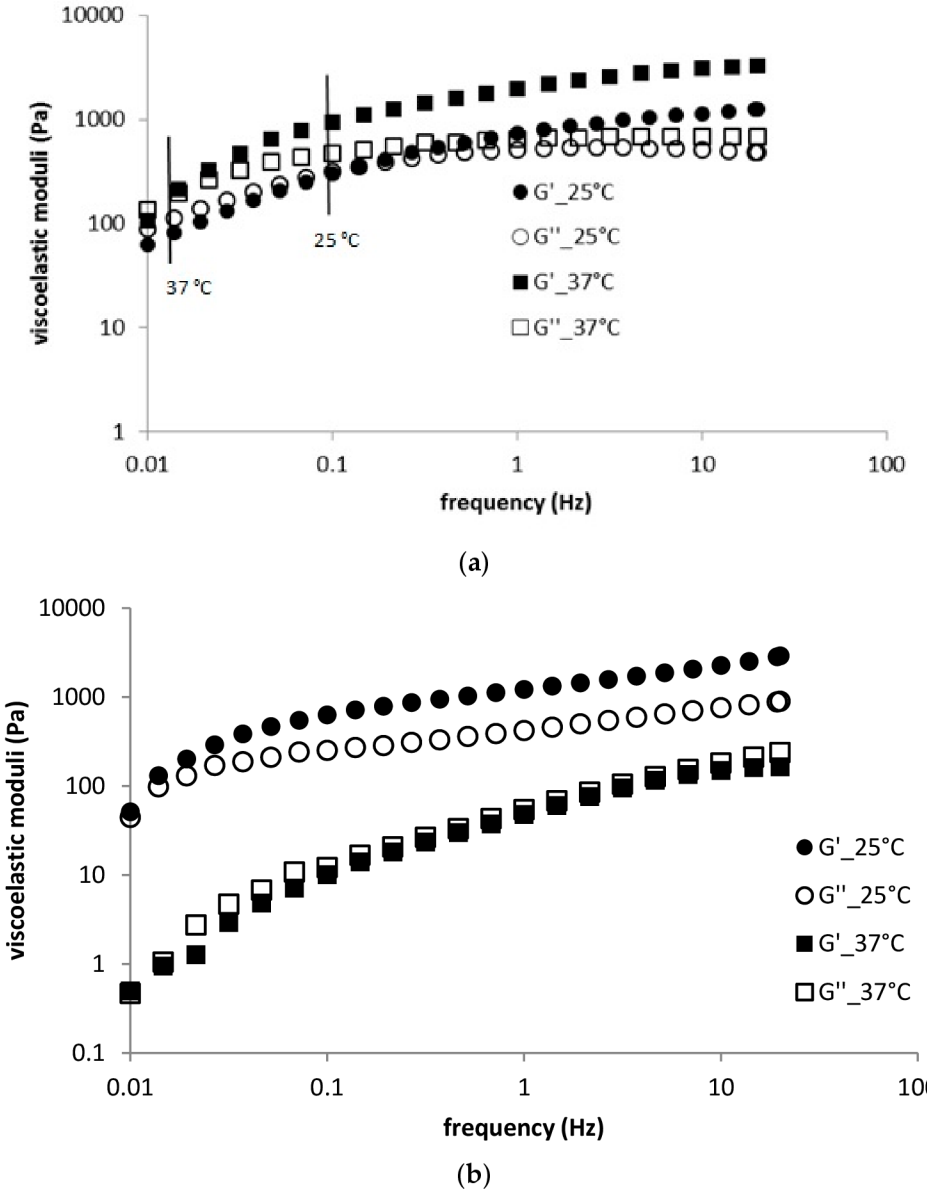


Figure 3. (**a**) Frequency sweep for H1 sample—temperature dependence; (**b**) frequency sweep for H4 sample—temperature dependence

In contrast, increased temperature significantly reduced the moduli of LMW hyaluronan-based hydrogels and both moduli exhibited very similar values at the higher temperature over the whole frequency range (an example is given in Figure 3b). The crossover point seemed to remain essentially unchanged from the point of view of frequency, whereas the crossover modulus value was probably significantly lower at the elevated temperature (determining the exact crossover location is problematic due to the almost completely overlapping corresponding curves). The relaxation spectrum was shifted downwards and to the left with temperature (cf. the example in Figure S9 in Supplementary Material).

The polymer molecular weight is thus crucial for the heat resistance of the structure and elasticity of hyaluronan polyelectrolyte–surfactant hydrogels. Short chains form a looser network structure which is released by a moderate increase in temperature. In contrast, the structure formed by

long chains is stiffened, which suggests the accessibility of more crosslinking points at the elevated temperature, probably as a result of the higher molecular mobility and conformational rearrangements of biopolymer chains.

The temperature effect on the frequency sweep of DEAED–SDS hydrogels (at both concentrations of SDS) was manifested by decreased moduli values and increased crossover frequencies at the elevated temperature (example is shown in Figure 4). The crossover modulus value was not substantially changed by changes in temperature. The relaxation spectrum was shifted downwards with increased temperature for both systems (see the example in Figure S10 in Supplementary Material). The behaviour at the elevated temperature was thus similar to that of LMW hyaluronan-based gels.

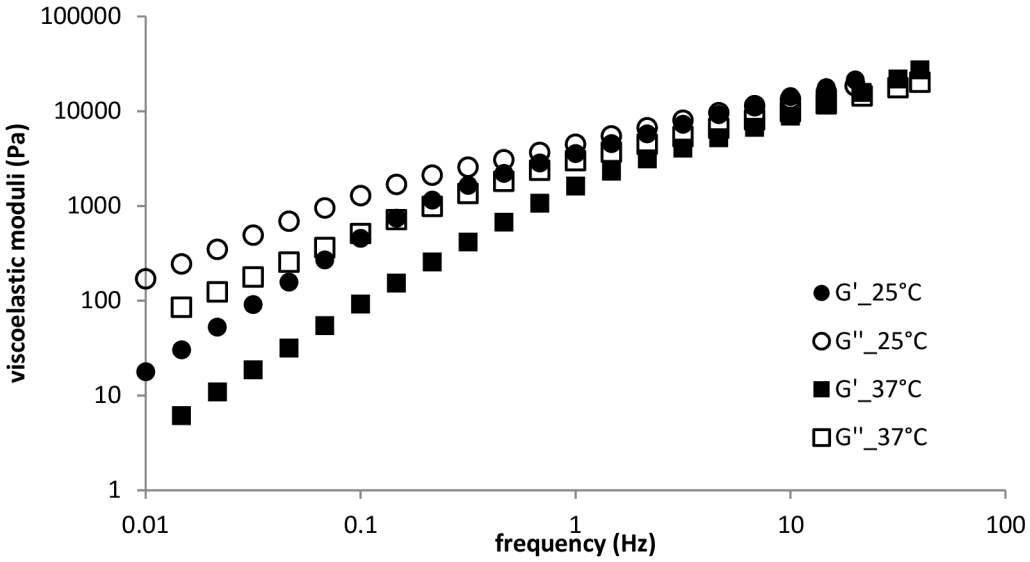


Figure 4. Frequency sweep for sample D2—temperature dependence.

Flow curves were not significantly affected by temperature in the case of HMW hyaluronan-based hydrogels and DEAED–SDS hydrogels. The disturbed network structure of the resulting fluid-like materials was thus not sensitive to the applied temperature increase. LMW hyaluronan-containing materials demonstrated increased viscosity and no Newtonian plateau at the higher temperature, as shown in Figure S11 in Supplementary Material.

3.4. Effect of Ionic Strength

The viscoelastic properties of HMW hyaluronan-based hydrogels were strongly dependent on ionic strength. Hydrogels with lower ionic strength (0.05 M NaCl) had a higher elastic modulus than viscous modulus at higher frequencies of oscillation. The crossover point was shifted to higher frequencies in comparison with a standard sample (0.15 M NaCl); moreover, both moduli exhibited lower absolute values. On the other hand, at a higher ionic strength (0.3 M NaCl), both moduli were distinctly shifted to lower absolute values in comparison with standard samples or hydrogels with a lower ionic strength. The viscous modulus exceeded the elastic modulus over the whole range of measurable frequencies, which means that materials with a higher ionic strength behave more liquid-like. Moreover, hydrogels at yet higher ionic strengths (>0.3 M NaCl) could not be prepared—there was no gelation process.

The same behaviour was also observed for LMW hyaluronan-based hydrogels. Furthermore, the critical ionic strength of the LMW hyaluronan-hydrogels gelation process was lower than for HMW hyaluronan-based hydrogels—when an ionic strength of 0.15 M NaCl was exceeded, the gelation process was not observed.

DEAED–SDS-based hydrogels with the highest ionic strength (0.5 M) could not be prepared due to surfactant solubility problems in this environment. Samples with lower (0.05 and 0.1 M) and

higher (0.3 and 0.5 M) ionic strengths than the standard ionic strength (0.15 M) were prepared without problems. On the other hand, hydrogel based on DEAED–SDS in pure water without the adjustment of ionic strength could not be prepared. Non-zero ionic strength is required for the preparation of DEAED–SDS hydrogel (at least 0.05 M).

The linear viscoelastic region of DEAED–SDS hydrogels was independent of ionic strength and was comparable with that of the standard sample. The results from frequency sweep test measurements showed a very small effect of ionic strength on sample D2 and a toughening effect of increased ionic strength on sample D1.

Flow curves for DEAED–SDS-based hydrogels detected a very small effect of ionic strength in comparison with flow curves for standard samples. Flow curves at the changed ionic strength were close to the flow curve for the standard sample, especially in the Newtonian region. The biggest difference in flow curves was demonstrated by the hydrogel prepared with an ionic strength of 0.3 M, which had the highest viscosity values in the non-Newtonian region.

Gelation in both biopolymer systems was sensitive to ionic strength. Gels could not be prepared without the addition of low molecular weight electrolyte. Thalberg and Lindman [3] reported that a certain minimum concentration of surfactant is needed for the marked formation of complexes between hyaluronan and cationic surfactants. A too high surfactant concentration is known to suppress polyelectrolyte–surfactant interactions due to the screening of electrostatic forces. The same was observed in this work for DEAED systems. Ions of the added electrolyte affect biopolymer polyelectrolyte conformations and the aggregation of surfactants (by changing their critical micellar concentration and acting as additional counter ions to dissociated surfactant moieties). For the formation of hydrogel materials and achieving adequate rheological properties, there is an optimum ionic strength for both biopolymers, which lies around 0.15–0.3 M.

3.5. Effect of pH (Buffers)

Standard gel samples (i.e., samples without extraneous pH control) prepared from hyaluronan were of essentially neutral pH, whereas DEAED-based gels were slightly acidic (see Table 3).

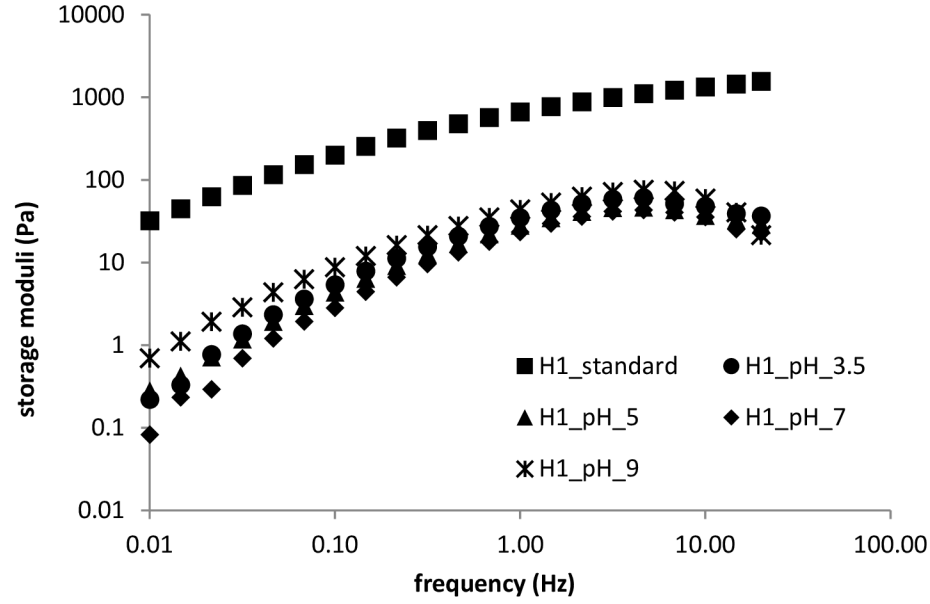
Table 3. pH values of hydrogels and supernatants.

Sample Name	pH	
	Gel Phase	Supernatant
H1	6.88	7.09
H2	7.23	7.20
H3	7.15	7.00
H4	6.83	7.32
H5	7.05	7.25
H6	7.38	7.13
D1	4.58	6.74
D2	4.93	6.60

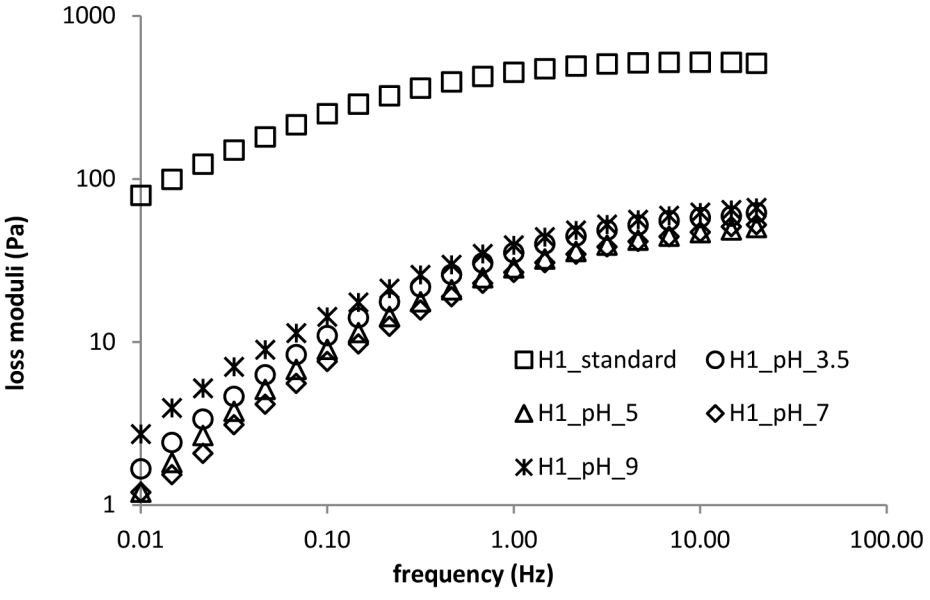
Generally, changes in pH decreased both moduli and suppressed the elastic behaviour of hyaluronan-based hydrogels during strain sweep in comparison to a standard sample. The effect of pH buffers has been studied only for phase-separated hydrogels based on HMW hyaluronan. In the case of LMW hyaluronan, the elastic modulus was lower than the viscous modulus and in some samples even unmeasurable. In the case of HMW hyaluronan, both moduli had comparable values, which decreased with increasing pH, except for the highest pH value where the moduli values were the highest.

No effect of pH was observed on the width of the viscoelastic region in DEAED hydrogels. D1 hydrogels could be prepared only in a pH range of 4.5–7, which is very close to the pH of standard sample; no gels were formed in more acidic or alkaline environments. In contrast, it was possible to prepare D2 hydrogels throughout the chosen pH range. More acidic buffer slightly toughened the D2 hydrogels.

Frequency sweep investigations resulted qualitatively in the same conclusions—LMW hyaluronan resulted in a liquid-like, viscous material with practically unmeasurable elastic moduli (in contrast to the corresponding standard samples). The curves measured for HMW hyaluronan gels were all located about two orders of magnitude below the curves for the standard sample. They were slightly shifted to lower moduli values with increasing pH, except for the highest pH curve, which gave the highest moduli (see Figure 5a,b). The crossover point frequency first increased with increasing pH, then dropped down for the highest pH. The effect of pH on the crossover modulus was small.



(**a**)



(**b**)

Figure 5. (**a**) Frequency sweep (storage moduli) for H1 sample—pH dependence; (**b**) frequency sweep (loss moduli) for H1 sample—pH dependence

The D1 standard sample achieved the lowest viscoelastic moduli in frequency sweep tests. Both moduli thus increased with increased pH and were almost identical for D1 gels prepared in buffers of pH 5 and 7. Crossover moduli and crossover frequencies were shifted to higher and lower

values, respectively, in comparison to the standard sample. The effect of pH on D2-based gels was much smaller—decreasing pH somewhat toughened the gels, while the highest pH resulted in gels with the lowest moduli, which were very close to the moduli of the standard sample (see Figure S12). Whereas the crossover modulus was comparable for gels prepared at the three lower pH values, its value dropped two orders of magnitude for the gel prepared at the highest pH; similar behaviour was also observed for the crossover frequency (see Table 4). The effect of pH on the basic parameters of the frequency sweep tests is summarized in Table S7.

Table 4. Cross-over frequency and modulus, mesh size for all prepared hydrogels, pH influence.

pH	Sample Name	Cross-over Frequency (Hz)	Cross-over Modulus (Pa)	Mesh Size (nm)
3.5	H1	0.954	34.24	48.25
	H2	1.474	43.19	43.75
	H3	1.732	29.03	56.58
	H4	gel not observed		
	H5	gel not observed		
	H6	gel not observed		
	D1	gel not observed		
	D2	4.511	16320	3.93
5	H1	1.175	29.47	52.27
	H2	0.507	55.82	28.71
	H3	1.972	35.57	54.93
	H4	gel not observed		
	H5	gel not observed		
	H6	gel not observed		
	D1	11.660	16440	5.72
	D2	8.055	15220	5.46
7	H1	3.160	37.54	56.52
	H2	1.196	40.19	50.00
	H3	2.121	27.02	61.19
	H4	gel not observed		
	H5	gel not observed		
	H6	gel not observed		
	D1	1,468	4250	
	D2	7.853	13740	5.18
9	H1	0.650	34.14	57.67
	H2	18.070	78.23	38.34
	H3	1.674	19.79	68.41
	H4	gel not observed		
	H5	gel not observed		
	H6	gel not observed		
	D1	gel not observed		
	D2	0.248	871	6.82

The effect of pH on flow curves was also dependent on hyaluronan molecular weight. Flow curves measured for HMW hyaluronan-containing gels (see Figure 6) almost always showed lower apparent viscosities than the standard sample. Gels prepared at pH 9 possessed the highest viscosities whereas those prepared at pH 7 had the lowest. All flow curves started to overlap at the highest frequencies. In the case of LMW hyaluronan-containing materials, there was about a one order of magnitude decrease in apparent viscosities and a reduction in the Newtonian region compared with the standard sample. There was no significant effect of pH on the flow properties of hydrogels prepared from DEAED and SDS, which accords with the results of oscillatory tests. All hydrogels, independently of pH, displayed pseudoplastic behaviour, with mostly overlapping flow curves possessing a clear Newtonian plateau at low shear rates up to approximately 1.0 s^{-1}, with the exception of the standard sample, where the Newtonian plateau ended at approximately 0.2 s^{-1}.

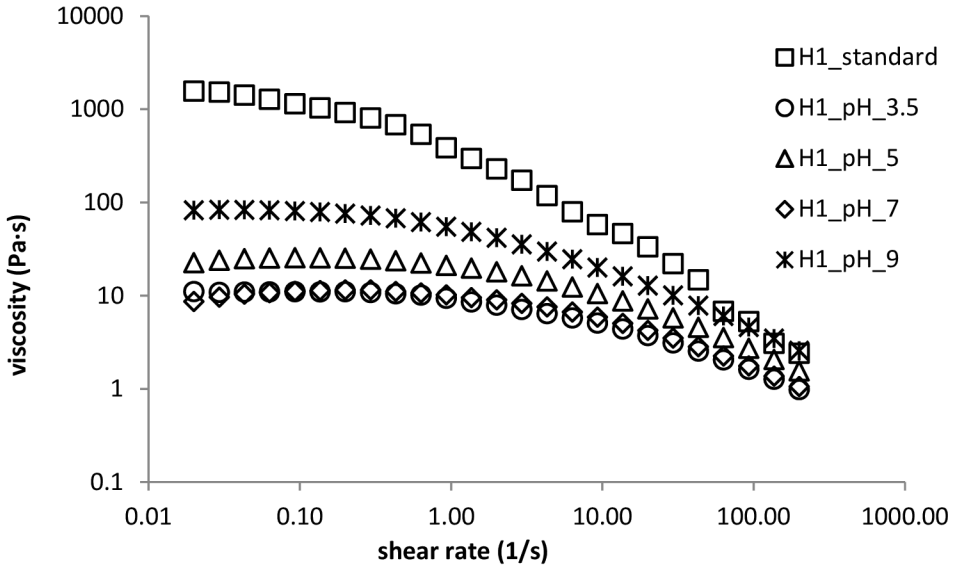


Figure 6. Flow properties of H1 sample—pH dependence.

The results obtained with hydrogels prepared in buffer solutions demonstrated that besides the effect of pH the effect of buffer ions should also be considered, despite the fact that the buffers were prepared at identical ionic strengths. Acidic pH should protonate hyaluronan and thus suppress its electrostatic interactions with surfactant micelles and, consequently, the formation of crosslinks. This was confirmed, particularly in the case of LMW hyaluronan-based gels. Samples prepared in phosphate buffer had approximately similar pH in comparison to the standard sample; however, different rheological properties and decreased acidic pH slightly toughened HMW hyaluronan-based hydrogels. Thus, differences in the size and charge of buffer ions seemed to affect the structures of the formed materials. In the case of DEAED-based gels, a much stronger influence of surfactant concentration on the effect of pH was observed. This could be a result of the better accessibility of DEAED charged groups together with the higher sensitivity of anionic surfactant to pH and buffer ions. Much higher sensitivity to the buffer environment was detected in the sample with higher surfactant concentration—both acidic and alkaline environments hindered the formation of gel material. Whereas alkaline conditions should suppress DEAED charging (the dissociation of amino groups), acidic environments should tend to neutralize the surfactant charge. At lower surfactant concentrations, weak gel was already formed in the absence of buffer, which was not very sensitive to the addition of buffer ions.

3.6. Effect of Multivalent Ions

The presence of multivalent ions affected the linear viscoelasticity region of hyaluronan-based hydrogels detected in strain sweep experiments. The effect of ions on moduli values was stronger in the case of LMW hyaluronan-based hydrogels. The highest moduli were obtained for hydrogels containing Fe^{3+} ions, the lowest for hydrogels with Ca^{2+} ions (HMW hyaluronan) or Mg^{2+} ions (LMW hyaluronan). All hydrogels containing multivalent ions had lower viscoelastic moduli in comparison with the standard sample (without the addition of multivalent ions), because all added cations had the same charge as the micelles and therefore could supress polymer–micelle interactions. On the other hand, Fe^{3+} ions are known to crosslink hyaluronan chains themselves, which could be the reason for the highest moduli observed among the tested ions [23]. The range of the linear viscoelastic region was independent of the presence of multivalent ions.

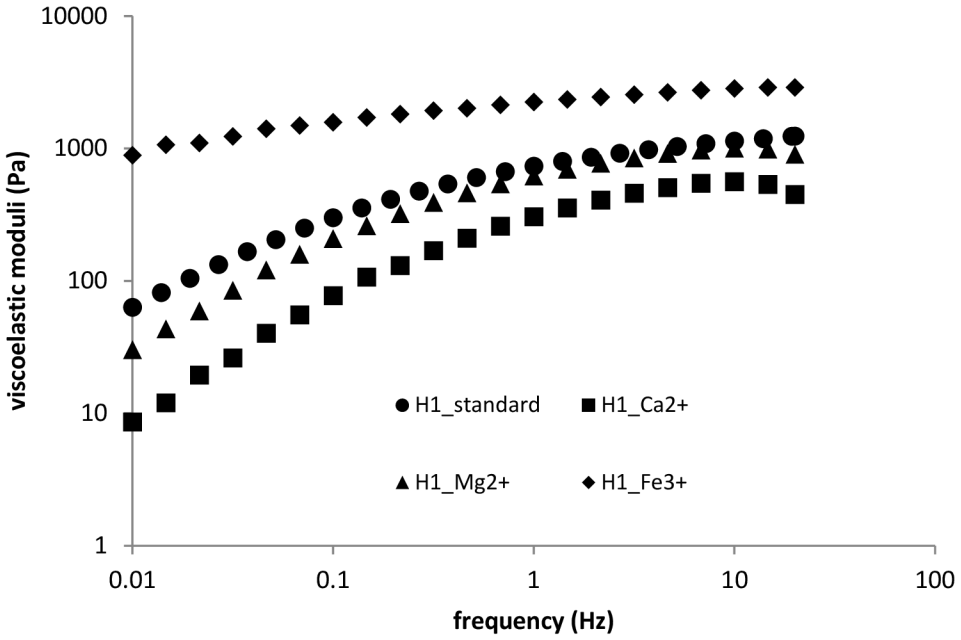
The linear viscoelastic region of DEAED gels was weakly dependent on the presence and type of multivalent ions (Ca^{2+} ions had the biggest effect) and was comparable with that of the standard sample without the addition of multivalent ions. The effect of multivalent ions on the viscoelastic properties

of DEAED hydrogels was dependent on the surfactant concentration. In the case of D1 samples, the presence of multivalent ions caused an increase in both moduli. The highest increase was observed for Ca^{2+} ions. In contrast, sample D2 containing multivalent ions had lower viscoelastic moduli in comparison with the standard sample. Again, the greatest influence was observed for Ca^{2+} ions (more than one order of magnitude higher than standard sample moduli). In contrast to hyaluronan-based hydrogels, there was no significant influence of ferric ions on the values of viscoelastic moduli.

In DEAED-based samples the added multivalent cations had an opposite charge to the surfactant micelles and were thus supposed to affect the hydrogels' behaviour mainly through their interactions with micelles. This is in accord with the observed dependence of the effect of the cations on the surfactant concentration. In an excess of surfactant (a charge ratio greater than 1, D1 samples) the added cations were observed to have a stiffening effect, which could be attributed to the formation of new structures between the added cations and micelles which did not participate in the biopolymer–surfactant network crosslinks. In the case of D2 samples, a proportion of the micelles interacted with the added cations, which disturbed the biopolymer–surfactant network and lowered its rheological parameters. (The basic characteristics of the linear viscoelasticity region in the presence of multivalent ions are summarized in Tables S6 and S7 in Supplementary Material).

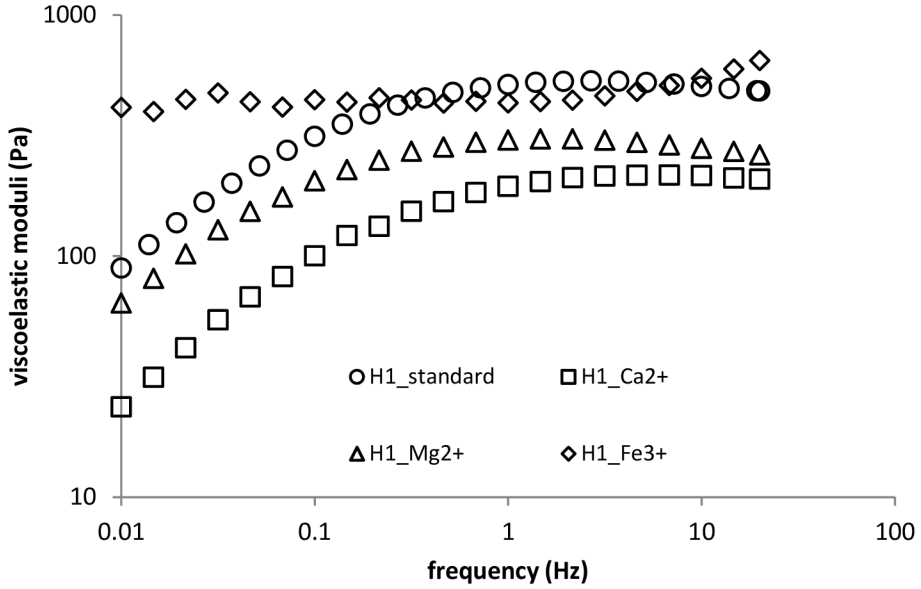
The frequency sweep of HMW hyaluronan-based gels showed a stiffening effect on the part of Fe^{3+} ions, whereas bivalent ions decreased the values of both moduli (for a representative example, see Figure 7a,b).

In particular, ferric ions increased the storage modulus at lower frequencies and shifted the cross-over point to very low frequencies (in fact, the storage modulus outweighed the loss modulus across the whole of the measured frequency range). The frequency sweep of LMW hyaluronan-based gels possessed the same behaviour as that of HMW hyaluronan-based gels in the environment of bivalent ions, where both moduli were slightly decreased. In the presence of ferric ions, no gelation process was observed. The effect of multivalent ions on the viscoelastic properties of both types of hydrogels is summarized in Table 5.



(**a**)

Figure 7. *Cont.*



(**b**)

Figure 7. (**a**) Frequency sweep (storage moduli) for H1 sample—the effect of multivalent ions; (**b**) frequency sweep (loss moduli) for H1 sample—the effect of multivalent ions

Table 5. The effect of multivalent ions to cross-over point in samples, values of frequency and G′ = G".

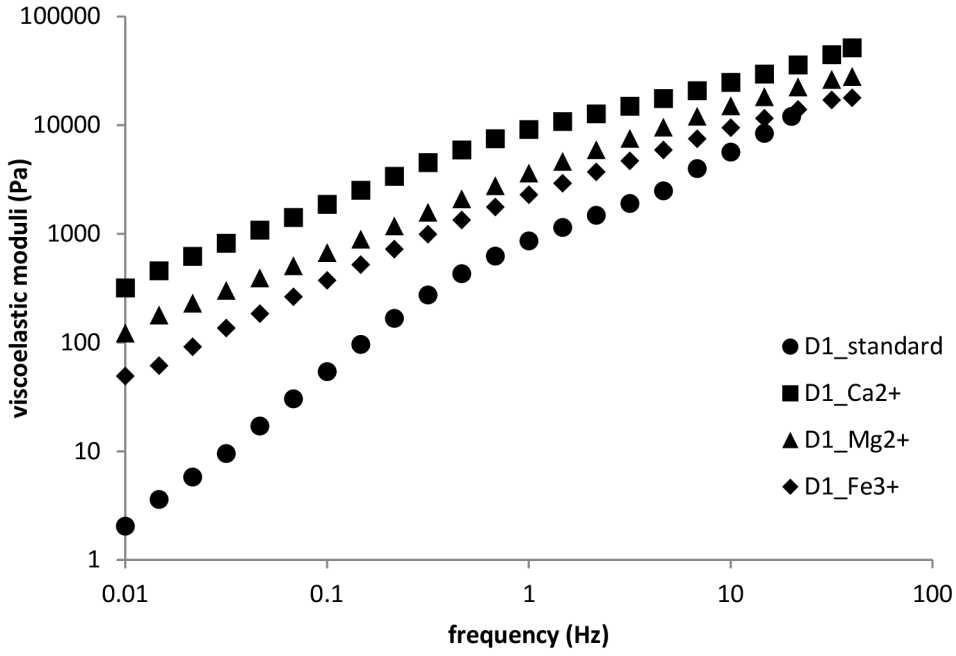
Sample Name	Cross-over Point							
	Original Sample		$CaCl_2$		$MgCl_2{\cdot}6H_2O$		$FeCl_3$	
	Moduli (Pa)	Frequency (Hz)	Moduli (Pa)	Frequency (Hz)	Moduli (Pa)	Frequency (Hz)	Moduli (Pa)	Frequency (Hz)
H1	328	0.14	206	0.16	200	0.09	227	0.01
H2	278	0.10	207	0.07	246	0.14	-	<0.01
H3	338	0.06	255	0.05	154	0.05	-	<0.01
H4	69	0.01	477	19.85	90	0.11	75	0.12
H5	245	4.77	584	6.51	89	0.15	74	0.12
H6	192	2.04	522	2.55	73	0.11	76	0.05
D1	5765	10.00	9089	1.00	14670	10.00	17140	31.62
D2	11430	6.81	no cross-point		5142	3.16	1560	1.47

In the case of DEAED-based hydrogels, the results of frequency sweep investigations basically corresponded to those obtained from strain sweep measurements. Hydrogels with higher surfactant concentrations and containing multivalent ions had lower viscoelastic moduli, whereas those with lower surfactant concentrations had higher viscoelastic moduli in comparison with the standard sample. Hydrogels containing calcium ions had the biggest influence on viscoelastic moduli, which were more than one order of magnitude higher (D1) or lower (D2) than standard sample moduli, see Figure 8a,b.

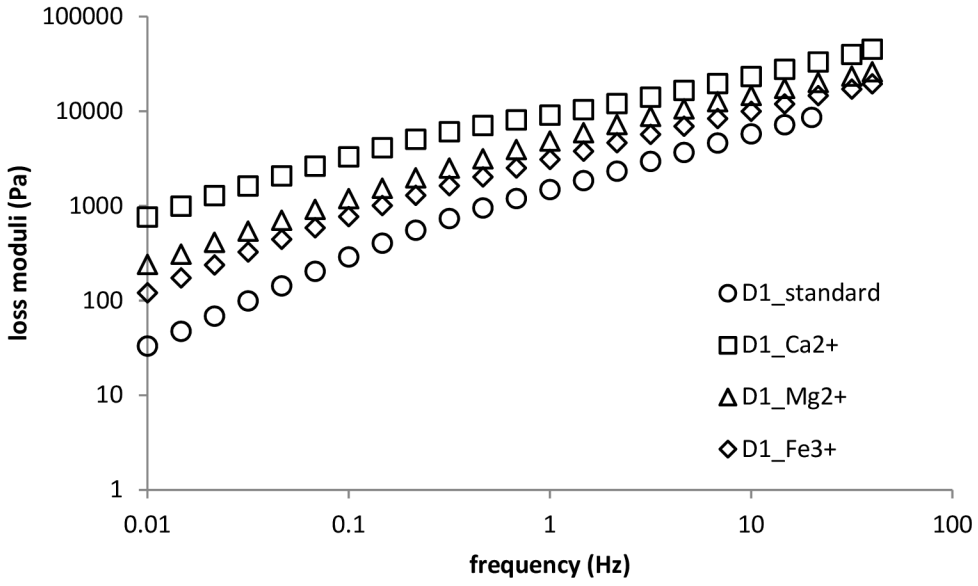
Flow curves detected a very small effect of bivalent ions on hydrogels prepared from both HMW and LMW hyaluronan (Figures S13 and S14 in Supplementary Material); in the case of LMW biopolymer, the curves were shifted slightly upwards, i.e., the ions slightly increased viscosity. The effect of Fe^{3+} ions was stronger, particularly in the case of LMW hyaluronan, where viscosity increased by up to four orders of magnitude and the increase in viscosity was inversely proportional to the shear rate (Figure S14).

Multivalent ions somewhat increased the apparent viscosity within the Newtonian plateau of the standard sample D1, whereas a decrease was observed in the case of D2 samples (Figures S15 and S16). Also, with respect to D1 samples, the Newtonian plateau was disturbed by multivalent ions in the sense that the viscosity was not constant but slightly decreasing. In the presence of multivalent

ions, the viscosity decrease in the non-Newtonian region was not so steep in D1 samples and almost unchanged in D2 samples, except in the Ca-containing sample. Calcium ions had generally the strongest effect on flow curves of DEAED-based hydrogels.



(**a**)



(**b**)

Figure 8. (**a**) Frequency sweep (storage moduli) for D1 sample—the effect of multivalent ions; (**b**) frequency sweep (loss moduli) for D1 sample—the effect of multivalent ions

4. Conclusions

Hydrogels were prepared from oppositely charged biopolymer polyelectrolyte and surfactant in micellar form at a surfactant:biopolymer charge ratio at least equal to one. Hyaluronan acted as a negatively charged biopolymer, whereas DEAED (amino-modified dextran) was used as a positively

charged biopolymer. The former interacted with Septonex (carbethopendecinium bromide) whereas the latter interacted with sodium dodecylsulphate. The rheological properties of hyaluronan-based hydrogels were dependent mainly on the polymer molecular weight. Surfactant concentration (more precisely, the concentration of micelles and a surfactant:biopolymer charge ratio above 1) showed only a small effect. Surfactant concentration was found to have a much greater effect for DEAED-based hydrogels.

Gels were formed at an optimum ionic strength (set by NaCl solution), ranging from 0.15–0.3 M regardless of the type of hydrogel system or surfactant concentration. Outside the optimum range, the formation of either very weak gels (viscoelastic liquids) or viscous liquids was observed.

The effect of increased temperature (37 °C) was dependent on the hydrogel composition and biopolymer (hyaluronan) molecular weight. Both the stiffening and weakening of gels with increased temperature was observed.

Preparing gels in buffers of acidic, neutral, or alkaline pH generally deteriorated their mechanical properties in comparison to hydrogels prepared in NaCl solution with the optimum concentration (ionic strength). The best materials were thus prepared in model physiological solution (0.15 M NaCl) at natural pH. Besides controlling the pH, the buffers also affected the hydrogel properties due to the presence of their ions, which changed the environment of the ionically crosslinked hydrogels.

The addition of multivalent cations decreased the values of the rheological parameters of hyaluronan-based hydrogels probably due to their interference in the interactions between hyaluronan and micelles possessing the same charge as the added cations. In the case of DEAED-based materials, a stiffening effect on the part of the added cations was observed in the presence of excess surfactant charge as a result of their interactions with (excess) micelles which were not involved in the hydrogel network crosslinks.

General differences between the behaviour of hyaluronan and DEAED materials were attributed to the differences in the chain conformations of the two biopolymers and in the accessibility of their charged groups. To sum up our work, it was experimentally proved that the final flow and viscoelastic properties of phase-separated hydrogels based on surfactant:biopolymer can be certainly modulated by changing of chemical composition of the hydrogels as well as physico-chemical parameters (temperature, ionic strength, presence of multivalent ions). These findings are crucial for the potential applications of phase-separated hydrogels on a wider level.

Supplementary Materials: The supplementary materials are available online at http://www.mdpi.com/2073-4360/11/5/927/s1.

Author Contributions: The list of authors described in the introduction contributed to this study. Investigation and methodology were conducted by J.S., S.J. and T.V. with simultaneous supervision by M.P. The first and last of these authors also carried out the consequent formal analysis and original draft writing. Review writing & editing were made by M.P.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kizilay, E.; Kayitmazer, A.B.; Dubin, P.L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *167*, 24–37. [CrossRef] [PubMed]
2. Kizilay, E.; Dinsmore, A.D.; Hoagland, D.A.; Sun, L.; Dubin, P.L. Evolution of hierarchical structures in polyelectrolyte-micelle coacervates. *Soft Matter* **2013**, *9*, 7320–7332. [CrossRef]
3. Thalberg, K.; Lindman, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1478–1483. [CrossRef]
4. Wong, T.C.; Thalberg, K.; Lindman, B.; Gracz, H. Surfactant carbon-13 relaxation and differential line broadening in a system of a polyanion and a cationic surfactant. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 8850–8857. [CrossRef]

5. Thalberg, K.; Lindman, B. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir* **1991**, *7*, 277–283. [CrossRef]
6. Buchold, P.; Schweins, R.; Di, Z.; Gradzielski, M. Structural behaviour of sodium hyaluronate in concentrated oppositely charged surfactant solutions. *Soft Matter.* **2017**, *13*, 2253–2263. [CrossRef] [PubMed]
7. Venerová, T.; Pekař, M. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfatants. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *170*, 176–181.
8. Holmberg, K. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd ed.; John Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2003.
9. Brno University of Technology. Process for preparing physically crosslinked hydrogel with at least one solubilized hydrophobic compound. Czech patent application No. 2014-946, 22 December 2014.
10. Gradzielski, M.; Hoffmann, I. Polyelectrolyte-surfactants complexes (PESCs) composed of oppositely charged components. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *35*, 124–141. [CrossRef]
11. Pescosolido, L.; Feruglio, L.; Farra, R.; Fiorentino, S.; Colombo, I.; Coviello, T.; Matricardi, P.W.; Hennink, W.E.; Vermonden, T.; Grassi, M. Mesh size distribution determination of interpenetrating polymer network hydrogels. *Soft Matter.* **2012**, *8*, 7708–7715. [CrossRef]
12. Flory, P.J. *Principles of Polymer Chemistry*; Ithaca, NY, USA, 1953.
13. Gardel, M.L.; Shin, J.H.; MacKintosh, F.C.; Mahadevan, L.; Matsudaira, P.; Weitz, D.A. Elastic behaviour of cross-linked and bundled actin networks. *Science* **2004**, *304*, 1301–1305. [CrossRef]
14. Cowman, M.K.; Matsuoka, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 791–809. [CrossRef]
15. Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* **1993**, *26*, 6945–6951. [CrossRef]
16. Krause, W.E.; Bellomo, E.G.; Colby, R.H. Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 65–69. [CrossRef] [PubMed]
17. Dumitriu, S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2005.
18. Li, S.; Kelly, S.J.; Lamani, E.; Ferraroni, M.; Jedrzejas, M.J. Structural basis of hyaluronan degradation by Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. *EMBO J.* **2000**, *19*, 1228–1240. [CrossRef]
19. *Polysaccharides*; Dimitru, S. (Ed.) M.Dekker: New York, NY, USA, 1998.
20. Maréchal, Y. Observing the water molecule in macromoleculerared spectrometry: Structure of the hydrogen bond network and hydration mechanism. *J. Mol. Struct.* **2004**, *700*, 217–223.
21. Almond, A.; Sheehan, J.K. Predicting the molecular shape of polysaccharides from dynamic interactions with water. *Glycobiology* **2003**, *13*, 255–264. [CrossRef] [PubMed]
22. Almond, A. Towards understanding the interaction between oligosaccharides and water molecules. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 907–920. [CrossRef]
23. Garg, H.G.; Hales, C.A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2004.

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Příloha 2: Článek v impaktovaném časopise

Enev, V., Sedláček, P., Jarábková, S., Velcer, T., Pekař, M.: ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, roč. 575, č. 1, s. 1–9, ISSN: 0927-7757.

Colloids and Surfaces A 575 (2019) 1–9

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A

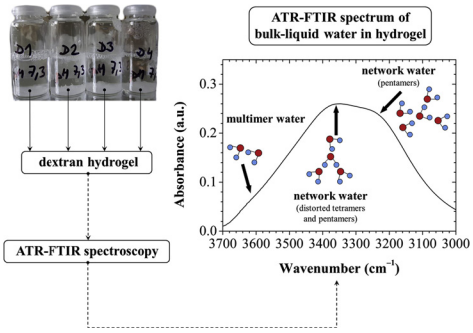
journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels

Vojtěch Enev[1], Petr Sedláček[1], Sabína Jarábková, Tomáš Velcer, Miloslav Pekař*

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

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Hydration
Hydrogels
Infrared spectroscopy
Thermogravimetry
Water

ABSTRACT

Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA) were evaluated as useful techniques to study bulk and hydration water in hydrogels. Hydrogels formed by cationized dextran (DEAE-dextran) and anionic surfactants were used as model materials. The IR technique was applied both on fresh samples and on dehydrating samples during the evaporation process. Not only overall IR spectra but especially the deconvoluted OH band was used in the analysis. IR spectroscopy was shown to provide especially structural information which is nicely complemented by the mainly quantitative data provided by TGA. Significant differences between the dehydration processes for the model gels with different surfactants were revealed. The DEAE-dextran-based hydrogels were characterized by a continuous step dehydration with different drying rates in the initial evaporation period. Three different water subpopulations were identified in all model hydrogel samples. Water molecules in these hydrogels containing a higher concentration of surfactants demonstrated a more ordered hydrogen network, which was formed by subpopulations of pentamers, tetramers and/or distorted pentamers.

1. Introduction

Hydrogels are well-known colloids in which the dispersion medium (phase) is formed by water (aqueous solution) and the dispersed phase is in a solid state formed usually by chains of hydrophilic polymers forming the hydrogel network. Hydrogels find applications in a broad range of products such as pharmaceutical, food, cosmetic, agricultural or horticultural products [1,2]. Biocompatible hydrogels are important materials for drug delivery or tissue engineering where they are applied as soft contact lenses, artificial implants, actuators, wound healing

* Corresponding author.
E-mail address: pekar@fch.vut.cz (M. Pekař).
[1] These authors contributed equally as first authors.

https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.089
Received 27 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 30 April 2019
Available online 03 May 2019
0927-7757/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

dressings, etc. [3,4]. Hydrogel applications benefit from the high content of water which is embedded in their solid-like matrix. Due to the high water content, the transport of low molecular weight compounds in hydrogels is not greatly slower than in liquids but hydrogels retain shapes and can be easily deformed, cut, or even injected [5]. Hydrogels are viscoelastic and therefore moderate deformations of their structural network are reversible (recoverable).

Water content is among the principal characteristics of any hydrogel. This basic and gross parameter can be supplied by a more detailed insight into the water state and binding within the hydrogel meshwork. NMR spectroscopy is a fine tool to address this task [6,7] but even IR spectroscopy, which is much less expensive and in its ATR version easily applicable, can provide valuable information. The IR absorption bands of water (especially those in the range of 3800–3000 cm^{-1}) can provide a molecular-level information related to the involvement of water subpopulations in specific structural arrangements such as water multimers and the water network. Recently, two ways for determining these water subpopulations have been successfully utilized in describing the hydration of polymers: Fourier self-deconvolution and fitting the measured envelope band by the summation of usually three Gaussian components using non-linear fitting tools (i.e. data analysis software) [8–10].

In our previous work, we have focused on preparation and characterization of hydrogels prepared by mixing oppositely charged polyelectrolyte with surfactant in the micellar form [11]. Experimental data suggests that physical crosslinks in these materials are formed preferably by electrostatic interactions between surfactant micelles and charged groups on the polyelectrolyte. Furthermore, by means of a rheological analysis of the gels we have shown that their viscoelasticity can be controlled in a broad range by the molecular weight of the polyelectrolyte and the concentration of micelles. Obviously, water in these hydrogels is expected to form not only a dispersion medium but also to create a hydration shell around micelles and biopolymer chains. Therefore, the current study is aimed at IR-spectroscopic study of water in the polyelectrolyte/surfactant hydrogels. In particular, we focus on hydrogels formed via mixing cationic polyelectrolyte (amino-modified dextran) with anionic surfactants as model materials to evaluate the capability of the IR technique. IR spectroscopy was applied not only on the fresh (fully hydrated) samples but used also in order to follow water loss from hydrogels during evaporation over time in order to detect any changes in the amount of water in the hydrogel. From this perspective, thermogravimetry was also employed as a supporting technique routinely used in monitoring the drying process in highly hydrated materials.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of polyelectrolyte-surfactant hydrogels

In this study diethylaminoethyl-dextran (in the hydrochloride form) was used as a model cationic polyelectrolyte. It was selected on the basis of preliminary tests as a representative of cationic polysaccharides which formed hydrogels with surfactants readily and without specific pH control. It belongs to the class of the low charge density polyelectrolytes [12], similarly as hyaluronan used in our previous work [11]. Dry polymer was purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic; product number D9885, batch number BCBQ8681) and used without any further treatment, The weight averaged molar weight (573 ± 9 kDa) and polydispersity index (2.2) of the DEAE-dextran were determined via gel Size Exclusion Chromatography (Agilent, Infinity 1260 system, PLgel MIXED-C column) with Multiangle Light Scattering (Wyatt Technology, Dawn Heleos II) and Differential Refractive Index (Wyatt Technology, Optilab T-rEX) detection. The nitrogen content reported by the producer was 3%. Two model anionic surfactants were used: sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium tetradecyl sulfate (STS). Both surfactants were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic).

Table 1
Concentration of initial stock solutions of DEAE-dextran, SDS and STS used to prepare hydrogels.

Sample of hydrogel	DEAE-dextran % (wt/vol)	SDS mM	STS
D1	4	400	
D2	4	100	
D3	4		200
D4	4		150

Hydrogels were prepared via mixing a stock solution of biopolymer and a stock solution of surfactant in the volume ratio 1:1. The exact compositions of the respective stock solutions were selected on the basis of preliminary tests (formation of sufficient amount of gel-like material) are summarized in Table 1. The resulting mixtures were left on a shaker overnight to complete the gelation process after which the system was centrifuged, the supernatant was discarded and the gel collected for further experiments. All the stock solutions were prepared in 0.15 mol/L NaCl using ultra-pure water (Purelab Flex, ELGA system, Lane End, United Kingdom). The composition of the formed hydrogels was estimated on the basis of the residual component contents in the supernatant and is given in Table S1 (Supplementary material).

2.2. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetry of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels was performed using a Q5000 TG analyzer (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Approximately 15 mg of fresh hydrogel was weighted into a platinum pan. After inserting the pan into the TG analyser, the sample was either heated from room temperature at a defined heating rate in the air or under a nitrogen atmosphere (dynamic TGA) or the sample temperature was instantaneously equilibrated and maintained at 70 °C in a nitrogen atmosphere (isothermal TGA). In both types of TG analyses, the relative sample weight was recorded continuously with ± 0.1% mass accuracy.

2.3. Infrared spectroscopy

Steady-state and time-resolved FTIR spectra were obtained by means of an Attenuated Total Reflectance (ATR) technique using a Nicolet *i*S50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). All measurements were taken at room temperature (in an air-conditioned room) on the built-in diamond ATR crystal. Steady-state FTIR spectra were recorded over the range 4000–400 cm^{-1} at 4 cm^{-1} resolutions and represented an average of 128 scans. The spectrum of the clean dry diamond ATR crystal in ambient atmosphere (air) was used as the background for infrared measurement. For time-resolved measurement, a small amount (approximately 200 µL) of the polyelectrolyte-surfactant hydrogel was placed directly on the clean dry surface of the ATR crystal and the data collection using Omnic Series data collection software was started. The time-resolved FTIR spectra were collected at regular time intervals while water evaporated from the hydrogels. The individual FTIR spectrum was collected every 5 s as an average of 8 scans with a resolution of 4 cm^{-1} over the course of the drying experiment (total time 200 min at minimum). In order to monitor the water content of hydrogels over time, raw absorption spectra were evaluated with no artificial processing (e.g. baseline or ATR corrections, atmospheric suppression). In order to investigate the change in the water structure in polyelectrolyte-surfactant hydrogels, the absorption band that corresponds to O—H stretching in hydroxyls (3800–3000 cm^{-1}) was processed by deconvolution into individual overlapping components attributed to three states of the water molecule. The positions of the overlapping bands were acquired by the 2nd derivative method according to [13]. Subsequently, the deconvolution was made

by fitting the experimental band to three calculated Gaussian components using Origin 8.1 software. Interpretation of three calculated components was based on the literature [9].

3. Results and discussion

3.1. TGA analysis of the gel-drying process

Thermogravimetry (TGA) regularly represents the first experimental choice when a drying of highly hydrated materials (such as hydrogels) is to be analyzed. The method is based on monitoring the weight of the sample during a user-defined thermal program (i.e. heating/cooling of the sample) in a controlled ambient atmosphere. Therefore, TGA was included in this study to complement and to support the interpretation of the results of the method of that mainly interests us here, i.e. the FTIR spectroscopic drying assay.

Initially, the thermal stability of the gel-forming components was checked via the standard TGA procedure. The respective compound in its original (powder) state was heated to 600 °C with a heating rate of 10 °C/min and the decomposition temperature was determined from the onset of the drop in the sample weight that corresponds to the thermal decomposition. It was confirmed that all the individual gel components in their dry state are on the time scale of the performed experiments thermally stable up to 200 °C.

Subsequently, all the studied polyelectrolyte-surfactant hydrogels were subjected to a similar TGA assay. The respective thermograms are shown in Fig. 1. It can be clearly seen that the weight of all the hydrogel samples drops in a stepwise manner. The first two stages of the sample weight drop, which proceed from the very start of the experiment until the sample reaches a temperature around 120–150 °C, can be attributed to the removal of water from the hydrogel matrix, while at higher temperatures thermal decomposition of the dry content of the hydrogel proceeds. When focusing on the drying behavior of the tested gels, it is noticeable that the main character of the drying process is similar for all four considered hydrogel compositions. Removal of water from a sample proceeds in two steps, the first one arising immediately when the experiment starts, while the second drying step begins when the temperature is approaching the boiling point of water (100 °C). These results indicate that at least two distinguishable types of water are found in the sample, namely more freely bound water which evaporates faster and more strongly bound hydration water removed at higher temperatures. From the thermograms shown in Fig. 1, it is also evident that the latter step of water removal is continuously followed by thermal decomposition of the hydrogel matrix (note the partially overlapping peaks in derivative thermograms represented by dashed

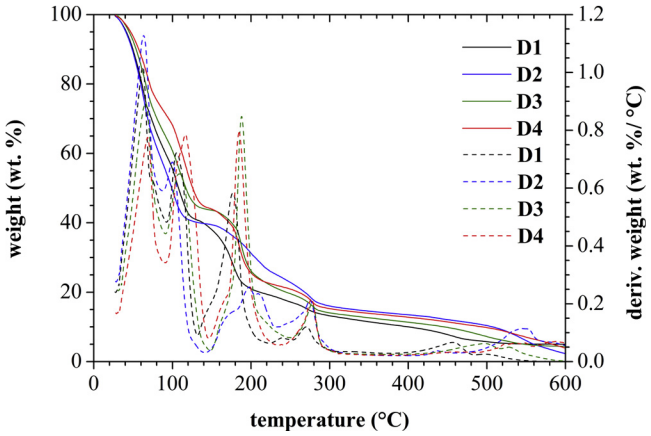


Fig. 1. TGA thermograms provided as time evolution of relative weight (solid curves) and the rate of the weight loss (dashed curves) during heating of tested hydrogels in air (heating rate 10 °C/min). Analyzed gels are labeled according to Table 1.

curves in the temperature region 100–200 °C). For this reason, it is not possible to determine the dry content weights of the tested hydrogels based solely on this basic TGA assay. Therefore, further TGA analyses were performed to provide a more comprehensive view of the drying of the studied gels.

At first, lower heating rates (5 °C/min and 2 °C/min, respectively) were applied. The results of these analyses are shown in the Supplementary material (see Fig. S1). Application of lower heating rates aimed primarily at separating the individual drying steps and also the drying and decomposition processes during the sample heating. Nevertheless, it was found that even at the lowest heating rate applied (2 °C/min), the drying of the sample passes continuously to the thermal decomposition (see Fig. S1). Furthermore, also the drying process maintains its character of more drying steps continuously following each other. The main difference in the drying behavior at the lower drying rates is represented by the shift of the drying steps to the lower temperatures. Similar information was provided also from TGA analysis performed in an inert (nitrogen) atmosphere. Fig. S2 (Supplementary material) shows a comparison of the thermograms of the tested hydrogels obtained under an air and a nitrogen atmosphere, respectively. It can be seen that the zero humidity of the inert atmosphere supports and accelerates drying. This is again represented by the shift of drying rate peaks to the lower temperature. Furthermore, it can be seen that more water is removed during the first drying step in nitrogen than in air (note the increased relative height of the first peak in the drying rate curve). Similarly to drying in air atmosphere, no significant difference in the drying behavior of the tested hydrogels was revealed in the inert ambient atmosphere either.

As far as monitoring of the drying process is concerned, a major limitation of the above-mentioned dynamic (heating) TGA experiments is represented by the fact that decomposition of the thermally labile polymer-surfactant network begins soon after or even during the water-removal process. Therefore, we complemented our study with an isothermal TGA experiment, where the weight of the measured sample and the rate of its change are monitored over time at a constant temperature (at 70 °C in our case). This method has previously been successfully utilized for instance in differentiation of intracellular and extracellular water in microbial cell cultures [14,15]. Fig. 2 shows the initial period (0–20 min) of the isothermal drying process for all tested hydrogels. It can be seen that for all samples the drying rate first increases while the temperature is raised, followed by a substantial decrease in the drying rate during the equilibration of the measurement temperature and isothermal drying. When comparing the particular thermograms of samples D1–D4, several tiny but noticeable differences can be found. Firstly, in agreement with the results of the dynamic TGA analysis presented above, it is evident that when comparing the gels prepared using the same surfactant (D1/D2 and D3/D4), the hydrogel prepared with a higher concentration of surfactant applied is always represented by a lower drying rate in the initial drying period (see the respective maxima in the drying rate curves), but at later times its drying rate curve crosses and exceeds the curve of its counterpart prepared with a lower concentration of surfactant. This can be interpreted as a manifestation of the more densely cross-linked hydrogel network with more strongly-bound hydration water where the higher concentration of the cross-linking agent (surfactant) is used. A more pronounced difference is found for DEAE-dextran gels cross-linked by SDS (D1 and D2) than for those prepared with STS, which is probably caused by the greater difference in the applied surfactant concentrations and, correspondingly, in the density of cross-links in gels with SDS. Furthermore, in these gels (D1 and D2) a sudden change in the drying-rate curve can be found in the initial period (indicated with arrows in Fig. 2). These sudden changes in the drying rate curves are often assigned to a change in the drying mechanism [16]. This indicates that the initial mechanism of the drying process is changed during this initial period for SDS-containing hydrogels but is maintained for the STS-based gels where no such feature is found in the drying curves.

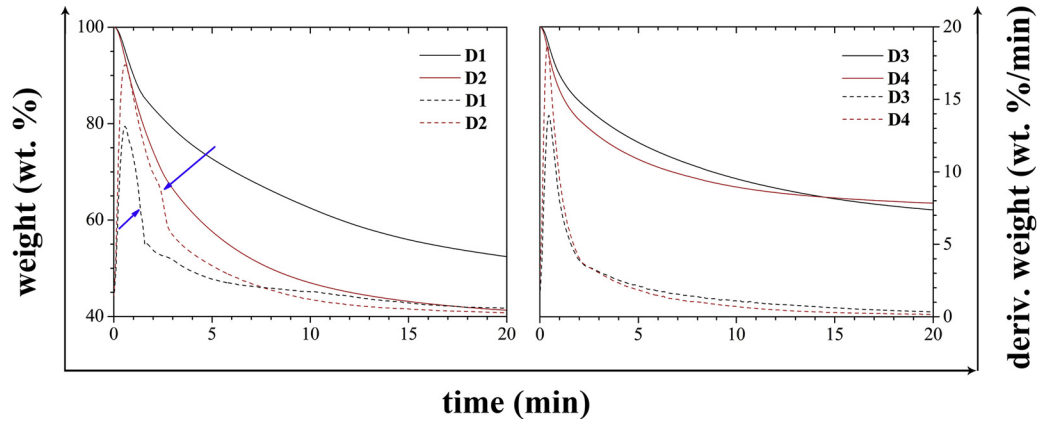


Fig. 2. Initial part (0–210 min) of TGA thermograms recorded during isothermal drying of all tested gels. Evolution over time of the sample weight (solid), drying rate (dashed) and temperature (dash dotted) is shown.

3.2. Steady-state FTIR spectrometry

As a first part of the spectroscopic study of the tested DEAE-dextran hydrogels, the FTIR spectra of the gels were measured immediately after their preparation to see their basic IR features and to characterize their molecular structure in the fully hydrated state. The steady-state ATR-FTIR spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels are presented in Fig. 3. Interpretation of their absorption bands has been carried out according to the literature data [17–19]. The spectra are mainly characterized by bands of aliphatic, alcohol and polysaccharide groups. All the spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels contain a broad band at 3400–3300 cm^{-1} corresponding to the O—H stretching of bulk liquid water. The water molecules are also indicated by the broad deformation band centered at about 1645 cm^{-1} resulting from bending vibration.

The presence of aliphatic chains is demonstrated in the spectral range of 2960–2840 cm^{-1}. Sharp and intensive bands at 2919 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} were ascribed to asymmetric and symmetric C—H stretching in methylene groups, respectively. An absorption band of asymmetric stretching in methyl groups (2956 cm^{-1}) was only observed for sample D1; it occurred as less pronounced shoulders in the rest of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels. The deformation vibrations of $-CH_2-$ and $-CH_3$ groups occur in the spectra at 1470 cm^{-1}. The relative intensity of this band was higher for hydrogels prepared from SDS surfactant. Deformation vibrations of methyl groups are only present in ATR spectra of D1 and D2 hydrogels at 1382 cm^{-1}.

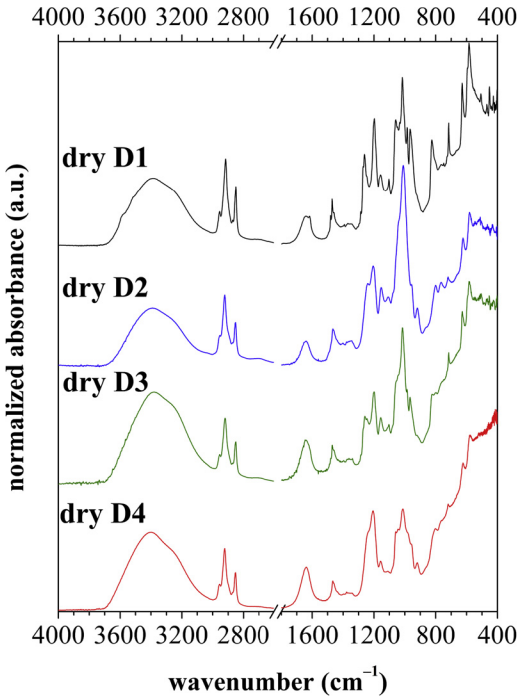


Fig. 3. ATR-FTIR spectra of all tested dry polyelectrolyte-surfactant hydrogels. DEAE-dextran gels with SDS (black and blue solid curve) and DEAE-dextran gels with linear STS (green and red solid curve) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The presence of long carbon chains with more than four atoms (e.g. surfactants), was revealed by the band at 719 cm^{-1}, which is ascribed to C—H in-plane bending of methylene groups. Another significant band occurring at 1300 cm^{-1} can be assigned to out-of-plane C—H bending (methylene twisting) in aliphatic chains. The out-of-plane C—H vibration (methylene wagging) of methylene groups occurs in the spectra at 1315 cm^{-1}. This band was found as a weak band and/or shoulder.

All the spectra of DEAE-dextran hydrogels contain a sharp and intensive band at 1200 cm^{-1} corresponding to tertiary amine groups. All the spectra also contain a less intensive band and/or shoulder at 1260 cm^{-1} corresponding to primary and/or secondary alcohol. Many authors consider the band at 1260 cm^{-1} to be an indicator of C—O stretching in cyclic ethers [18]. In all ATR spectra bands are apparent at 1159 cm^{-1} and 1100 cm^{-1} due to the glycoside C—O—C stretching of polysaccharides.

The main difference among the spectra of polyelectrolyte-surfactant hydrogels appear in the fingerprint region 1100–900 cm^{-1}. A band at about 1018 cm^{-1}, preferentially ascribed to S═O stretching of sulfate groups (salt form), or possibly C—O stretching of primary and secondary alcohols, is apparent in all samples. The sulfate sodium salt groups are also indicated by the sharp band centered at about 1195 cm^{-1} resulting from the S═O symmetric stretching vibrations of the $R-O-SO_2-O^-$. Bands and shoulders at wavenumbers less than 850 cm^{-1} are attributed to asymmetric C—H bending of the methylene groups from which bands at 815 cm^{-1} and 580 cm^{-1} are more evident in hydrogels with SDS.

3.3. Time-resolved FTIR analysis of polyelectrolyte-surfactant hydrogels

In Fig. 4 we show the temporal course of the FTIR spectra of the polyelectrolyte-surfactant hydrogels, i.e., of the D1–D4 samples, during drying. Naturally, drying of the samples is accompanied by decreasing intensity of the O—H vibration bands, which are observed in the regions 3700–3100 cm^{-1} (stretching vibrations) and 1680–1620 cm^{-1} (bending vibration) (see the decrease of the vibration modes depicted in Fig. 2), whereas the relative intensity of the aliphatic, polysaccharide and alcohol bands increase with drying time. These bands were

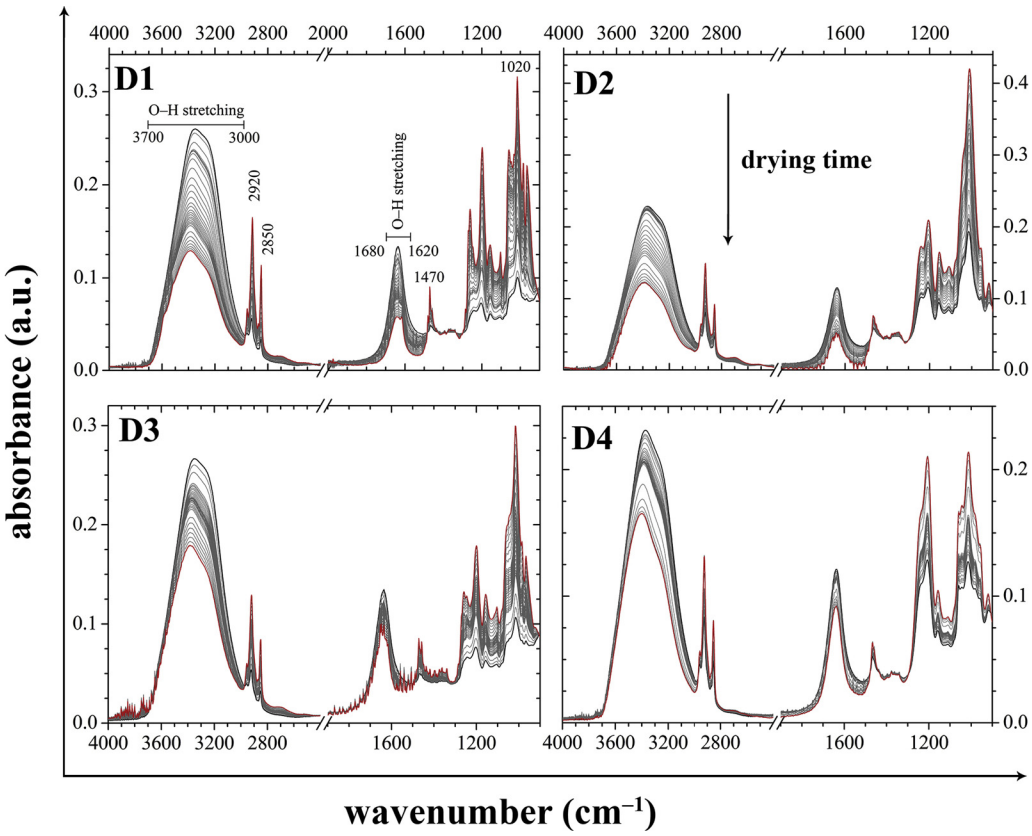


Fig. 4. Development over time of the ATR-FTIR spectra of tested polyelectrolyte-surfactant hydrogels.

observed at around 2956 cm^{-1}, 2920 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1470 cm^{-1}, 1260 cm^{-1}, 1160 cm^{-1}, 1100 cm^{-1} and 1020 cm^{-1}.

The broad −OH stretching band within the 3700–3100 cm^{-1} range represents in fact a convolution envelope which comprises as well FTIR bands arising from different subpopulations of water molecules as the bands that correspond to the hydroxyl groups in DEAE-dextran. In the FTIR spectra of all samples, the position of this broad envelope band was shifted to higher frequencies during the dehydration process. Generally, an increase in the frequency of the O—H vibrations mode is an indicative of a decrease in the degree of hydrogen bonding. The positions of ν(OH) bonds and $\Delta\nu$ values which correspond to the middle frequency of the O—H stretching vibrations before and after drying are listed in Table 2. Interestingly, the value of the red shift of the middle frequency of the O—H stretching band seems to correlate with cross-linking density – hydrogel D1, prepared with a higher concentration of SDS, shows a more pronounced red shift in comparison with the less densely cross-linked gel D2. For the two gels cross-linked by STS micelles (D3 and D4), the mutual difference in the red shifting caused by sample dehydration was much less pronounced, nevertheless also the concentration of the surfactant in the gelling mixture used differed much less for these two gels when compared to their SDS-based analogues.

Table 2
The positions of ν(OH) bonds and $\Delta\nu$ values.

Sample of hydrogel	frequency of ν(OH) band (cm^{-1})[a]		$\Delta\nu$ (cm^{-1})[b]
	before drying	after drying	
D1	3350	3384	34
D2	3366	3389	23
D3	3351	3382	31
D4	3370	3400	30

[a] Frequency was determined as the centre of gravity of absorption band.
[b] $\Delta\nu$ value calculated as difference of centre of gravity of absorption band before and after drying process.

The results of the time-resolved FTIR-assisted drying assay can be provided in several different ways. Aside from the overlap of the individual FTIR spectra recorded at different times (shown in Fig. 4), it can be also presented as a time-frequency 2D absorbance map (Fig. 5) or temporal evolution of absorbance at a selected frequency (Fig. 6). In Figs. 5 and 6, it can be seen that the dehydration of the samples can be clearly monitored and the completion of the dehydration can be easily identified by means of these types of data projection.

The smooth character of the 2D time-resolved FTIR spectra without any abrupt changes points to the continuous character of the dehydration process of the analyzed gels. Nevertheless, under a closer look, it can be revealed that the drying process can be divided into several drying steps. These separate drying steps are even more clearly seen in Fig. 6 where temporal evolutions of absorbances at 3350 cm^{-1} (−OH groups) and 1158 cm^{-1} (glycosides) are shown.

For all samples, the initial dehydration step is accompanied by a rapid decrease in the intensity of water-related bands (see the decrease in absorbance at 3350 cm^{-1} in Fig. 6) while the relative intensity of the vibration bands of the dry matter components increases (note an increase in absorbance at 1158 cm^{-1} in Fig. 6) as the dry matter concentrates at the ATR crystal. This initial time period is probably connected with an equilibration in the contact between the ATR crystal and the gel matrix.

In the second stage of the sample drying, the temporal change in the absorbances at the selected frequencies is much slower. In fact, for samples D1 and D3 the absorbances are almost constant and, surprisingly, for D2 the absorbance at 3350 cm^{-1} even slightly increases during this period. The steady FTIR signal in this stage indicates that drying of the gel proceeds at the meniscus of the gel drop and that the respective change in the water content at this air/gel boundary does not manifest in the FTIR spectra collected at the ATR/gel interface.

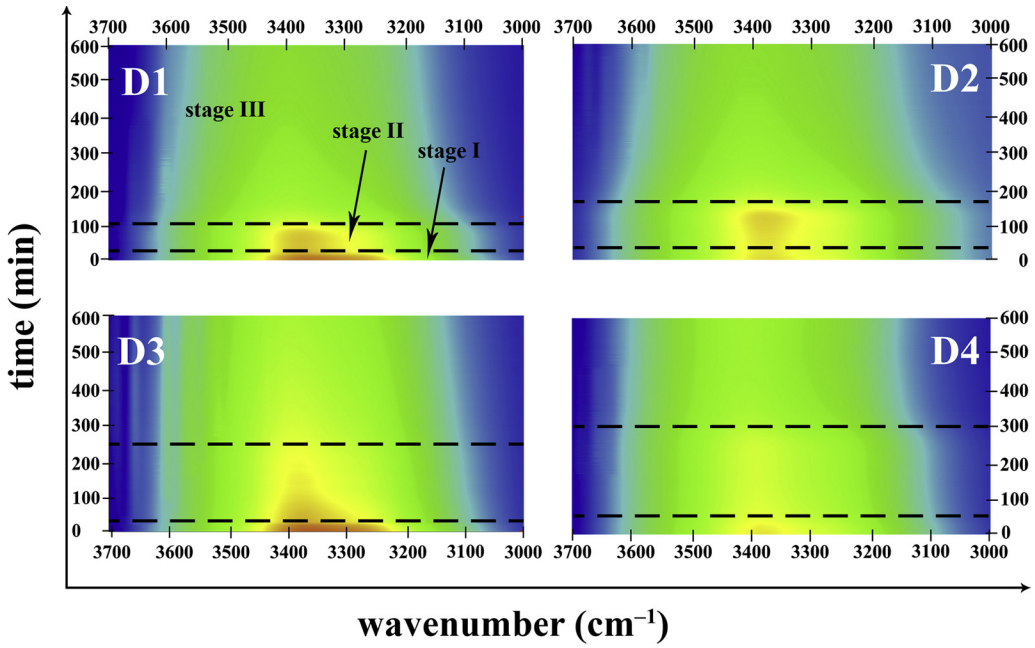


Fig. 5. 2D time-resolved FTIR spectra of the drying of tested polyelectrolyte-surfactant hydrogels. Detail on spectral region with characteristic water molecules vibration band (3700–3000 cm^{-1}). Individual stages of the samples drying are separated by black dashed curves.

The final stage of the sample drying then follows. This stage is characterized by a continuous removal of water from the sample, as illustrated by the gradual decrease in the intensity of the −OH related band and the corresponding increase in the intensity of vibration of the dry matter content (represented by glycosides in Fig. 6).

In general, the main qualitative features found in the results of the time-resolved FTIR analysis stand in good agreement with the TG analysis of the gel drying process. Consistently with the TG results, the FTIR results indicate that the drying proceeds in several steps. Furthermore, the differences between the individual drying steps are less pronounced in the STS-based gels than in the SDS-based ones (note the similar conclusion of the isothermal TG analysis). Nevertheless, there are also several contradictory features found when the results of the two analyses are compared. For instance, the FTIR results indicate a

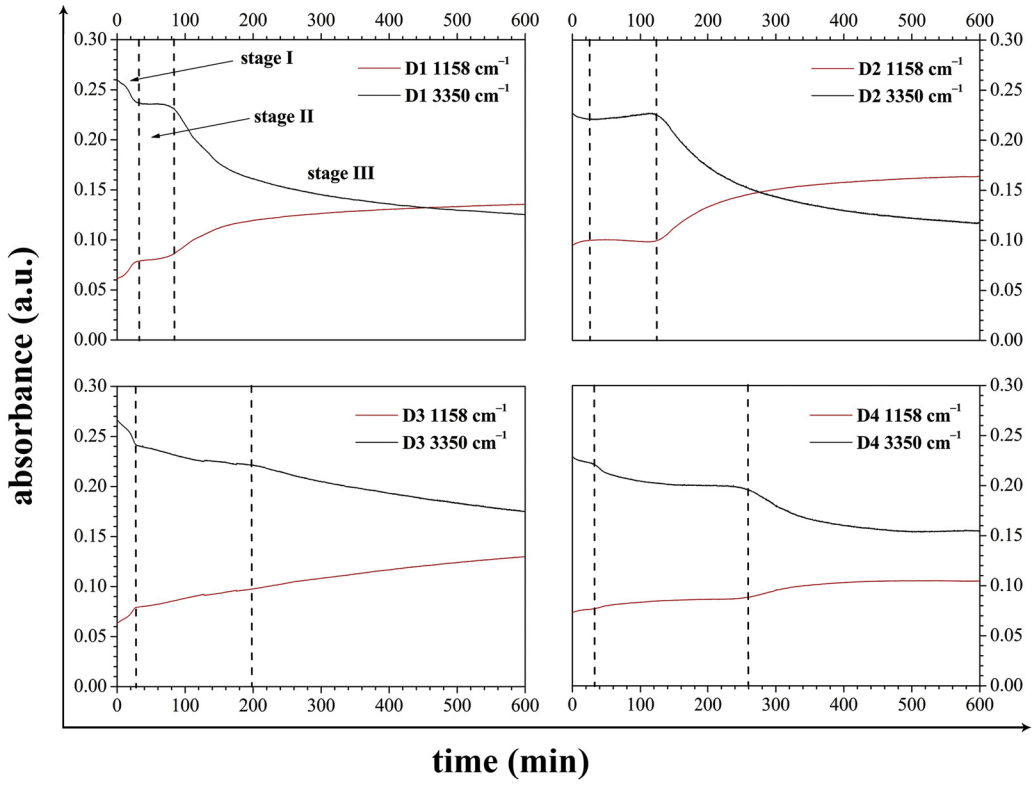


Fig. 6. Time dependences of absorbances at frequencies characteristic for water (−OH at 3350 cm^{-1}) and for dry matter content (glycosidic bond at 1158 cm^{-1}), respectively, during the FTIR-assisted drying of the gels.

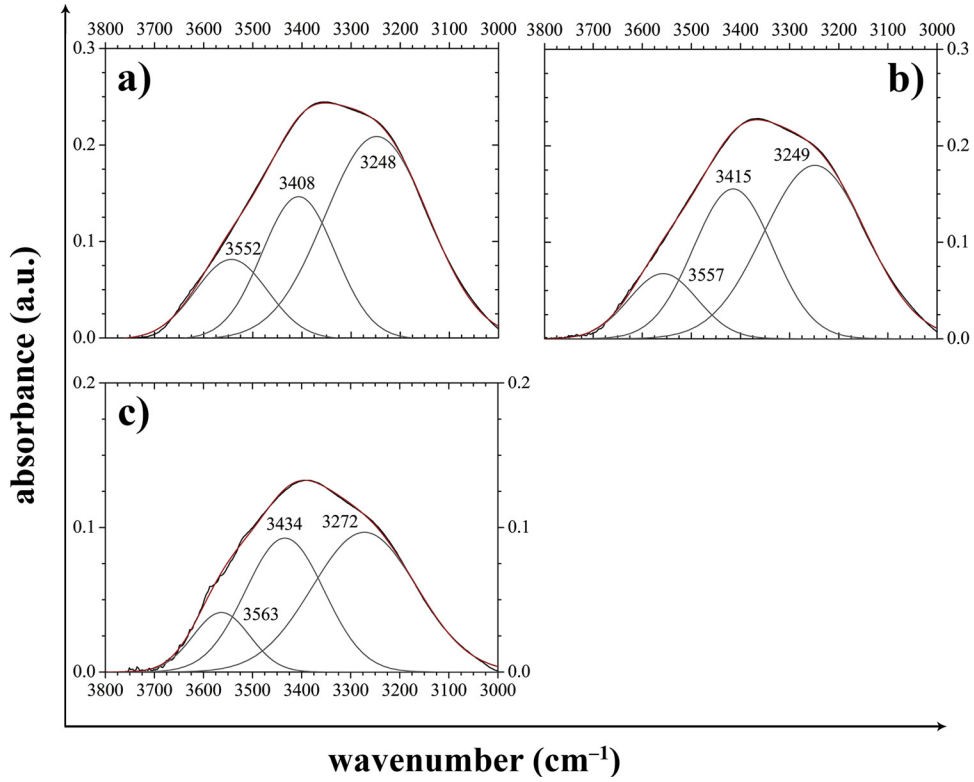


Fig. 7. Example of deconvolution of O—H stretching band for D1 hydrogel at time 0 (a), 60 (b) and 360 min (c), respectively.

slower drying process for the D2 sample as compared to D1 (compare the second stages for the two gels in Fig. 6). It conflicts with the conclusion of the TG analysis that the more densely cross-linked gels have a higher content of bound water. Nevertheless, it is necessary to take into account fundamental differences in the experimental arrangement of the two drying assays. Firstly, the FTIR results may be seriously influenced by the fact that the composition of the gel may affect the wetting of the surface of the ATR crystal and, therefore, the shape of the measured drop. Consequently, different ratios of air/gel to gel/crystal surface areas will necessarily lead to different drying rates detected in the FTIR results. Furthermore, we must bear in mind that contrary to TG analysis performed under a defined atmosphere (dry air or nitrogen), FTIR assisted drying proceeds under ambient laboratory conditions. Therefore, it is almost impossible to maintain the same conditions during different drying experiments. Even slight changes in temperature or relative humidity in close vicinity to the hydrogel drop may result in severe alteration of the drying kinetics (for instance, the above-mentioned temporal increase in absorbance at 3350 cm^{-1} for sample D2 in the drying stage II or a similar feature found in the spectra of D4 at the end of the drying experiments could in fact be an indicator of reverse absorption of the air humidity). Therefore, without adjusting and controlling for the drying atmosphere, the results of the time-resolved ATR FTIR drying assay should be interpreted rather in qualitative and structural terms than for determination of any quantitative parameters describing particular drying kinetics.

3.4. Water structure assay by deconvolution of O—H stretching band

Therefore, we focused our further interpretation of the time-resolved FTIR analysis on a more detailed evaluation of structural changes in gels that take place during their dehydration. It has already been discussed that the drying is accompanied by a red shift of the O—H stretching band (in particular its middle frequency). From this observation it was concluded that drying of the gels is accompanied by weakening of the hydrogen bonding in the system, but no structural interpretation of this information can be provided without further analysis of the shape of this complex vibration band.

Generally, bulk liquid water molecules in hydrogels can form up to four hydrogen bonds, which results in formation of various structural motifs such as multimer and network water clusters. Several spectrometric techniques such as X-ray spectrometry, IR and Raman spectrometry were used to determine different local structures in bulk water that arise from variations in the arrangement of hydrogen bonds [20,21]. The FTIR approach is based on a detailed analysis of the broad vibration band centered at about 3350 cm^{-1} which corresponds to the O—H stretching of water molecules and is sensitive to the proportional representation of the local structures of liquid water.

Three principal water subpopulations with specific component vibration bands are usually distinguished in the OH stretching envelope. An intensive component peak centered at about 3250 cm^{-1} is ascribed to water molecules strongly bonded via linear hydrogen bonds into tetrahedrally coordinated water pentamers (often called quasi-crystalline water). Another significant peak occurs near 3400 cm^{-1} and is assigned to out-of-phase O—H stretching in less perfectly organized structures such as distorted pentamers and tetramers (solid-like water). These structures are usually characterized by non-linear and/or partially disrupted hydrogen bonds. The two above-mentioned subpopulations are often collectively referred to as network water. The less intensive band centered at about 3560 cm^{-1} corresponds to the water molecules with a highly disturbed hydrogen bond network (liquid-like water).

In our work, a time-resolved variant of such a structural analysis was performed on the OH stretching band in order to reveal any observable effects of the dehydration process on the local structures of water molecules in the tested hydrogel samples. For this purpose, deconvolution of the broad envelope band was performed in the region 3800–3000 cm^{-1} at three sample-specific times. These times were chosen in order to cover the three main stages of the drying process as described in the previous text (see Fig. 6). For example, Fig. 7 shows the results of this deconvolution for the sample D1. The specific times for

Table 3
Position and proportional representation of subpopulation water molecules in DEAE-dextran hydrogels (and in reference dry DEAE-dextran for comparison).

	t (min)	frequency of the component peak (cm^{-1})			relative peak area (% of total peak area)		
		liquid-like	solid-like	quasi-crystalline	liquid-like	solid-like	quasi-crystalline
D1	st. I (0 min)	3552	3408	3248	18%	28%	54%
	st. II (60 min)	3557	3415	3249	13%	35%	52%
	st. III (360 min)	3563	3434	3272	12%	37%	51%
D2	st. I (0 min)	3551	3415	3253	20%	28%	52%
	st. II (60 min)	3550	3416	3255	15%	32%	53%
	st. III (400 min)	3550	3437	3292	12%	26%	62%
D3	st. I (0 min)	3564	3409	3236	19%	35%	46%
	st. II (120 min)	3561	3417	3248	11%	40%	49%
	st. III (500 min)	3560	3435	3276	10%	33%	57%
D4	st. I (0 min)	3553	3416	3254	20%	29%	51%
	st. II (170 min)	3559	3423	3261	14%	38%	48%
	st. III (510 min)	3557	3431	3278	11%	37%	52%
DEAE-dextran		3510	3367	3222	7%	63%	30%

sample D1 were chosen as follows: the start of the drying process (representing stage I of the drying process, Fig. 7a), at 60 min of the drying process (stage II of the drying process, Fig. 7b) and at 360 min of the drying process (stage III of the drying process, Fig. 7c), respectively.

The results of the deconvolution of the OH stretching band at the specific times are summarized for all tested samples in Table 3. For the three deconvolution components, both the frequency and the relative proportion of the total area of the envelope stretching band are provided in the Table 3. Apparently, the time evolution of the relative areas of the component bands could lead to the interpretation that no significant changes over time were revealed for the relative representation of the component bands, although it can be seen that the relative area of the more structured water subpopulations (quasi-crystalline and solid-like) slightly increase over time at the expense of a corresponding decrease in the area of the liquid-like water component. Nevertheless, at this point it should be emphasized that the relative area of the respective bands is not equal to the relative content, because hydrogen bonded structures always show a significantly increased intensity of the respective infrared band [17]. Therefore, the absolute content of the least-structured subpopulation will in fact be significantly higher compared to the percentage values provided in Table 3. The relative decrease in the representation of this component between the first evaluated time (the start of the experiment) and the last (stage III) is approaching 50% of its initial relative content, which is not negligible. Evidently, the highest losses of liquid-like water molecules occur at first step of drying process. This step took place in the time range from 0 min to 60 min for hydrogels with SDS, while this step was significantly longer for STS-based hydrogels. We also see that the relative content of the multimer (liquid-like) subpopulation at the beginning of the drying process is very similar for all DEAE-dextran hydrogels, which indicates that the relative representation of the network forming and liquid-like water subpopulations is controlled primarily by the polysaccharide component rather than by the density and nature of the cross-links in the gel matrix.

Moreover, it is evident from the results shown in Table 3 that for all hydrogel samples, the position of absorption bands which correspond to the network water molecules shifts to higher frequencies during the drying process (red shifts up to 40 cm^{-1} were found). On the contrary, the position of the liquid-like water components remains almost unaltered. In the first step of the evaporation process, a less-pronounced shift to higher frequencies was observed while the **red**-shift of network subpopulations such as pentamers, tetramers and/or distorted pentamers was more apparent in the subsequent drying step (stage III). These results suggest that during the excess dehydration stage, a progressive distortion of the hydrogen bonds takes place in the structure of network water molecules. Most likely, the gradual destruction of the hydrogen bonded structures during the drying process can be attributed to the increasing relative content of water that is strongly bound in the hydration layer of the polysaccharide content where the water molecules are less accessible to network-forming water-water interactions. This finding is in good agreement with the generally-accepted strong hydration of hydrophilic polysaccharides, i.e. hyaluronic acid, chitosan and phytoglycogen [9], and of the high relative content of strongly-bound hydration water (referred to as “high-density” water [22],) in the hydrogels of these biopolymers [23]. Last but not least, it is necessary to take into account also the fact that as a result of excess drying of the gel, the intrinsic OH groups of the DEAE-dextran participate more in the overall shape of the OH stretching band. Nevertheless, as can be seen in Fig.S3 and Table 3, results of the deconvolution of dry DEAE-dextran are significantly shifted in frequencies as well as in relative peak areas which indicates that even in the final drying stage, the discussed results of −OH stretching band deconvolution do represent the residual water content rather than the dry mass of the gel.

4. Conclusion

ATR-IR spectroscopy is a relatively simple and effective technique to study the structure of water molecules in polyelectrolyte/surfactant hydrogels. Structural details can be obtained particularly from the deconvolution of the broad band located around 3350 cm^{-1} that corresponds to the O—H stretching of water molecules. The effect of the water content can be addressed by taking the spectra over time during the drying of the gel sample. IR spectroscopy provides limited quantitative information. It was shown that thermogravimetry is a suitable complementary technique providing the quantitative data, including kinetic data on the drying (dehydration) process, while being much less informative about the structural details. Thermogravimetry also enables simpler control of the measurement atmosphere. The usefulness of the combination of these two techniques was demonstrated using the example of polyelectrolyte/surfactant hydrogels, but we believe that it can be applied to other hydrogel systems as well.

Acknowledgement

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

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.089.

References

[1] E.M. Ahmed, Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review, J. Adv. Res. 6 (2015) 105–121, https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006.

[2] K.J. De France, F. Xu, T. Hoare, Structured macroporous hydrogels: progress, challenges, and opportunities, Adv. Healthc. Mater. 7 (2018) 1700927, , https://doi.org/10.1002/adhm.201700927.

[3] S.K. Shukla, A.W. Shaikh, N. Gunari, A.K. Bajpai, R.A. Kulkarni, Self assembled hydrophobic nanoclusters of poly(methyl methacrylate) embedded into polyvinyl alcohol based hydrophilic matrix: preparation and water sorption study, J. Appl. Polym. Sci. 111 (2009) 1300–1310, https://doi.org/10.1002/app.29155.

[4] K.M. Park, D. Lewis, S. Gerecht, Bioinspired hydrogels to engineer cancer microenvironments, Annu. Rev. Biomed. Eng. 19 (2017) 109–133, https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044619.

[5] K.H. Bae, L.-S. Wang, M. Kurisawa, Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges, J. Mater. Chem. A. 40 (2013) 5371–5538, https://doi.org/10.1039/C3TB20940G.

[6] I.D. Kuntz, W. Kauzmann, Hydration of proteins and polypeptides, Adv. Protein Chem. 28 (1974) 239–345, https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60232-6.

[7] E.V. Sillatta, M.I. Velasco, C.G. Gómez, R.H. Acosta, M.C. Strumia, G.A. Monti, Evaporation kinetics in swollen porous polymeric networks, Langmuir 30 (2014) 4129–4136, https://doi.org/10.1021/la500031t.

[8] P. Musto, M. Galizia, M. Pannico, G. Scherillo, G. Mensitieri, Time-resolved fourier transform infrared spectroscopy, gravimetry, and thermodynamic modeling for a molecular level description of water sorption in poly(ε-caprolactone), J. Phys. Chem. B 118 (2014) 7414–7429, https://doi.org/10.1021/jp502270h.

[9] M. Grossutti, J.R. Dutcher, Correlation between chain architecture and hydration water structure in polysaccharides, Biomacromolecules 17 (2016) 1198–1204, https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00026.

[10] E.A. Disalvo, M.A. Frias, Water state and carbonyl distribution populations in confined regions of lipid bilayers observed by FTIR spectroscopy, Langmuir 29 (2013) 6969–6974, https://doi.org/10.1021/la304390r.

[11] T. Venerová, M. Pekař, Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants, Carbohydr. Polym. 170 (2017) 176–181, https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.087.

[12] D.E. Wingrove, P. Ander, Conductivity of aqueous solutions of ionic polysaccharides containing simple salts, Macromolecules. 12 (1979) 135–140, https://doi.org/10.1021/ma60067a028.

[13] A. De Ninno, A. Congiu Castellano, E. Del Giudice, The supramolecular structure of liquid water and quantum coherent processes in biology, J. Phys. Conf. Ser. 442 (2013) 1–9, https://doi.org/10.1088/1742-6596/442/1/012031.

[14] S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, V. Krzyzanek, J. Nebesarova, O. Samek, D. Kucera, P. Benesova, K. Hrubanova, M. Milerova, I. Marova, The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments, N. Biotechnol. 39 (2017) 68–80, https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008.

[15] P. Sedlacek, E. Slaninova, V. Enev, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, K. Hrubanova, V. Krzyzanek, O. Samek, S. Obruca, What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2019), https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z.

[16] P. Sedlacek, E. Slaninova, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances, N. Biotechnol. 49 (2019) 129–136, https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005.

[17] B.H. Stuart, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, 1st ed., John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, Hoboken, 2004.

[18] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo, Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments, Biopolymers 72 (2003) 10–20, https://doi.org/10.1002/bip.10245.

[19] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo, Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake, Biopolymers 72 (2003) 149–161, https://doi.org/10.1002/bip.10342.

[20] M.W. Mahoney, W.L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions, J. Chem. Phys. 112 (2000) 8910–8922, https://doi.org/10.1063/1.481505.

[21] A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, Perspective on the structure of liquid water, Chem. Phys. 389 (2011) 1–34, https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2011.07.021.

[22] P.M. Wiggins, High and low density water in gels, Prog. Polym. Sci. 20 (1995) 1121–1163, https://doi.org/10.1016/0079-6700(95)00015-8.

[23] P.M. Wiggins, R.T. Vanryn, D.G.C. Ormrod, Donnan membrane equilibrium is not directly applicable to distributions of ions and water in gels or cells, Biophys. J. 60 (1991) 8–14, https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82026-4.

Příloha 3: Článek v impaktovaném časopise

Klučáková, M., Jarábková, S., Velcer, T., Kalina, M., Pekař, M.: Transport of a model diffusion probe in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, roč. 573, č. 1, s. 73–79, ISSN: 0927-7757.

Colloids and Surfaces A 573 (2019) 73–79

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A

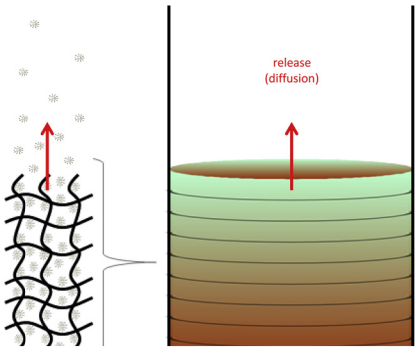
journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

Transport of a model diffusion probe in polyelectrolyte-surfactant hydrogels

Martina Klučáková*, Sabina Jarábková, Tomáš Velcer, Michal Kalina, Miloslav Pekař

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Hyaluronan
Cationized dextran
Surfactant
Dye
Diffusion

ABSTRACT

Interactions of biopolymeric electrolytes with oppositely charged surfactants can result in micelle-like nanocontainers capable to dissolve hydrophobic substances. These micelle-like nanostructures can solve problems with hydrophobic nature of pharmaceutically active substances and be potentially usable for medical applications. In this study, two types of hydrogels were prepared: 1) based on hyaluronan and cationic surfactant septonex (carbethoxypendecinium bromide) and 2) based on diethylaminoethyl dextran and sodium dodecylsulphate. Nile red as a dye diffusion probe was incorporated into hydrogel in their preparation and then its release into surfactant solution and physiological saline was monitored. The release of NR from hydrogels was characterized by the effective diffusion coefficients of NR and structural parameters of hydrogels. The diffusion of NR in hydrogels was dependent on the molecular weight of polyelectrolyte and the ratio between charges of polyelectrolyte and surfactant. In the case of lower ratios, a bigger part of NR was probably incorporated in "pearl necklace structure" which suppressed its mobility. The increase of concentration of surfactant was connected with higher content of NR in free micelles or micelle-like aggregates and the increase in the release of NR. The formation of bigger micelles based on NR and SDS (in comparison with micelles based on NR and septonex surfactant) resulted in their lower diffusivity.

1. Introduction

Hydrogels are very similar to biological tissues [1]; therefore, because of their unique characteristics, they are widely used for drug delivery systems in medicine [2–5]. Their advantages are mainly prolonged drug action, reduced side effects, and low frequency with which drugs need to be administered [3,6,7]. The utilization of hydrogels in the production of controlled release systems has been intensively studied. An excellent review was published by Oh et al. [8]. They described several types of hydrogels and their methods of

* Corresponding author.
E-mail address: klucakova@fch.vutbr.cz (M. Klučáková).

https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.042
Received 26 February 2019; Received in revised form 16 April 2019; Accepted 16 April 2019
Available online 17 April 2019
0927-7757/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

preparations. Since hydrogels contain a large amount of water, they are not capable of solubilizing hydrophobic compounds. This incompatibility of hydrogels with hydrophobic solutes can be overcome by means of the incorporation of some hydrophobic domains in the hydrogel structure. These domains provide the ability to solubilize hydrophobic compounds in the structure of the hydrogel while the hydrophilic network and aqueous internal phase of the gel preserve its biocompatibility. The classification, preparation and properties of hydrogels with micellar hydrophobic (nano)domains were recently reviewed by Pekař [5]. One possibility is the combination of polyelectrolytes with oppositely charged surfactant ions. By appropriate control of molecular weight and concentration hydrogels, can be created spontaneously by phase separation from the solutions of polyelectrolyte-surfactant complexes. The preparation of these hydrogels is fast and cost-effective (with no need for additional cross-linkers) and the content of surfactant self-assemblies in the structure enhances the ability of the gel to solubilize hydrophobic solutes. Interactions in polyelectrolyte-surfactant systems and their phase behavior were described by Piculell [9]. He attempted to use knowledge of phase behavior in the successful design of such systems with the desired properties, as there is still a lack of systematic knowledge on how to tune the phase behavior of systems. Li and Wagner [10] reported a semi-empirical relations characterizing the strength of cooperative binding in oppositely charged, salt-free polyelectrolyte–alkyl surfactant mixtures for a broad range of systems reported in the literature. The cooperative binding strength depends on the surfactant's hydrophobicity and the linear charge density of the polyelectrolyte.

In this work, hyaluronan and dextran (more precisely, cationized dextran see below) were used as polyelectrolytes. Hyaluronan and dextran are naturally occurring carbohydrate-based biopolymers. Hyaluronan is a linear polysaccharide made up from alternating units of glucuronic acid and N-acetylglucosamine [11]. Dextran is a bacterial-derived polysaccharide consisting of α-1,6-linked D-glucopyranose residues, and generally produced by enzymes from certain strains [12]. These biopolymers are non-toxic and offer high water solubility, biocompatibility, and biodegradability. They have a high content of functional groups utilizable in cross-linking [8]. Thalberg and Lindman [13] reported, perhaps for the first time, on the formation of a gel phase in hyaluronan-alkyltrimethylammonium halide systems. They investigated the influence of chain length on phase separation, solubility, self-diffusion, and dye solubilization. They demonstrated that the binding of surfactant to hyaluronan was taking place for surfactants with ten or more carbons in alkyl chains. Wong et al. [14] studied the gel phase of a tetradecyltrimethylammonium bromide and sodium hyaluronate system. ^{13}C relaxation results showed that surfactant molecules in the surfactant/polyanin gels formed relatively small micelle-like aggregates which were adsorbed on the polyelectrolyte chains. Thalberg and Lindman [15] investigated gel formation in aqueous systems of hyaluronan and alkyltrimethylammonium bromide by means of ^{1}H NMR transverse relaxation and self-diffusion measurements. They confirmed the existence of micelles bound to the biopolymer and described the physical-chemical properties of the formed hydrogels located in different regions of the phase diagram. The phase behavior of hyaluronan-alkyltrimethylammonium halide systems was studied by Thalberg et al. [16,17]. They investigated the phase diagrams of these systems and the influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. They concluded that the longer the hydrocarbon chain of the surfactant, the larger was the two-phase region in the phase diagram. A reduction in the molecular weight of hyaluronan resulted in a slightly changed position of the two-phase region [16]. The effect of the addition of NaBr was investigated in their subsequent work [17]. The addition of low concentrations of salt led to a reduction in the two-phase region of the phase diagram, and at 250 mM NaBr, phase separation no longer occurred. At high salt concentrations (above 500 mM), phase separation also occurred, but it was of a type totally different from that observed at no or low salt additions and involved the separation into surfactant-rich and polymer-rich solutions. The rheological properties of hydrogels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants were investigated by Venerová and Pekař [11]. They studied the influence of the molecular weight of hyaluronan on the rheological behavior of hydrogels formed using cetyltrimethylammonium bromide and carbethopendecinium bromide as surfactants at two different concentrations.

The swelling and mechanical properties of dextran hydrogels for bioseparation applications were studied by Dong et al. [18]. They observed strong interactions between the prepared dextran hydrogel and sodium dodecylsulphate. Liu and Li [19] used this surfactant for the formation of micelles with the incorporated drug as the initial substance in the preparation of the agarose hydrogel. They observed that the presence of the surfactant greatly increased the solubility of the drug in water. Their results showed that the surfactant prolonged drug release by reducing the diffusion coefficient of the drug in the hydrogel. Bai et al. [20] studied interactions between several different surfactants and dextran modified with deoxycholic acid. They determined the enthalpies of micelle formation and critical micelle concentrations for pure surfactants, as well as the interaction and aggregation enthalpies for surfactant-polymer systems. They showed that the interaction between modified dextran and sodium dodecylsulphate was driven by the interaction between the bile acid moiety and the surfactant. Demirbilek and Dinç [21] studied the interaction between dextran-epichlorohydrin hydrogel and water-soluble dye (murexide). Their results showed that the adsorption capacity of hydrogel increased with increasing contact time and initial dye concentration, but decreased with increasing pH value. No changes in adsorption ability of the hydrogel were observed in alkaline solutions. Electrostatic interactions and hydrogen bonds between the dye and hydrogel were confirmed on the basis of measured FTIR spectra. The effect of electrostatic interactions between ibuprofen sodium and dextran on the tableting properties and ibuprofen release was investigated by Abioye and Kola-Mustapha [22]. Ibuprofen exhibited poor flow, compaction (tableting) and dissolution behavior due to its hydrophobic structure and its high cohesive, adhesive and viscoelastic properties. When it was granulated with dextran the electrostatic interaction and hydrogen bonding between ibuprofen and dextran were confirmed. The flowability, tableting, and dissolution characteristics with potential for application in controlled drug release systems were improved and dictated by the concentration of dextran.

In this work, the release of dyestuff from hydrogels based on hyaluronan and dextran was studied. To assess the potential of hydrogels for use in the development of novel drug-carrier systems, it is necessary to describe them in terms of their permeability or diffusivity with respect to different solutes. Nile red was chosen as a model hydrophobic diffusion probe. The dye was used to form surfactant micelles with incorporated nile red and then as the initial substance in the preparation of biopolymeric hydrogels. Our research group is experienced in the investigation of diffusion in biopolymeric hydrogels [23–25], as well as, the interactions between biopolymers and surfactants [11,26–29].

2. Materials and methods

In this work, hyaluronan and cationized dextran were used as polyelectrolytes. Hyaluronan (the sodium form) was obtained from Contipro (Czech Republic) and used in two different molecular weights, abbreviated henceforth as 310 kDa (LMW) and 1250 kDa (HMW). The exact molecular weights were determined by means of size exclusion chromatography coupled with multiangle static light scattering, differential refractive index, and UV/VIS detection (SEC chromatographic system from Agilent Technologies, detectors from Wyatt Technology). The exact molecular weights were 309 ± 4 kDa and 1247 ± 5 kDa. Diethylaminoethyl-dextran hydrochloride (Sigma-Aldrich, Czech Republic; DEAED) was used in one molecular weight, abbreviated

Table 1
Concentrations of initial solutions used to prepare hydrogels.

Hydrogel	Polyelectrolyte	Concentration of polyelectrolyte (% w/v)	Surfactant	Concentration of surfactant (mM)
D-I	Cationized dextran	4	SDS	400
D-II	Cationized dextran	4	SDS	100
H-I	HMW hyaluronan	2	Septonex	200
H-II	HMW hyaluronan	2	Septonex	100
L-I	LMW hyaluronan	2	Septonex	200
L-II	LMW hyaluronan	2	Septonex	100

henceforth as 730 kDa (the exact molecular weight was 729 ± 3 kDa).

Carbethopendecinium bromide (septonex, Czech Pharmacopoeia quality) was supplied by GBNchem Company (Czech Republic) and used as a surfactant for hyaluronan. Sodium dodecyl sulfate (SDS, ≥ 99.0%) was purchased from Sigma Aldrich (Czech Republic) and used as a surfactant for dextran.

All solutions were prepared in 0.15 M NaCl solution using purified water (Purelab ELGA system). Salt solution was used because preliminary experiments showed that a non-zero ionic strength on the aqueous medium is important for obtaining gel-like materials [11,28]. Samples were prepared by mixing polyelectrolyte and surfactant stock solutions in a 1:1 vol ratio. The concentrations of initial solutions of polyelectrolytes and surfactants are given in Table 1. Nile red (NR, purchased from Sigma Aldrich) was dissolved in the surfactant solution and then incorporated into the hydrogel during its preparation. The dye was used in ten different initial concentrations listed in Table 2. Hydrogels were equilibrated (24 h) and then separated from the liquid residue by centrifugation at 4000 rpm for 15 min. The final volume ratio of hydrogel to supernatant was dependent on the types and concentrations of used solutions. One set of hydrogels was always left in the original supernatant (formed during the preparation of hydrogel).

Centrifuged hydrogels were weighted and covered by 5 mL of surfactant (with a concentration equal to half of the initial one) or 0.15 M NaCl solution. The time development of concentration of NR in the supernatant was monitored by means of UV/VIS spectrometry (Hitachi U-3300).

Experiments were realized at laboratory temperature (25 ± 1 °C). All experiments were triplicated and average values are presented.

3. Results and discussion

Interactions of biopolymeric electrolytes with oppositely charged surfactants can result in the dissolution hydrophobes in micelle-like nanocontainers formed by surfactants. In this work, the probe (NR) was incorporated into the hydrogel structure during hydrogel preparation. The probe was used in ten different initial concentrations; therefore, one type of hydrogel had ten different modifications with ten different contents of NR. As was expected only a portion of dye particles were incorporated into hydrogels during their preparation, some dye remaining in the surfactant solution. The content of NR in hydrogels based on the same biopolymer was higher for the hydrogels prepared using less concentrated surfactant (D-I I, H-I I, L-II). The ratios between the amount of nile red incorporated into the hydrogel and its amount in supernatant after 24 h were: D-I I/D-I = 1.4 ± 0.1 (μmol/μmol), H-I I/H-I = 2.0 ± 0.2 (μmol/μmol), and L-II/L-I = 2.2 ± 0.2 (μmol/μmol). The differences in hydrogels based on chemically identical raw materials were probably connected with the use of different ratios between surfactant ions and functional groups in biopolymers. Theoretical ratios of charges between surfactant (SDS, septonex) and biopolymer (cationized dextran, hyaluronan) are ˜4 for D-I, H-I, L-I; ˜2 for H-I I and L-II; and ˜1 for D-I I. Hydrogels based on hyaluronan with a ratio of charges equal to 1 were not prepared because of our previous experimental experience [11,27,30] and the cloudiness of studied solutions. Ratios were regulated by means of the concentrations of the used supernatants. If the ratio of charges is around 1, we can assume that the majority of surfactant is consumed for the cross-linking of the hydrogel and that its content in pores is low. In contrast, in the case of higher charge ratios, only a proportion of the surfactant can be exhausted for the formation of hydrogel networks, and the pore structure in the hydrogel can contain solution with surfactant micelles. Since the contents of the dye in the hydrogels were determined on the basis of the concentration decrease in the supernatant, their values included all possible forms of NR (free, in micelles…) in the hydrogels. The structure of hydrogels is not fully understood but micelles are believed to form the (electrostatic) crosslinks of the hydrogel network and to connect the polymer chains. Nile red can thus be incorporated into the network nodes, into the micelles in pore solution, and probably as free molecules if the capacities of micelles and nodes are saturated. All these forms can participate in the release of dye and its diffusion in hydrogels.

Table 2
Initial concentrations of NR in the solutions of surfactants used to prepare hydrogels.

Index	Concentration of NR (μM)
a	2
b	3
c	4
d	5
e	6
f	7
g	8
h	9
i	10
j	15

The maturation of hydrogels for release experiments was terminated after 24 h but one set of hydrogels was always left in the original supernatant (formed during the preparation of hydrogel) in order to study further ageing of hydrogels and the stability of their dye content.

In Fig. 1, we can see the time development of concentration of NR in supernatants for dextran hydrogels. An interesting phenomenon was observed mainly in the case of the D-I hydrogel. The probe which was not incorporated into the hydrogel during its preparation diffused gradually from the supernatant into the hydrogel and the total content of NR in the hydrogel increased. The transport of NR into the hydrogel can be described in term of the diffusion in the diffusion couple involving the phase boundary between the hydrogel and solution [25]. The time development of the total diffusion flux $m_{s\to h}$ can be expressed as:

$$m_{s\to h} = 2\frac{\kappa c_{0,s} - c_{0,h}}{1 + \kappa\sqrt{D_{ef,h}/D_s}}\sqrt{\frac{D_{ef,h}t}{\pi}} \quad (1)$$

where κ is the ratio between concentrations of the probe in the hydrogel and supernatant ($\kappa = c_h/c_s$); $c_{0,h}$ and $c_{0,s}$ are the initial concentrations of the probe in the hydrogel and supernatant; $D_{ef,h}$ and D_s are the effective diffusion coefficient of the probe in the hydrogel and the diffusion coefficient of the probe in the supernatant; t is time. Eq. (1) assumes that there is no accumulation of the diffusion probe at the interface, i.e. the diffusion flux from the solution to the interface is equal to the diffusion flux from the interface into the hydrogel. In general, the effective diffusion coefficient $D_{ef,h}$ includes the influences of the structure of the hydrogel and the interactions between the diffusion probe and the hydrogel [31–34]. In the case of nonreactive systems, the "structure parameter" of hydrogel is the ratio between its porosity and tortuosity and can be calculated as the ratio between $D_{ef,h}$ and D_s. In this work, a diffusion coefficient of 4.9×10^{-10} m^2/s for NR in aqueous solution [35] was used as the value of D_s. When the experimental data obtained for hydrogel D-I were fitted by means of Eq. (1), the effective diffusion coefficient could be determined from the

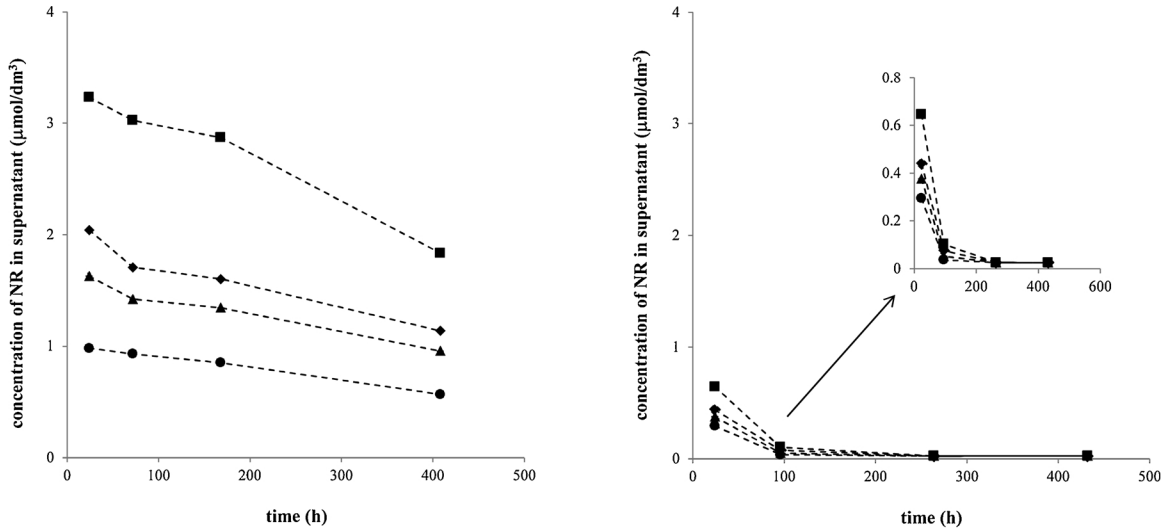


Fig. 1. Examples of time developments of concentrations of NR in supernatants for the D-I (left) and D-I I (right) hydrogels (dashed lines are guides for the eyes). Hydrogels were prepared using surfactants with different initial concentrations of NR: 5 μM (circles), 7 μM (triangles), 9 μM (diamonds), and 15 μM (squares).

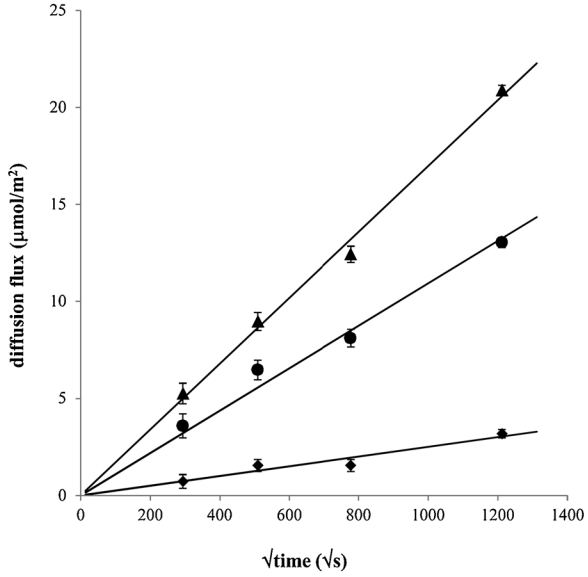


Fig. 2. Examples of data fitting (Eq. (1)) for the D-I hydrogels prepared using surfactants with different initial concentrations of NR: 2 μM (diamonds), 4 μM (circles), and 8 μM (triangles).

values of the slopes of the lines (see examples in Fig. 2). The value of $D_{ef,h}$ determined in this way was (1.33 ± 0.03) × 10^{-12} m^2/s and seemed to be independent of the content of NR in the studied systems (in the used concentration range). This effective diffusion coefficient is relatively low and includes the influence of the structure of the hydrogel and the possible formation of micelles of NR in SDS. Since micelles are bigger in comparison with free NR molecules, their diffusion coefficient is lower. Using fluorescence spectroscopy, Maiti et al. [36] determined the diffusion coefficient of NR in SDS micelles to be 1.77 × 10^{-10} m^2/s; Krishna et al. [37] then calculated a value (1.3 ± 0.1) × 10^{-10} m^2/s on the basis of their Monte Carlo simulations. In contrast, Zhang et al. [38] determined the diffusion coefficient of NR in 20% glycerol water solution to be 3.32 × 10^{-11} m^2/s, which is much lower than above mentioned values. The diffusion coefficient of SDS micelles in water was determined by Zhang et al. [39] to be (9.2 ± 0.2) × 10^{-11} m^2/s. As we can see, several different diffusion coefficients have been published. Our result, (1.33 ± 0.03) × 10^{-12} m^2/s, is valid for hydrogel containing NR incorporated directly into its structure during preparation as well as some smaller amount transported subsequently into the hydrogel from the supernatant. It is lower than the diffusion coefficient of NR in water and also the diffusion coefficients of SDS micelles and NR in SDS. The reason for this can be the relatively compact structure of the hydrogel. Considering that the concentration of SDS is higher than its CMC, e.g. 7.8 mM published by Dutkiewicz and Jakubowska [40], 8.2 mM mentioned by Zhang et al. [39] and 8.4 mM determined by Fischer and Jandera [41], and that the charge ratio between SDS and dextran is around 4, we can assume that NR diffused into the hydrogel in the form of micelles. Similarly, the concentration of NR decreased in the supernatant above hydrogel D-I -I but the changes were much smaller in comparison with hydrogel D-I -. Therefore, no diffusion coefficient for the transport of NR from supernatant into hydrogel D-I -I was determined.

The behavior of hydrogels based on hyaluronan was different. In Fig. 3, the data obtained for the H-I and L-I hydrogels are compared. Both hydrogels were prepared with the ratio of charges between septonex and hyaluronan to be ˜4. As can be seen, the concentration of NR in the supernatant decreased during the first three days, mainly in the case of hydrogels based on HMW hyaluronan and containing higher contents of NR. No changes in NR concentration in supernatant were observed in the case of low content of NR in hydrogels. In contrast, some release of NR from hydrogel based on LMW hyaluronan was found when the hydrogel had a low content of NR. If the ratio of charges between septonex and hyaluronan was ˜2, the release of NR from hydrogels into supernatant was observed for both molecular weights of hyaluronan and for all used NR contents within hydrogels (see Fig. 4). The rate of release was higher for the hydrogel based on LMW hyaluronan. Since the probe (NR) diffused from hydrogel L-II into the supernatant over the course of the whole experiment, the diffusion coefficient could be determined. The mathematical equation for the calculation of $D_{ef,h}$ was modified for the direction from hydrogel to supernatant:

$$m_{h\rightarrow s} = 2\frac{\varepsilon c_{0,h} - c_{0,s}}{1 + \varepsilon\sqrt{D_s/D_{ef,h}}}\sqrt{\frac{D_s t}{\pi}} \quad (2)$$

where $m_{h\rightarrow s}$ is the total diffusion flux at time t and ε is the ratio between concentrations of the probe in the supernatant and hydrogel, i.e. $\varepsilon = 1/\kappa = c_s/c_h$. The value of $D_{ef,h}$ determined by means of Eq. (2) was equal to (3.33 ± 0.02) × 10^{-11} m^2/s. This value is much higher than $D_{ef,h}$ value determined for the diffusion of NR from the supernatant into the D-I -I hydrogel. Nevertheless, both results correspond with diffusion coefficients determined for similar hydrogel systems (e.g. [15,19,42]).

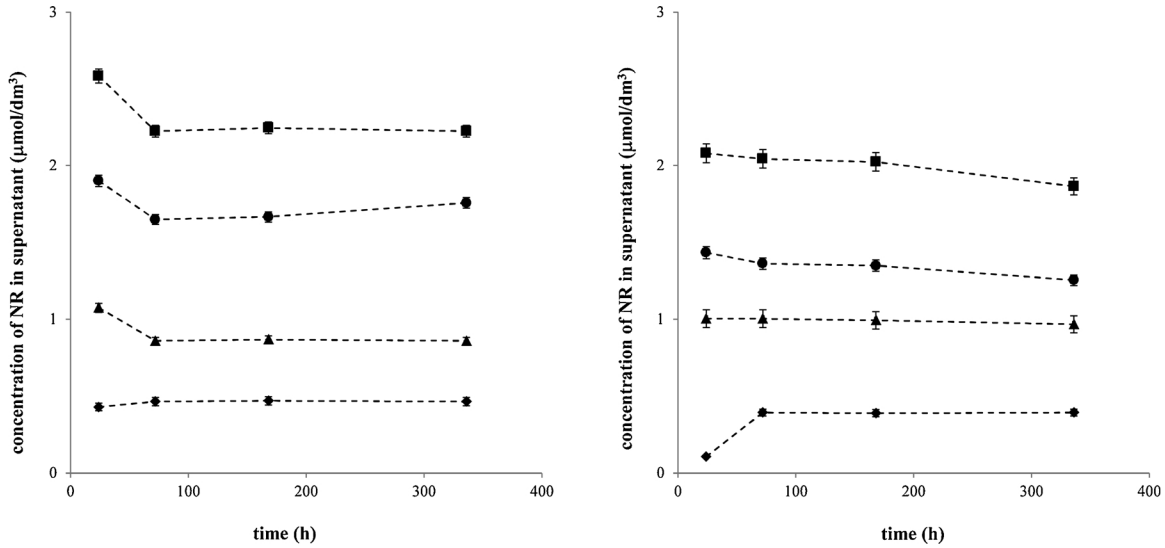


Fig. 3. Examples of time developments of concentrations of NR in supernatants for the H-I (left) and L-I (right) hydrogels (dashed lines are guides for the eyes). Hydrogels were prepared using surfactants with different initial concentrations of NR: 2 μM (diamonds), 7 μM (triangles), 10 μM (circles), and 15 μM (squares).

The release experiments were realized using hydrogels equilibrated for 24 h. Original solutions were replaced by fresh surfactants or physiological solutions, and the concentrations of NR in the solutions were monitored over time. Examples of data for the D-I and D-I I hydrogels and the release of NR into SDS are shown in Fig. 5. We can see that NR gradually diffused from hydrogel into surfactant solution and that its concentration in SDS increased. Similar results were obtained for all studied hydrogels and for the release of NR into surfactant as well as NaCl solution. Experimental data were fitted by means of Eq. (2). The initial concentration of NR in solutions (surfactant or NaCl) was equal to zero ($c_{0,s} = 0$). The calculated values of diffusion coefficients are listed in Table 3. A diffusion coefficient of 4.9×10^{-10} m^2/s for NR in aqueous solution [35] was used as the value of D_s. As can be seen, the values of $D_{ef,h}$ obtained for NR release into different solutions are practically the same. Therefore, we can say that the influence of a liquid medium on the diffusion of NR in hydrogels was negligible. At first sight, it is relatively surprising that effective diffusion coefficients determined for hydrogels with a potentially less cross-linked structure are lower than the values obtained for hydrogels based on more concentrated surfactants. Our primary assumption was that the use of a more concentrated surfactant solution means the preparation of hydrogel with a more cross-linked structure. It means that the efficiency of cross-linking increases with the increase in the surfactant concentration. The rheological characterization of hydrogels based on hyaluronan and septonex [11] showed that the characteristic relaxation time increased with the molecular weight of hyaluronan at constant initial composition. The modulus increased with molecular weight for systems with 50 mM surfactant and decreased for the other studied systems. No correlation was found between the rheological properties of hydrogels and the charge ratio between surfactant and biopolymer. Hoffmann et al. [43,44] studied the self-aggregation of the cationic, cellulose based polycation JR 400 and the anionic surfactants (SDS, SDBS and SDES). They observed an increase in the viscosity while an excess of polyelectrolyte was in semi-dilute solutions. It was attributed to the formation of cross-links between polyelectrolyte chains. In contrast, an excess of surfactant charges caused the decrease in viscosity. It was found that the polyelectrolyte formed relatively large and densely packed clusters near the phase boundary on the surfactant rich side, thereby occupying less space and reducing the viscosity. They confirmed the presence of aggregates with the size similar to pure

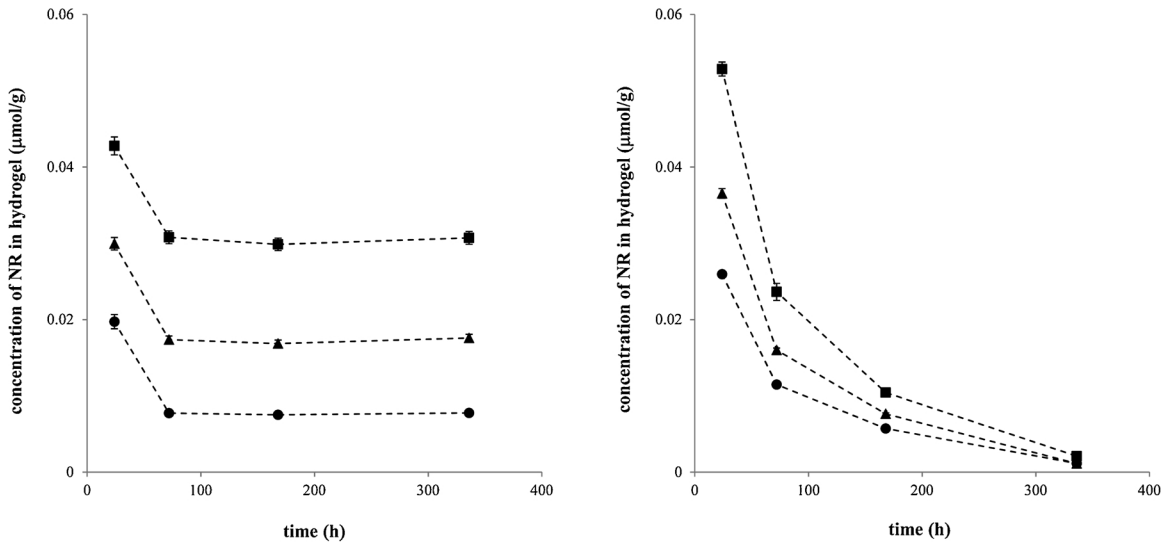


Fig. 4. Examples of time developments of NR contents in the H-I I (left) and L-II (right) hydrogels (dashed lines are guides for the eyes). Hydrogels were prepared using surfactants with different initial concentrations of NR: 6 μM (circles), 8 μM (triangles), and 15 μM (squares).

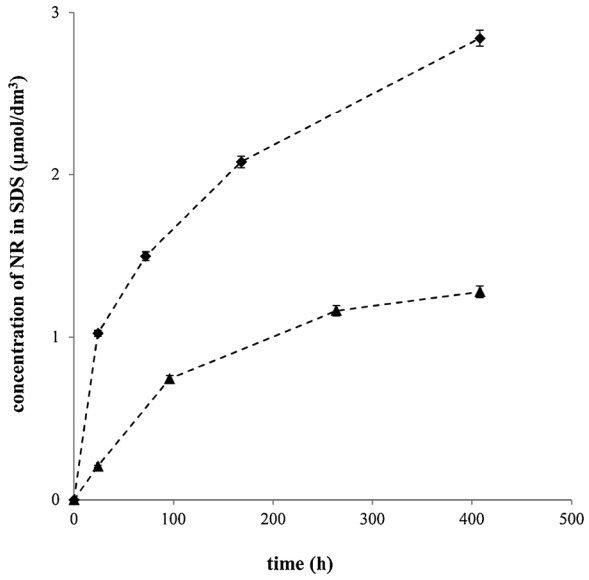


Fig. 5. Examples of time developments of concentrations of NR in SDS for the D-I (diamonds) and D-I I (triangles) hydrogels (dashed lines are guides for the eyes).

Table 3
Values of effective diffusion coefficient ($D_{ef,h}$) of NR in hydrogels.

Hydrogel	$D_{ef,h}$ (m^2/s) – release into surfactant	$D_{ef,h}$ (m^2/s) – release into NaCl solution
D-I	$(6.95 \pm 0.29) \times 10^{-11}$	$(6.95 \pm 0.26) \times 10^{-11}$
D-II	$(1.21 \pm 0.06) \times 10^{-11}$	$(1.26 \pm 0.02) \times 10^{-11}$
H-I	$(4.72 \pm 0.28) \times 10^{-11}$	$(4.57 \pm 0.21) \times 10^{-11}$
H-II	$(1.35 \pm 0.08) \times 10^{-11}$	$(1.18 \pm 0.07) \times 10^{-11}$
L-I	$(6.38 \pm 0.36) \times 10^{-11}$	$(6.97 \pm 0.26) \times 10^{-11}$
L-II	$(3.29 \pm 0.17) \times 10^{-11}$	$(3.39 \pm 0.12) \times 10^{-11}$

surfactant micelles, presumably arranged in the frequently observed "pearl necklace structure".

These findings [43,44] were obtained for the systems with an excess of anionic surfactants. Systems based on cationic polyelectrolyte (cationized diethylaminoethyl dextran) and anionic surfactant (SDS) as well as anionic polyelectroyte (hyaluronan) and cationic surfactant (septonex) are investigated in this our study. A similar trend, i.e. an decrease in the diffusion coefficient of NR in hydrogels prepared using a more concentrated surctant (Table 3). Our hypothesis is that the degree of cross-linking is similar for different concentrations of surfactants for a given biopolymer. It means that charges are compensated by means of cross-linking which corresponds with the theoretical ratio of charges between surfactant and biopolymer equal to 1. Therefore, a proportion of the surfactant can be exhausted for the formation of hydrogel networks. If the ratio of charges between the used surfactant and biopolymer is ˜1 (e.g. hydrogel D-I I in this study), the surfactant is exhausted and NR can be present in the hydrogel structure in the form of free molecules. If the ratio of charges is higher than 1 (other hydrogels), the surfactant can form micelles and NR can be incorporated into these "nano-containers". The formation of micelles is conditioned by the exceeding of the critical micellar concentration, which is around ˜8 mM for SDS [39,40,45] and ˜0.8 mM for septonex [30,41,45,46]. In some cases, polyelectrolytes combined with surfactants can form the so-called "pearl necklace structure" [43,48–51]. This structure is formed mainly in polyelectrolytes with higher molecular weights and longer chains, and free micelles or aggregates are preferred for their low molecular weights [13,16]. Our results in Table 3 show that the lowest effective diffusion coefficient was obtained for the D-I I hydrogel with a theoretical ratio of charges equal to ˜1. This should mean that mainly free molecules of NR can be present in the hydrogel structure and that their mobility should be the highest, which is in contrast to the value of $D_{ef,h}$. The decrease in the diffusivity of NR with the decrease in the ratio of charges was observed for all studied hydrogels. The highest diffusivity was determined for the D-I hydrogel with a ratio of charges equal to ˜4 and so (theoretically) with NR incorporated in micelles. These results do not make sense at first sight. The key for a deciphering the puzzle probably lies in the form of NR incorporation into hydrogel structures and the role of the micellization of the used surfactants. Kurniasih et al. [52] studied the behavior of NR in aqueous surfactant and micellar solutions. They found that the increase in NR concentration caused the aggregation of surfactant micelles and an increase in NR content in the aggregates. This could mean that the aggregation of micelles can cause the decrease in NR mobility due to the bigger NR particles (NR incorporated into the aggregates). This mechanism is not probable in our case because the NR concentrations were much lower and no concentration dependence in NR diffusivity was observed. If we compare molecular weights of the used hyaluronan with the obtained effective diffusion coefficients, we can see that NR is more mobile in hydrogel based on LMW hyaluronan. This agrees with the hypothesis of free micelles in systems with shorter polyelectrolyte chains [13,16,17]. The decrease in $D_{ef,h}$ for lower charge ratios (and the lower concentration of septonex) can mean that the content of free micelles is also lower in this case and a bigger portion of NR is incorporated in a „pearl necklace structure" with limited mobility. The molecular weight of the used dextran was between LMW and HMW hyaluronan, therefore it was probably able to form the "pearl necklace structure" but this ability is not too high). The diffusivity of NR in the D-I hydrogel was similar to that in the L-I hydrogel and value obtained for the D-I I hydrogel was close to the H-I I hydrogel. This means that the mobility on NR can be comparable with the results obtained for LMW and HMW hyaluronan depending on the ratio of charges between surfactant and biopolymer. The type of surfactant used plays a role here. SDS surfactant combined with dextran has a CMC ˜8 mM [39–41,45] and an aggregation number usually between 50 and 70 in dependence on temperature and ionic strength [40,45,53]. In contrast, the CMC determined for septonex surfactant is approximately ten times lower [30,41,46,47] and results obtained by means of conductometry and potentiometry [54] show on small micelles with much lower aggregation numbers < 10. In the case of an excess concentration of SDS surfactant (D-I hydrogel), the dye can be partially incorporated in micelles immobilized on polyelectrolyte chains. Other dye in free micelles can easily be released from hydrogel similarly to NR diffused from the L-I hydrogel. If the ratio charges between dextran and SDS is around 1 (D-I I hydrogel), more micelles are incorporated in the "pearl necklace structure" and the diffusivity rapidly decreases. The value of $D_{ef,h}$ is also influenced by the size of micelles, which should be much greater for SDS (in comparison with septonex surfactant).

The studied hydrogels with incorporated dye can be also characterized by means of so-called structural parameter μ, which is the ratio between their porosity and tortuosity [33,34,55]. Its value can be calculated as the ratio between $D_{ef,h}$ and D_s. If a diffusion coefficient of 4.9×10^{-10} m^2/s [35] is used for NR in aqueous solution, we obtain a value of μ equal to 0.14 for the D-I and L-I hydrogels, 0.09 for the H-I hydrogel, 0.07 for the L-II hydrogel, and 0.03 for the D-I I and H-I I hydrogels. The values of μ therefore represent the retardation of NR mobility in the given type of hydrogel.

4. Conclusions

The release of NR as a model dye from hydrogels based on a combination of polyelectrolyte and opposite charged surfactant is influenced by several factors. The dye present in micelle-like nano-containers can be incorporated into a "pearl necklace structure" or in the form of more mobile free micelles or micelle aggregates. It was found that the diffusivity of NR increases with the increasing molecular

weight of polyelectrolyte and the increasing charge ratio between the surfactant and biopolymer. The results showed on the migration of NR incorporated into free micelles, whose contents were higher for more concentrated surfactants. The diffusivity was also influenced by the type of surfactant. A positive correlation between the size of micelles and the retardation of their mobility in hydrogels was found. The release of NR from hydrogels can thus be characterized by the effective diffusion coefficients of NR and the structural parameters of hydrogels.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation, project No. 16-12477S and by the project LO1211 from National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic).

References

[1] D.C. Tuncaboylu, A. Argun, M.P. Algi, O. Okay, Autonomic self-healing in covalently crosslinked hydrogels containing hydrophobic domains, Polymer 54 (2013) 6381–6388.
[2] J. Hurler, O.A. Berg, M. Skar, A.H. Conradi, P.J. Johnsen, N. Skalko-Basnet, Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin, J. Pharm. Sci. 101 (2012) 3906–3915.
[3] C. Ju, J. Sun, P. Zi, X. Jin, C. Zhang, Thermosensitive micelles-hydrogel hybrid system based on Poloxamer 407 for localized delivery of Paclitaxel, J. Pharm. Sci. 102 (2013) 2707–2717.
[4] C. Lu, R.B. Yoganathan, M. Kociolek, C. Allen, Hydrogel containing silica shell cross-linked micelles for ocular drug delivery, J. Pharm. Sci. 102 (2013) (2013) 627–637.
[5] M. Pekař, Hydrogels with micellar hydrophobic (nano)domains, Front. Mater. 1 (35) (2015) 1–14.
[6] C.T. Huynh, M.K. Nguyen, D.S. Lee, Injectable block copolymer hydrogels: achievements and future challenges for biomedical applications, Macromolecules 44 (2011) 6629–6636.
[7] W. Shi, Y. Ji, X. Zhang, S. Shu, Z. Wu, Characterization of pH- and thermosensitive hydrogel as a vehicle for controlled protein delivery, J. Pharm. Sci. 100 (2011) 886–895.
[8] J.K. Oh, R. Drumright, D.J. Siegwart, K. Matyjaszewski, The development of microgels/nanogels for drug delivery applications, Prog. Polym. Sci. 33 (2008) 448–477.
[9] L. Picullel, Understanding and exploiting the phase behavior of mixtures of oppositely charged polymers and surfactants in water, Langmuir 29 (2013) 10313–10329.
[10] D. Li, N.J. Wagner, Universal binding behavior for ionic alkyl surfactants with oppositely charged polyelectrolytes, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 17547–17555.
[11] T. Venerová, M. Pekař, Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants, Carbohydr. Polym. 170 (2017) 176–181.
[12] M.S. Lindblad, J. Sjoeberg, A.C. Albertsson, J. Hartmann, Hydrogels from polysaccharides for biomedical applications, ACS Sym. Ser. 954 (2007) (2007) 153–167.
[13] K. Thalberg, B. Lindman, Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, J. Phys. Chem. 93 (1989) (1989) 1478–1483.
[14] T.C. Wong, K. Thalberg, B. Lindman, H. Gracz, Surfactant ^{13}C relaxation and differential line broadening in a system of a polyanion and a cationic surfactant, J. Phys. Chem. 95 (1991) (1991) 8850–8857.
[15] K. Thalberg, B. Lindman, Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant, Langmuir 7 (1991) 277–283.
[16] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight, J. Phys. Chem. 95 (1991) 3370–3376.
[17] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt, J. Phys. Chem. 95 (1991) 6004–6011.
[18] J. Dong, L. Chen, Y. Ding, W. Han, Swelling and mechanical properties of a temperature-sensitive dextran hydrogel and its bioseparation applications, Macromol. Chem. Phys. 206 (2005) 1973–1980.
[19] J. Liu, L. Li, SDS-aided immobilization and controlled release of camptothecin from agarose hydrogel, Eur. J. Pharm. Sci. 25 (2005) 237–244.
[20] G. Bai, V. Castro, M. Nichifor, M. Bastos, Calorimetric study of the interactions between surfactants and dextran modified with deoxycholic acid, J. Therm. Anal. 100 (2010) 413–422.
[21] C. Demirbilek, C.O. Dinç, Diethylaminoethyl dextran/epichlorohydrin (DEAE-D/ECH) hydrogel as adsorbent for murexide, Desalin. Water Treat. 57 (2015) 1–10.
[22] A.O. Abioye, A. Kola-Mustapha, Formulation studies on ibuprofen sodium–cationic dextran conjugate: effect on tableting and dissolution characteristics of ibuprofen, Drug Dev. Ind. Pharm. 42 (2016) 39–59.
[23] M. Klučáková, M. Pekař, Study of structure and properties of humic and fulvic acids. IV. Study of interactions of Cu^{2+} ions with humic gels and final comparison, J. Polym. Mater. 20 (2003) 155–162.
[24] M. Klučáková, M. Pekař, Study of diffusion of metal cations in humic gels, in: E.A. Ghabbour, G. Davies (Eds.), Humic Substances: Nature`s Most Versatile Materials, Taylor & Francis, New York, 2004, pp. 263–273.
[25] M. Klučáková, Pekař, Transport of copper(II) ions in humic gel – new results from diffusion couple, Colloid. Surf. A 349 (2009) 96–101.
[26] T. Halasová, J. Krouská, F. Mravec, M. Pekař, Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques, Colloid. Surf. A 391 (2011) 25–31.
[27] A. Kargerová, M. Pekař, High-resolution ultrasonic spectroscopy study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants, Langmuir 30 (2014) 11866–11872.
[28] J. Krouská, M. Pekař, M. Klučáková, B. Šarac, M. Bešter-Rogač, Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry, Carbohydr. Polym. 157 (2017) 1837–1843.
[29] T. Pilgrová, T. Venerová, F. Mravec, M. Pekař, Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water, Int. J. Biol. Macromol. 112 (2018) 241–249.
[30] A. Kargerová, M. Pekař, Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex – a pharmaceutical cationic surfact, Carbohydr. Polym. 204 (2019) 17–23.
[31] J. Crank, The Mathematics of Diffusion, second ed., Clarendon Press, Oxford, 1975.
[32] E.L. Cussler, Diffusion. Mass Transfer in Fluid Systems, second ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
[33] P. Sedláček, J. Smilek, M. Klučáková, How interactions with polyelectrolytes affect mobility of low molecular ions - results from diffusion cells, React. Funct. Polym. 73 (2013) 1500–1509.
[34] P. Sedláček, J. Smilek, M. Klučáková, How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels - 2. Non-stationary diffusion experiments, React. Funct. Polym. 75 (2014) 41–50.
[35] S.A. Chowdhury, M. Lim, Specific binding of Nile red to apomyoglobin, J. Kor. Chem. Soc. 55 (2011) 746–749.
[36] N.C. Maiti, M.M.G. Krishna, P.J. Britto, N. Periasamy, Fluorescence dynamics of dye probes in micelles, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 11051–11060.
[37] M.M.G. Krishna, R. Das, N. Periasamy, Translational diffusion of fluorescent probes on a sphere: monte Carlo simulations, theory, and fluorescence anisotropy experiment, J. Chem. Phys. 112 (2000) 8502–8514.
[38] L.X. Zhang, X.H. Cao, W.P. Cai, Y.Q. Li, Observations of the effect of confined space on fluorescence and diffusion properties of molecules in single conical nanopore channels, J. Fluoresc. 21 (2011) 1865–1870.
[39] X. Zhang, A. Poniewierski, A. Jelinska, A. Zagozdzon, A. Wisniewska, S. Hou, R. Holyst, Determination of equilibrium and rate constants for complex formation by fluorescence correlation spectroscopy supplemented by dynamic light scattering and Taylor dispersion analysis, Soft Matter 12 (2016) 8186–8194.
[40] E. Dutkiewicz, A. Jakubowska, Effect of electrolytes on the physicochemical behaviour of sodium dodecyl sulphate micelles, Colloid Polym. Sci. 280 (2002) 1009–1014.
[41] J. Fischer, P. Jandera, Chromatographic behaviour in reversed-phase high-performance liquid chromatography with micellar and submicellar mobile phases effects of the organic modifier, J. Chromatogr. B 681 (1996) 3–19.
[42] X. Zhang, J. Hansing, R.R. Netz, J.E. DeRouchey, Particle transport through hydrogels is charge asymmetric, Biophys. J. 108 (2015) 530–539.
[43] I. Hoffmann, P. Heunemann, S. Prevost, R. Schweins, N.J. Wagner, M. Gradzielski, Self-aggregation of mixtures of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants studied by rheology, dynamic light scattering and small-angle neutron scattering, Langmuir 27 (2011) 4386–4396.
[44] I. Hoffmann, M. Simon, B. Farago, R. Schweins, P. Falus, O. Holderer, M. Gradzielski, Structure and dynamics of polyelectrolyte surfactant mixtures under conditions of surfactant excess, J. Chem. Phys. 145 (2016) 124901.
[45] S.S. Shah, N.U. Jamroz, Q.M. Sharif, Micellization parameters and electrostatic interactions in micellar solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) at different temperatures, Colloid Surf. A 178 (2001) 199–206.
[46] J. Oremusová, O. Greksáková, Micellization parameters of cationic surfactants consisting of the [1-(ethoxycarbonyl)-pentadecyl]-trimethylammonium ion and various anions, Tens. Surfact. Deterg. 4 (2003) 35–39.
[47] M. Vojteková, F. Kopecký, O. Greksáková, J. Oremusová, Effect of addition of KX type electrolytes and temperature on the critical micellar concentrations of 1-cetylpyridinium and carbethopendecinium bromides, Collect. Czec. Chem. Commun. 59 (1994) 99–105.
[48] H.D. Burrows, A.J.M. Valente, T. Costa, B. Stewart, M.J. Tapia, U. Scherf, What conjugated polyelectrolytes tell us about aggregation in polyelectrolyte/surfactant systems, J. Mol. Liq. 210 (2015) 82–99.
[49] M.K. Cowman, C. Spagnoli, D. Kudasheva, M. Li, A. Dyal, S. Kanai, E.A. Balazs, Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy, Biophys. J. 88 (2005) 590–602.
[50] M. Goswami, J.M. Borreguero, P.A. Pincus, B.G. Sumpter, Surfactant-mediated polyelectrolyte self-assembly in a polyelectrolyte-surfactant complex, Macromolecules 48 (2015) 9050–9059.
[51] O.D. Iakobson, A.V. Dobrodumov, N.N. Saprykina, N.N. Shevchenko, Dextran nanoparticles cross-linked in aqueous and aqueous/alcoholic media, Macromol. Chem. Phys. 218 (2017) 1600523.
[52] I.N. Kurniasih, H. Liang, P.C. Mohr, G. Khot, J.P. Rabe, A. Mohr, Nile red dye in aqueous surfactant and micellar solution, Langmuir 31 (2015) 2639–2648.
[53] R.G. Alargova, I.I. Kochijashky, M.L. Sierra, R. Zana, Micelle aggregation numbers of surfactants in aqueous solutions: a comparison between the results from steady-state and time-resolved fluorescence quenching, Langmuir 14 (1998) 5412–5418.
[54] F. Kopecký, M. Vojteková, J. Oremusová, O. Greksáková, Micellization of [1-(ethoxycarbonyl)pentadecyl trimethylammonium bromide studied by conductometry and potentiometry, Chem. Pap. 47 (1993) 55–59.
[55] J. Smilek, P. Sedláček, M. Kalina, M. Klučáková, On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds, Chemosphere 138 (2015) 503–510.