



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE TENZIDŮ SE SMĚSÍ HYALURONANŮ O RŮZNÉ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI

INTERACTION BETWEEN SURFACTANTS AND HYALURONAN WITH DIFFERENT MOLECULAR WEIGHT.

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. KAMILA VAŠÍČKOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0629/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Kamila Vašíčková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Interakce tenzidů se směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše na téma číinterakce tenzidů s polyelektrolyty.
- 2) Návrh experimentů zaměřených na studium interakcí v roztocích hyaluronan-tenzid.
- 3) Provedení experimentů.
- 4) Zhodnocení využitelnosti těchto komplexů z hlediska formulace nových nosičových systémů pro kosmetiku a farmacii.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Kamila Vašíčková
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bylo zkoumáno chování systému směsi hyaluronanů o dvou různých molekulových hmotnostech s tenzidy. Směsi hyaluronanů byly 17 kDa s 1,46 MDa, 73 kDa s 1,46 MDa, 300 kDa s 1,46 MDa, 806 kDa s 1,46 MDa a 1800 kDa s 1,46 MDa. Tyto směsi byly vždy namíchány v hmotnostních poměrech 70:30, 50:50 a 30:70. Jako tenzid byl použit cetyltrimethylamonium bromid a TWEEN 20. Interakce byly zkoumány ve vodném roztoku s různou iontovou silou. Jako barvivo byla použita Súdánová červeň. Ve všech experimentálních řadách s cetyltrimethylamonium bromidem byl zaznamenán fenomén vzniku nekontinuální separované fáze, popsán jako perličky. Vzorky obsahující perličky byly podrobeny zkouškám stability, byly vysušeny a zpětně rehydratovány, dále byly také zahřívány. Následně byla změřena velikost částic ve zbývajícím vzorku po odfiltrování perliček. Směsi hyaluronanů byly charakterizovány měřením viskozity metodou reologie a mikrereologie. Bylo zjištěno, že tyto směsi jsou heterogenní a v každém místě vzorku není stejná viskozita.

ABSTRACT

The behavior of the system consisted by mixture of two different molecular weight hyaluronates and surfactant was investigated. Mixtures were 17 kDa hyaluronate with 1,46 MDa, 73 kDa with 1,46 MDa, 300 kDa with 1,46 MDa, 806 kDa with 1,46 MDa and 1800 kDa with 1,46 MDa. These compounds were always mixed in the weight ratios 70:30, 50:50 and 30:70. As the surfactant cetrimonium bromide and TWEEN 20 were used. Interactions were studied in aqueous solution with different ionic strength. Sudan red was used as hydrophobic dye. In all experimental series with cetrimonium bromide was observed phenomenon of discontinuous separated phases, described as pearls. Samples containing pearls were tested on stability, were dried and rehydrated back, as were also heated. Subsequently, the particle size was measured in the remaining sample after pearls were filtrated. Mixtures of hyaluronate were characterized by measuring the viscosity using rheology microrheology. It was found that these compounds are heterogeneous and each sample point is not the same viscosity.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, směs, nízkomolekulární, vysokomolekulární, směs dlouhých a krátkých řetězců, tenzidy, interakce, reologie, mikrereologie, DLS

KEYWORDS

hyaluronan, mixture, low molecular weight, high molecular weight, mixture of long and short chains, surfactants, interactions, rheology, microrheology, DLS

VAŠÍČKOVÁ, K. *Interakce tenzidů se směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 61 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Kamila Vašíčková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Miloslavu Pekařovi CSc. za odborné vedení a zaštitění mé práce. Velmi děkuji také Ing. Filipu Mravcovi, PhD. a Ing. Tereze Halasové, za názory, připomínky, pomoc a podporu. Mé díky patří i Bc. Martinu Trojanovi a Bc. Zuzaně Hnyluchové, kteří mě zasvětili do tajů reologie a mikrореologie. Děkuji zároveň i Centru materiálového výzkumu, projektu OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0012, V poslední řadě děkuji svým nejbližším za trpělivost.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2. 1.	Hyaluronan	8
2. 2.	Rozmanitá velikost polymerů hyaluronanu	9
2. 2. 1.	Vysokomolekulární hyaluronan	9
2. 2. 2.	HA fragmenty	10
2. 3.	Struktura hyaluronanu	11
2. 3. 1.	Struktura v roztoku	11
2. 3. 2.	Sekundární a terciální struktura hyaluronanu v roztoku	11
2. 3. 3.	Hydrofobní oblasti v hyaluronanu	12
2. 3. 4.	Hyaluronanové sítě	13
2. 2.	Amfifilní molekuly	14
2. 2. 1.	Povrchově aktivní látky versus surfaktanty	15
2. 2. 2.	Klasifikace surfaktantů	15
2. 2. 2. 1.	Aniontové surfaktanty	15
2. 2. 2. 2.	Neionogenní surfaktanty	15
2. 2. 2. 3.	Kationové surfaktanty	16
2. 2. 2. 4.	Zwitteriontové surfaktanty	17
2. 2. 2. 5.	Polymerní surfaktanty	17
2. 2. 3.	Micely	17
2. 2. 4.	Cetytrimethylamonium bromid	17
2. 2. 3.	Výroba a použití surfaktantů	18
2. 3.	Reologie	20
2. 4.	Mikroreologie	20
2. 4. 1.	Částicová mikroreologie	21
2. 3.	Současný stav řešené problematiky	23
3	Materiály a metody	27
3. 1.	Materiály	27
3. 2.	Metody	28
3. 2. 1.	Příprava vzorků	28
3. 2. 1. 1.	Pozorování interakcí směsí HyA s tenzidu	28
3. 2. 1. 2.	Pozorování interakce samotné nízkomolekulární HyA s tenzidem	28
3. 2. 1. 3.	Pozorování interakcí bez vnějšího mechanického zásahu	28
3. 2. 1. 4.	Vysušování, rehydratování a zahřívání vzorků	29

3. 2. 1. 5.	Měření velikosti částic	29
3. 2. 1. 6.	Vliv přípravy na velikost a vzhled částic ve vzorcích	29
3. 2. 1. 7.	Reologická měření	30
3. 2. 1. 8.	Mikroreologická měření	30
3. 2. 2.	Meření a vyhodnocení dat	31
3. 2. 2. 1.	Měření velikosti částic	31
3. 2. 2. 2.	Reologická měření	31
3. 2. 2. 3.	Mikroreologická měření	32
4	Výsledky a diskuze	33
4. 1.	Pozorování interakce samotné nízkomolekulární HyA s tenzidem	33
4. 1.	Pozorování interakcí směsí HyA s tenzidy	33
4. 1. 1.	Vznik perliček	34
4. 1. 1. 1.	Vznik perliček s CTAB	34
4. 1. 1. 2.	Testování tvorby perliček s TWEEN 20	38
4. 3.	Samovolná interakce CTAB se směsí HyA 17 kDa a Hya 1,4 MDa	38
4. 4.	Vysušení a rehydratování vzorků, zahřívání vzorků	39
4. 5.	Vliv přípravy na velikost a vzhled částic ve vzorcích	41
4. 5.	Reologická a mikroreologická měření	42
4. 5. 1.	Reologie směsí	42
4. 5. 2.	Vliv přípravy a iontové síly na reologii směsi	47
4. 6.	Měření velikosti částic	47
5	Závěr	49
6	Seznam použitých zdrojů	51
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	55
7. 1.	Seznam zkratk	55
7. 2.	Seznam symbolů	55
8	Seznam příloh	56
9.	Přílohy	57
9. 1.	Příloha 1	57
9. 2.	Příloha 2	60
9. 3.	Příloha 3	61

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 Karlem Meyerem. Tehdy jistě netušil, jak výjimečnou látku se mu podařilo objevit. V současné době, tedy v roce 2012, se z kyseliny hyaluronové stala farmaceutická, medicínská a kosmetická celebrita. Využívá se k urychlení hojení ran, v oční chirurgii jako náhrada oční rohovky, do roztoků na kontaktní čočky, do tablet na zlepšení pohyblivosti kloubů, do krémů proti vráskám, jako implantát v estetické chirurgii a má ještě nespočet dalších uplatnění. Proč to? Je to totiž látka tělu vlastní, tím pádem tělem přijímaná, netoxická, neimunogenní. Což je bezpochyby nezbytný předpoklad pro všechny tyto aplikace.

Další charakteristikou, která je pro použití kyseliny hyaluronové v těchto aplikacích nezbytně důležitá, jsou její fyzikální a chemické vlastnosti. Z fyzikálních uvedme např. rozpustnost, viskozitu, molekulovou hmotnost, z chemických např. reaktivitu. Především molekulová hmotnost je důležitou charakteristikou této látky, neboť od ní se odvíjí ty ostatní. Zajímavé je, že různé molekulové hmotnosti hyaluronanu mají různé vlastnosti a tyto vlastnosti si nemusí odpovídat, naopak, mohou si vyloženě odporovat. Jednou ze základních myšlenek pro vznik této práce tedy bylo, že pokud bychom zkombinovali různé molekulové hmotnosti v různém poměru, mohli bychom upravit, předpovídat a kontrolovat vlastnosti takto získané směsi hyaluronanů, což by významně pomohlo při výzkumu jejích dalších aplikací.

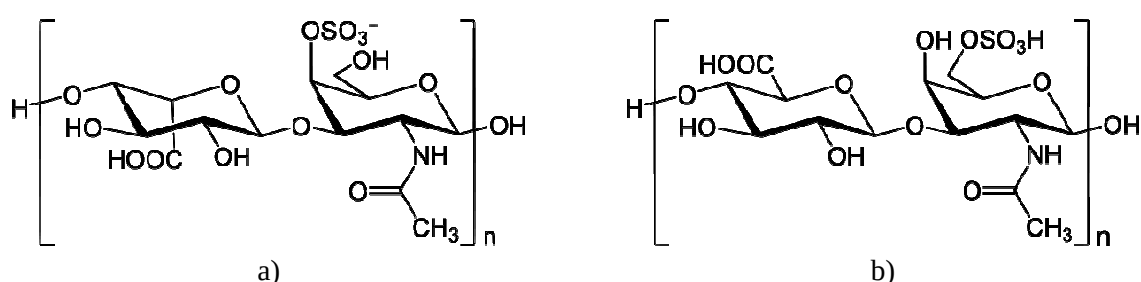
Kyselina hyaluronová se ve velké míře zkoumá jako možný nosič hydrofobních léčiv. Výhoda těchto léčiv spočívá především v lokálním působení v místě potřeby, neovlivňují tedy celý organismus. Protože kyselina hyaluronová je látka vysoce hydrofilní a samotné hydrofobní léčivo by s ní nereagovalo, využívá se k tomuto účelu amfifilní látka, jako např. surfaktant.

Tato práce se zabývá interakcemi tenzidů se směsí hyaluronanů o dvou různých molekulových hmotnostech. Práce je rozdělena do tří podčástí. Nejprve charakterizuje interakce a popisuje, za jakých okolností vzniká v roztocích separovaná nekontinuální fáze, tzv. perličky. Poté zjišťuje, jak je tato fáze stabilní. Nakonec charakterizuje samotné směsi hyaluronanů měřením viskozity pomocí reologie a mikroreologie. Výsledky této práce pomohou charakterizovat interakce v takovémto systému a zhodnotit, zdali je vhodný k použití v lidském organismu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

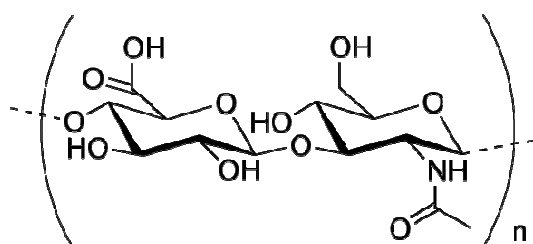
2.1. Hyaluronan

Vysokomolekulární bipolysacharid hyaluronan byl objeven Meyerem a Palmerem v roce 1934 ve sklivci hovězího dobytka [1]. Hyaluronan je označení soli kyseliny hyaluronové (nejčastěji sodné nebo draselné). Řadí se do skupiny podobných polysacharidů, označovaných také jako polysacharidy pojivových tkání, mukopolysacharidy nebo glykosaminoglykany. Do této skupiny patří také chondroitin sulfát, dermatan sulfát, keratin sulfát, heparan sulfát a heparin [2]. Příklady některých z nich jsou vyobrazeny na Obr. 1.



Obr. 1 Dermatan sulfát (a) a chondroitin sulfát (b)

Hyaluronan je lineární, nevětvený polymer. Chemickými a enzymatickými metodami bylo zjištěno, že struktura hyaluronanu je tvořena opakujícími se disacharidovými jednotkami, které sestávají z *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a kyseliny *D*-glukuronové spojených navzájem β 1–4 glykosidickou vazbou. Disacharidové jednotky jsou mezi sebou spojeny β 1–3 glykosidickou vazbou a tvoří různě dlouhý řetězec (Obr. 2).



Obr. 2 Struktura opakující se disacharidové jednotky hyaluronanu

Kromě sklivce se hyaluronan nachází také v mnoha živých substrátech jak např. v extracelulární matrici, kloubní tekutině, pupeční šňůře, kůži a v kohoutích hřebíncích [3], [4], [5], [6]. Izolace, čištění a identifikace téměř čistého hyaluronanu byla zájmem vědeckého výzkumu po mnoho dekad. První průmyslově aplikovaná extrakční metoda pro izolaci a purifikaci hyaluronanu farmaceutické kvality byla vyvinuta Balazsem [7].

Kohoutí hřebínky a pupeční šňůry byly zmrazeny, aby došlo k porušení buněčných membrán, hyaluronan byl extrahován vodou a srážen v organických rozpouštědlech jako ethanol, chloroform nebo cetylpyridinium chlorid. Tímto postupem byl získán hyaluronan, který po vyčištění obsahoval 0,5 % bílkovinných nečistot a celkový výtěžek tohoto hyaluronanu byl 0,9 g hyaluronanu na 1 kg původního materiálu.

Efektivnější metodou získávání hyaluronanu se ukázala být bakteriální produkce pomocí kmenů *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidermicus*. Touto produkcí se dosahuje mnohem větších výtěžků, než může být dosaženo extrakční metodou. Hyaluronan vyprodukovaný bakteriemi kmene *S. equi* má nižší molekulovou hmotnost než hyaluronan vyprodukovaný kmenem *S. zooepidermicus*, který má molekulovou hmotnost zhruba 1,8 až 2 MDa a výtěžnost asi 4 g hyaluronanu na litr kultivačního roztoku. V současnosti je na trhu k dispozici hyaluronan z různých zdrojů, o různé molekulové hmotnosti a čistotě, sloužící k široké škále aplikací. Hlavní nečistoty v hyaluronanu závisí na zdroji a metodě purifikace a jsou to především bakteriální endotoxiny, chondroitin sulfát, nukleové kyseliny, bílkoviny, chlorid [8] sodný a těžké kovy.

2. 2. Rozmanitá velikost polymerů hyaluronanu

Polymery hyaluronanu mohou být různě dlouhé. Každou délku, resp. velikost či molekulovou hmotnost charakterizuje několik vlastností, které si nemusejí odpovídat, naopak, v některých případech jsou vyloženě protichůdné.

Velmi dlouhé polymery jsou extracelulární a mají široké pole různých regulačních a strukturních funkcí. Malé polymerní fragmenty jsou angiogenní, prozánětlivé a imunostimulační. Následující odstavce se zabývají popisem funkce vysokomolekulárního hyaluronanu a jeho nízkomolekulárních fragmentů v biologických systémech. V tabulce (Tabulka 1) jsou popsány objevené vlastnosti hyaluronanu různých velikostí. Tabulka byla převzata z [9].

2. 2. 1. Vysokomolekulární hyaluronan

Takzvaný „very-high-molecular-size“ hyaluronan má obvykle molekulovou hmotnost $4 \cdot 10^2$ – $2 \cdot 10^4$ kDa (závisí na zdroji a fyziologických podmínkách[5]) a patří mezi nejdelší molekuly extracelulární matrix. Rozpuštěním ve vodě, jakožto v hlavním rozpouštědle biologických systémů, ještě nabobtná. Je to také jedna z nejvíce nabitých molekul [9]. V organismu může fungovat jako lubrikant, látka zmírňující otřesy a organizátor extracelulární matrix (ECM). Nachází se např. v kloubní tekutině, pupeční šňůře, rohovce.

Polymer je schopný přijmout obrovské množství vody, 1 000x více, než je jeho objem[10]. Hydratovaný polymer tak „vyplňuje prostor“, hydratuje tkáň, je neprůchozí pro jiné buňky a molekuly a je anti-angiogenní [11]. Je také protizánětlivý a imunosupresivní [12]. Imunosupresivní efekt pochází ze schopnosti vysokomolekulárního hyaluronanu „obalit“ povrch buněk tak, aby se ligandy nedostaly k receptorům na jejich povrchu.

Vysokomolekulární HyA je také zahrnut v celém procesu ovulace, oplodnění a vzniku embrya. Obecně, vysokomolekulární HyA podporuje celistvost tkáně, zatímco produkty jejího rozkladu signalizují, že se vyskytlo zranění. Dokonce, i když už je přítomen zánět, vysokomolekulární HyA jej potlačuje. Neobvyklá forma vysokomolekulárního HyA byla objevena v místech zánětu intracelulárního původu. Vytvoří jakési „kabely“, které vznikají v Golgiho aparátu různých buněk a tyto kabely se propojí do sítě, která váže prozánětlivé buňky a tím je deaktivuje [13]. Takhle zesíťovaný vysokomolekulární hyaluronan zmírňuje zánětlivý proces a poskytuje ochranný štít, aby celistvost tkáně byla zachována.

V experimentálním modelu embryogeneze může mít vysokomolekulární HyA různé účinky. Např. bylo zjištěno potlačení svalové diferenciaci při pěstování buněk na filmu z vysokomolekulární HyA, na rozdíl od plastu [14]. Opačný efekt nastal při chondrogenezi. Vysokomolekulární HyA navázaný na povrch buněčné kultury podpořil chondrogenezi, zatímco na jiných substrátech ne [15].

Tabulka 1 *Funkce hyaluronanu v organismu seřazené podle velikosti molekuly* [9]

Velikost (počet sacharidů)	Funkce
Vysokomolekulární HyA>1000–5000	Potlačení angiogeneze Imunosuprese Inhibice fagocytózy Potlačení HyA syntézy
HyA fragmenty ~1000	Indukce zánětlivých chemokinů Stimulace urokinázy
10–40	Indukce rozštěpení CD44 Podpora migrace nádorových buněk
8–32	Stimulace angiogeneze Stimulace nádorové neovaskularizace
~15	Potlačení proliferace buněk hladkého svalu
12	Diferenciace endotelních buněk
10	Vytlačení HyA matrice z povrchu oocytů Vytlačení proteoglykanů z povrchu buněk
6	Potlačení vzniku HyA sítě v ráně
4–6	Indukce syntézy cytokinů v dendritických buňkách
4	Potlačení apoptosy Potlačení sulface proteoglykanů

2. 2. 2. HA fragmenty

Menší fragmenty polymerů hyaluronanu jsou začleněny do řady patologických i normálních procesů [9]. Jsou nezbytné např. při hojení ran. Prvním krokem při hojení ran je nárůst koncentrace hyaluronanu. Nejprve vysokomolekulárního, který se v ráně akumuluje a váže fibrinogeny, což je vlastně podstata vzniku sraženiny [16]. V první fázi hojení rány vysokomolekulární hyaluronan dále otevírá tkáň a usnadňuje přístup PMN (polymorfonuclear neutrophil) k místu zranění k odstranění mrtvé tkáně a bakterií. Otok, tedy první známka zánětu a léčení poranění, je spojován s HyA. PMN poté z poranění mizí.

Další stupeň léčení je stupeň zánětu. V průběhu tohoto stupně se v poranění hromadí HyA s nižší molekulovou hmotností (200–250 kDa). Funkce těchto oligosacharidů byla poprvé studována in vitro v roce 1993 [17]. Objevují se monocyty a lymfocyty.

Po stupni zánětu následuje (nebo se překrývají) angiogeneze. První zmínky o oligomerech hyaluronanu, které se účastní angiogeneze jsou z roku 1985 [18]. Byly to oligomery v rozsahu 6–20 sacharidových jednotek. Následkem angiogeneze je množení fibroblastů, které jsou zahrnuty v posledním stupni hojení. HyA fragmenty podobné těm, co byly zahrnuty do procesu angiogeneze, také v rozsahu 6–20 sacharidových jednotek stimulují množení fibroblastů a následnou syntézu kolagenu [19].

Hyaluronan se vyskytuje v mnoha zhoubných bujeních. Zatímco vysokomolekulární můžeme najít ve většině „normálních“ biologických procesů, nízkomolekulární hyaluronan nebo oligomery hyaluronanu jsou detekovány při rakovině [20], kde usnadňují pohyblivost a invazi nádorových buněk.

2. 3. Struktura hyaluronanu

Hyaluronan syntázy syntetizují dlouhé, lineární polymery s opakující se disacharidovou jednotkou. Počet opakujících se disacharidů může dosáhnout až 10 000 i více, s molekulovou hmotností přibližně 4 MDa (každý disacharid má molekulovou hmotnost asi 400 Da). Průměrná délka disacharidu je 1 nm, tímpádem hyaluronan s molekulovou hmotností 4 MDa může být dlouhý až 10 μm (natáhnutý), což je průměr lidského erytrocytu.

2. 3. 1. Struktura v roztoku

Výsledná struktura hyaluronanu v roztoku je výsledkem kombinace chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní fázi, zatímco ekvatoriální boční řetězce tvoří spíše hydrofilní, polární fázi, a tvoří tak zakroucenou, stužce podobnou strukturu [21]. Tato primární struktura v roztoku tvoří jakési roztáhnuté, náhodně svinuté klubko, které zabírá velkou doménu roztoku. Molekulová hmotnost hyaluronanu v této doméně je ve skutečnosti velmi malá, asi 0,1 % (hmotnost/objem). To znamená, že domény jednotlivých molekul se v roztoku mohou překrývat, jestliže koncentrace hyaluronanu je vyšší než 1 mg/ml.

Doménová struktura hyaluronanu má za následek, že malé molekuly, jako je voda a elektrolyty mohou volně difundovat přes doménu, zatímco větší molekuly, jako jsou například bílkoviny, přes tuto doménu neprojdou, kvůli hydrodynamické velikosti v roztoku. Čím větší jsou molekuly, tím obtížněji a pomaleji difundují přes síť hyaluronanu v doméně a tím menší je jejich koncentrace v této doméně. Volné řetězce hyaluronanu v roztoku se stále pohybují a vytvářejí tak póry různých velikostí. Statisticky mohou existovat póry všech velikostí, ovšem s různou pravděpodobností. To znamená, že v podstatě každá molekula může difundovat přes doménu hyaluronanu, ovšem různou rychlostí (či stupněm zpomalení), závisející na jejím hydrodynamickém obejmu [22].

2. 3. 2. Sekundární a terciární struktura hyaluronanu v roztoku

Dlouhou dobu byl hyaluronan zkoumán pomocí klasických metod polymerní analýzy (viskozita, rozptyl světla, ultracentrifugace). Podle těchto výzkumů byla struktura řetězců hyaluronanu v roztoku brána jako náhodná. Tyto techniky ale měří vlastnosti celého roztoku, průměrné příspěvky velkého množství molekul, které musí být interpretovány s odkazem na teoretické modely. S těmito modely ale nemusí být výsledky kompatibilní, a pokud jsou, nemusí to dokazovat postuláty těmito modelům náležející.

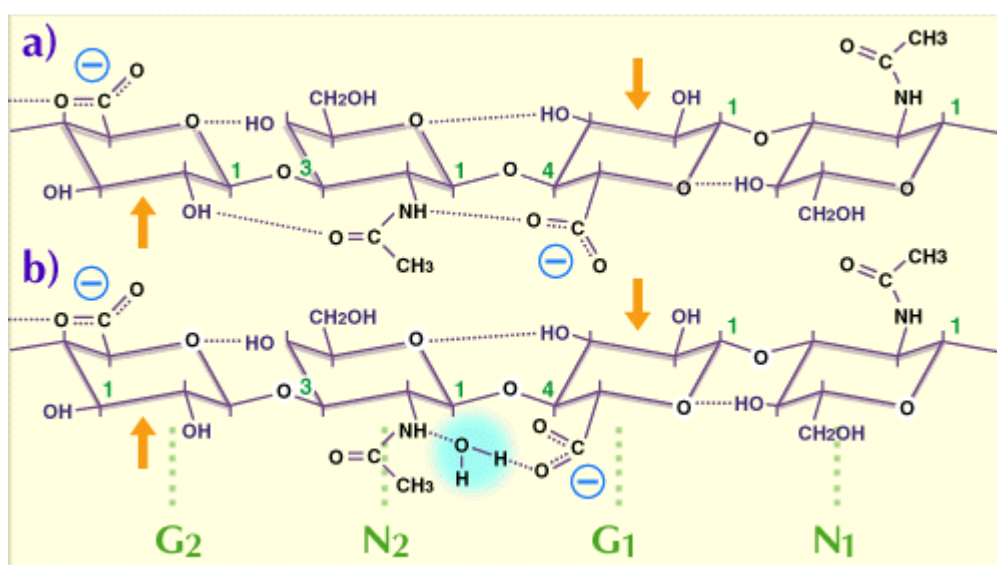
V tomto případě má velký význam molekulární pochopení nějakého biologického jevu, což znamená, že čím je systém náhodnější, tím méně informací obsahuje. Funkčnost biologického materiálu byla dosažena zredukováním náhodnosti (entropie), získáním více informací a dosažením permanentních a reprodukovatelných tvarů. Navíc, pokud spolu nějaké složky systému reagují, velké množství entropie je ztraceno. Tímpádem, interakce v náhodném systému jsou slabší a méně specifické. Z tohoto důvodu se začalo zkoumat, jestli hyaluronan v roztoku nezaujímá nějaké preferované stavy.

Řetězce hyaluronanu obsahují dvě vazby. Vazby tvořící glukózový kruh jsou poměrně pevné a tyto kruhy tak mají stálý tvar. Oproti tomu glykosidická vazba obsahuje kyslík, který je dvěma vazbami připojen na dvě různé sacharidové jednotky. Substituenty připojené ke koncům těchto vazeb mohou rotovat až o 360° . Ačkoliv počítačové a molekulární modelování ukazuje, že sacharidové jednotky nemohou zaujímat všechny možné konfigurace v rozsahu 360° , protože se mohou jedna druhé dostat do cesty, pořád mohou zabírat několik možných konfigurací na každém můstku. Pokud počet možných konfigurací na jednom

můstku vynásobíme počtem můstků molekuly, dostáváme obrovské množství různých konfigurací. Vypadá to tedy náhodně, ale není.

První známka, že hyaluronan preferuje uspořádanou strukturu v roztoku, je to, že nepodléhá iodistanové oxidaci (Obr. 3), zatímco ostatní podobné struktury byly lehce degradovány. Molekulární modely v kombinaci s vláknovým rentgenem o malém rozlišení ukázaly na přítomnost vodíkové vazby v hyaluronanu [21]. NMR potvrdila myšlenku o uspořádanosti hyaluronanu v roztoku (Obr. 3). Bylo zjištěno, že každá disacharidová jednotka je o 180° pootočená vzhledem k předchozí a po dvou otáčkách se dosahuje původní orientace – dvojité šroubovice (two-fold helix) Voda hraje důležitou roli při stabilizaci této struktury [23].

Tato stužce podobná struktura ukazuje mírné zatočení jak v rovinné projekci, tak při stoupání (Obr. 4) což je důležité při vysvětlení proč molekuly hyaluronanu tvoří duplexy samy se sebou.



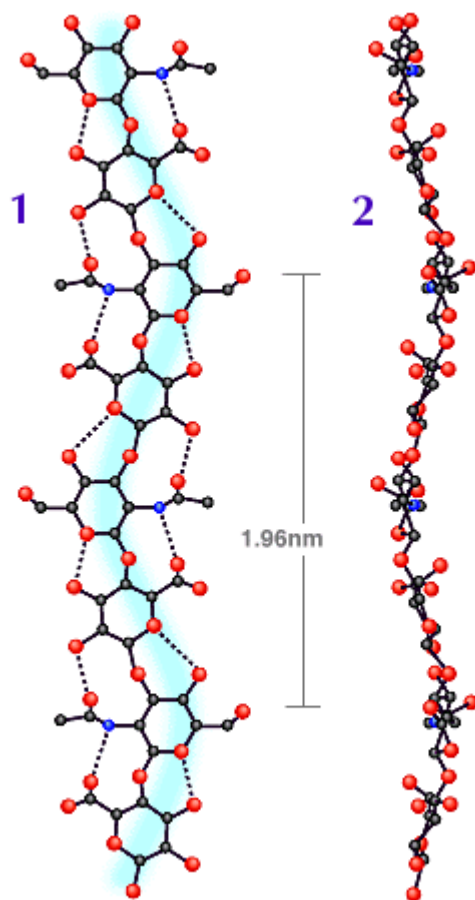
Obr. 3 Tetrasacharid z hyaluronanového řetězce obsahující dvě disacharidové opakující se jednotky v preferovaném uspořádání ve vodné roztoku. G je glukuronát, N je N-acetylglukosamin. Tečkované čáry značí vodíkové vazby. V nevodném rozpouštědle je vodný můstek mezi N2 a G1 (b) nahrazen přímou vodíkovou vazbou (a). G1 a N1 disacharidy jsou pootočený o 180°oproti G2 a N2 disacharidům, což má za následek dvojitou šroubovici. Šipky značí místa odolná iodistanové oxidaci [21]

2. 3. 3. Hydrofobní oblasti v hyaluronanu

Význam této sekundární struktury se stal jasnější, když bylo zaznamenáno, že hyaluronan v dvojité šroubovici má vnější hydrofobní domény, skládající se asi z osmi CH jednotek přibližně stejné velikosti jako oktanová kyselina. To znamená, že hyaluronan ve svojí struktuře obsahuje jak vysoce hydrofilní materiál, tak hydrofobní domény charakteristické např. pro lipidy, je tedy amfifilní.

Tyto hydrofobní oblasti mají dalekosáhlé důsledky pro molekuly ve vodném prostředí. Hydrofobní molekuly se shlukují ve vodě k sobě, tím redukuje velikost povrchu interagujícího s vodou. Tento mechanismus řídí vznik membrán a přispívá např. ke stabilitě struktury

dvoušroubovice DNA. Pro popis tohoto jevu se preferuje spíše pojem hydrofobní interakce, než hydrofobní vazba, protože žádná opravdová vazba se netvoří [21].

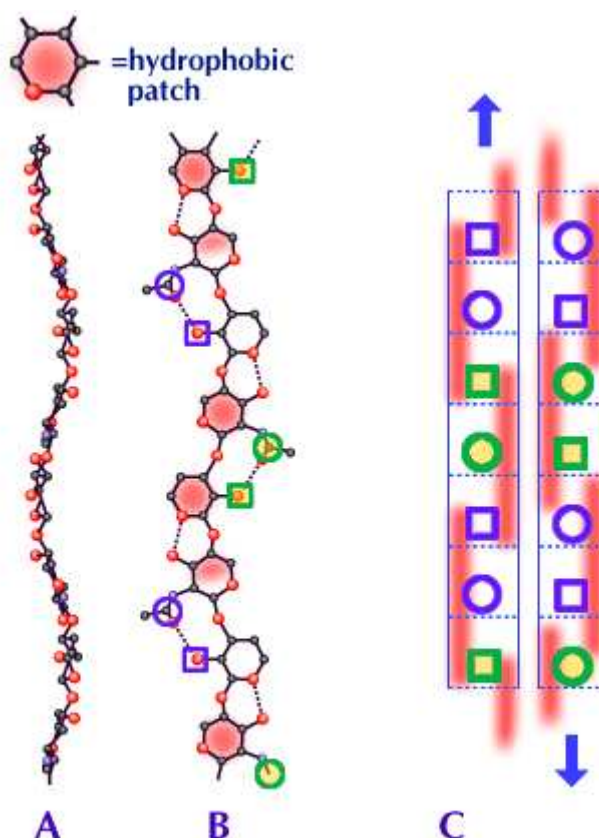


Obr. 4 Rovinná (1) a prostorová (2) počítačová projekce molekuly hyaluronanu. Dusíkové atomy jsou znázorněny jako modré kruhy [21]

2. 3. 4. Hyaluronanové sítě

Hydrofobní interakce mezi hydrofobními doménami hyaluronanu také způsobují, že molekuly hyaluronanu mohou agregovat mezi sebou [24], [25]. Rovinná a „pásková“ sekundární struktura má velmi zajímavé vlastnosti. Obě strany pásky jsou stejné (identické), ale jedna strana pásky běží v opačném pořadí než druhá, tzn., jsou antiparalelní. Důsledkem tohoto uspořádání je to, že obě strany jsou schopny interagovat stejně, tzn. co je možné na jedné straně pásky, je možné i na druhé.

Elektrostatická repulze, která by podporovala disociaci, je odstíněna nejen hydrofobními interakcemi, ale také vodíkovými vazbami mezi acetamidovými a karboxylovými skupinami. Tyto interakce jsou velmi krátkého dosahu a vyžadují tak velkou komplementaritu mezi dvěma zúčastněnými molekulami. Této komplementarity je nejnáze dosaženo mezi molekulami hyaluronanu, které jsou antiparalelní (Obr. 5) [26].



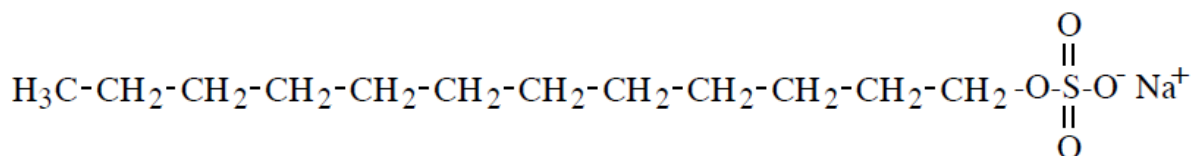
Obr. 5 A, resp. B prostorová, resp. planární struktura molekuly hyaluronanu. Červeně jsou vyznačeny hydrofobní domény. Kruhy reprezentují acetamidové skupiny a čtverce značí karboxylové skupiny. C je schéma možného párování mezi dvěma molekulami hyaluronanu [26]

2. 2. Amfifilní molekuly

Termín *amfifilní* byl poprvé použit Paulem Winsorem před padesáti lety. Je to složenina dvou řeckých slov, *amphi* znamená dvojitý, z obou stran nebo okolo a *philos* značí přátelství nebo afinitu [27].

Amfifilní látka vykazuje dvojitou afinitu, která z fyzikálně chemického hlediska lze charakterizovat jako polární – nepolární dualita. Typická amfifilní molekula se skládá ze dvou částí: na jedné straně má polární skupinu obsahující heteroatomy jako O, S, P, N, zabudované do funkčních skupin jako jsou alkoholy, thiooly, estery, ethery, kyseliny, sulfáty, fosfonáty aj. Na druhé straně se nachází nepolární skupina, což je obecně uhlovodíkový řetězec alkylového nebo alkylbenzenového typu, někdy s atomy halogenů nebo dokonce několika atomy neionizovaného kyslíku.

Polární část vykazuje silnou afinitu pro polární rozpouštědla, jako je např. voda, a je často nazývána částí hydrofilní. Apolární část se nazývá hydrofobní, nebo také lipofilní. Oba tyto pojmy mají kořeny v řečtině, kde *phobos* znamená strach a *lipos* mastný. Na Obr. 6 je znázorněna amfifilní molekula, která se často používá v různých šampónech, je to dodecylsulfát sodný, přičemž ve složení šampónů bývá uveden jako sodium lauryl sulfate.



Obr. 6 Dodecyl sulfát sodný

2. 2. 1. Povrchově aktivní látky versus surfaktanty

Vzhledem k jejich afinitě, amfifilní molekuly se „necítí dobře“ v žádném rozpouštědle, polárním či nepolárním, protože vždy obsahují jednu skupinu, která nesnáší prostředí rozpouštědla. To je hlavním důvodem, proč mají amfifilní molekuly silnou tendenci migrovat na povrch nebo mezifázové rozhraní a orientovat se tak, aby polární skupiny směřovaly do vody a nepolární skupiny ven z vody, eventuálně do nepolárního prostředí. Termín povrch v tomto případě znamená rozhraní mezi kondenzovanou fází a plynem, přičemž termín mezifázové rozhraní znamená hranici mezi dvěma kondenzovanými fázemi [28].

Termín surfaktant pochází z angličtiny, je to zkratka pro „surface-activ-agent“, a znamená látku, vykazující povrchovou nebo mezifázovou aktivitu. Na tomto místě je třeba zdůraznit, že ne všechny amfifily se chovají tímto způsobem. Aktivní v tomto směru jsou pouze molekuly s více či méně vyrovnanými hydrofobními a hydrofilními tendencemi. Pokud je molekula z většiny hydrofobní, zůstává v hydrofobním rozpouštědle a nemá tendenci migrovat na rozhraní.

V jiných jazycích termín surfaktant neexistuje, používá se pojmenování tensioactif (francouzština) nebo tenzid (němčina), což obecně znamená látku snižující povrchové napětí. Amfifilní molekuly ovšem mají i řadu jiných vlastností než jen snižování povrchového napětí a proto jsou často nazývány (i používány) jako: mýdla, smáčedla, dispersanty, emulsifikátory, pěnidla, baktericidy, antistatická činidla, korozní inhibitory atd...[29]. Některé amfifilní molekuly jsou známy podle struktury, kterou jsou schopny tvořit, jsou to např. membrány, mikroemulze, kapalně krystaly, lipozomy, vesikly nebo gely.

2. 2. 2. Klasifikace surfaktantů

Z průmyslového hlediska jsou surfaktanty často děleny podle způsobu použití. Toto dělení není příliš vhodné, neboť mnoho surfaktantů má několik způsobů použití a jejich klasifikace podle nich tak může být poněkud matoucí.

Nejvíce akceptovaný a také nejvíce vědecký způsob dělení surfaktantů je podle jejich disociace ve vodě. Na Obr. 7 jsou znázorněny molekuly surfaktantů typické pro každou skupinu.

2. 2. 2. 1. Aniontové surfaktanty

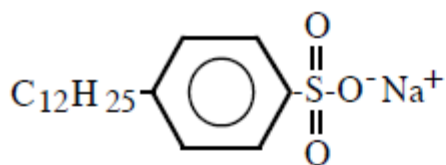
Aniontové surfaktanty jsou disociovány ve vodě na amfifilní aniont a na kationt, což je obvykle alkalický kov jako Na^+ , K^+ , nebo kvartérní dusík. Jsou to nejvíce používané surfaktanty, zahrnují přibližně 60 % světové produkce [30], [31].

2. 2. 2. 2. Neionogenní surfaktanty

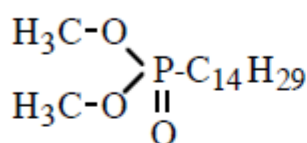
Neionogenní surfaktanty jsou v podílu produkce hned za aniontovými, tvoří asi 45 % světové produkce tenzidů. Nejsou disociovány ve vodě, protože jejich hydrofilní skupina je nedisociačního typu jako např. fenol, ether, ester nebo amid. Velké množství těchto

neionogenních surfaktantů je převedeno na hydrofilní přítomností PEG řetězce, který byl získán polykondenzací etylen oxidu. Nazývají se polyetoxylované neionogenní surfaktanty.

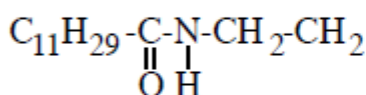
V posledních deseti letech byly trhu představeny glykosidické polární skupiny, důvodem byla jejich nízká toxicita. Jako lipofilní skupiny v tomto případě byly přítomny nejčastěji alkyly nebo alkylbenzeny, ty první pocházely z mastných kyselin přírodního původu [32].



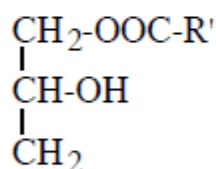
Dodecylbenzensulfonát sodný



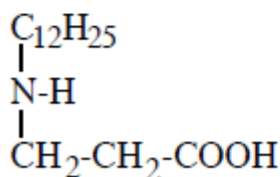
Dimethylether
tetradecylfosforečné kyseliny



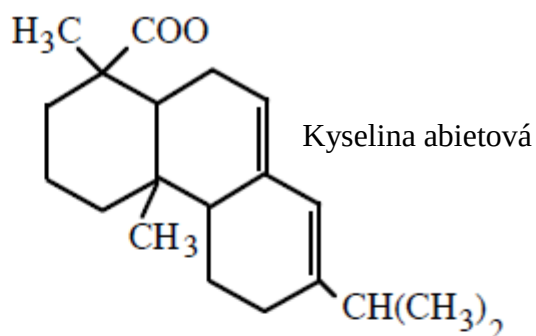
Lauryl monoethanol



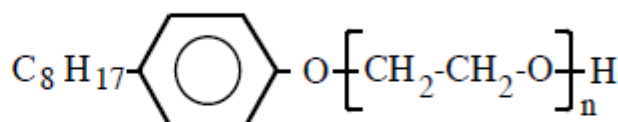
Diglycerid



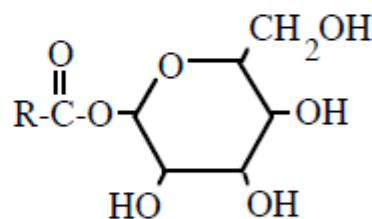
Dodecyl betain



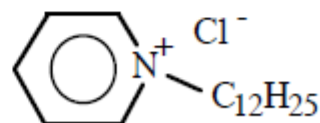
Kyselina abietová



Polyethoxylovaný oktylfenol



Sorbitan monoester



N-Dodecylpyridinium chlorid

Obr. 7 Nejznámější surfaktanty

2. 2. 2. 3. Kationtové surfaktanty

Kationtové surfaktanty jsou disociovány ve vodě na amfifilní kationt a aniont, nejčastěji halogen. Velké množství těchto látek odpovídá sloučeninám dusíku, jako soli mastných

kyselin a kvartérní amoniové soli s jedním nebo několika dlouhými řetězci alkylového typu, často pocházejícím z přírodních mastných kyselin.

Tyto surfaktanty jsou obecně dražší než aniontové, kvůli nutnosti velkého tlaku hydrogenace při jejich syntéze. Důsledkem toho jsou používány pouze ve dvou případech, kde není možné nahrazení levnější látkou. Za prvé, jako baktericid a za druhé, jako kladně nabitá látka, která se adsorbuje na negativně nabitý substrát a zajišťuje antistatický a hydrofobní efekt často velkého komerčního použití, např. jako inhibitor koroze [33].

2. 2. 2. 4. Zwitteriontové surfaktanty

Jestliže molekula surfaktantu vykazuje jak aniontové, tak kationové disociace, je nazývána amfoterní nebo zwitteriontová. To je případ především syntetických produktů jako jsou betainy nebo sulfobetainy a přírodních látek, např. aminokyselin a fosfolipidů.

Některé amfoterní tenzidy nejsou citlivé na pH, zatímco ostatní jsou kationové při nízkém pH, aniontové při vysokém pH a amfoterního charakteru při neutrálním pH. Amfoterní surfaktanty jsou obvykle drahé a jejich použití je tedy limitováno na velmi speciální aplikace, jako např. v kosmetice, kde se využívá jejich biologické kompatibility a velmi nízké toxicity.

2. 2. 2. 5. Polymerní surfaktanty

V posledních třech dekáдах byla představena nová třída povrchově aktivních látek, polymerní surfaktanty, nebo povrchově aktivní polymery. Jsou to látky vznikající asociací jedné nebo více makromolekulárních struktur, které vykazují hydrofilní nebo lipofilní chování. Asociací tvoří struktury separovaných bloků nebo roubovaných polymerů. Běžně se používají např. v kosmetice, potravinářství, v nátěrech nebo jako aditiva v ropném průmyslu.

2. 2. 3. Micely

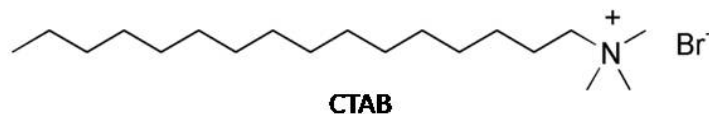
Mezi další významné vlastnosti tenzidů patří schopnost agregovat ve vodných roztocích, agregáty se nazývají *micely*. Formování micel, neboli micelizace je alternativní mechanismus adsorpce na mezifázovém rozhraní. Při micelizaci dochází k uspořádání molekul tenzidu tak, aby jejich hydrofobní části nebyly v kontaktu s vodou, tím se opět snižuje volná energie systému. V micelách jsou molekuly tenzidů organizovány tak, že hydrofilní polární hlava je na povrchu agregátu a hydrofobní nepolární chvost je uvnitř agregátu. Celá micela je tak ve vodě rozpustná a v jejím hydrofobním jádře se mohou rozpustit sloučeniny ve vodě nerozpustné.

Schematická struktura micely je znázorněna na Obr. 9. Micely se tvoří již při velmi nízkých koncentracích tenzidu, např. u tenzidu CTAB ve vodě je tato koncentrace přibližně 1 mM. Koncentrace, při které je povrch nasycen molekulami tenzidu a v roztoku dochází k tvorbě micel, se nazývá kritická micelární koncentrace, neboli CMC a je to důležitá charakteristika tenzidu.

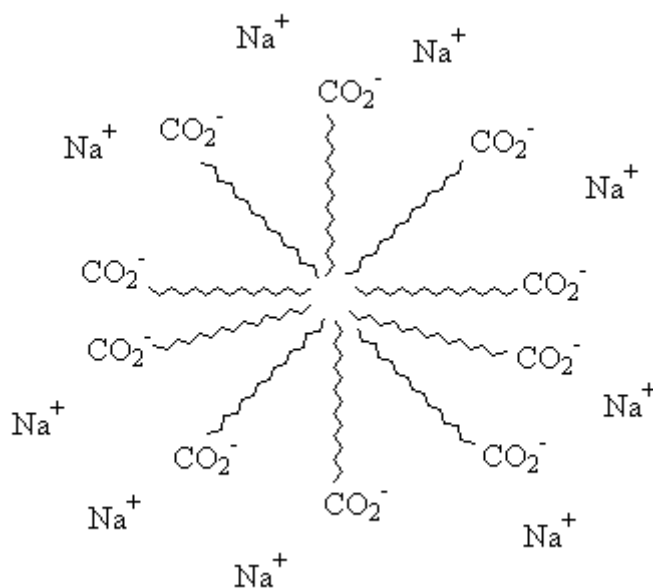
2. 2. 4. Cetyltrimethylamonium bromid

Cetyltrimethylamonium bromid, hexadecyltrimethylamonium bromid, ctrimonium bromid, CTAB, to všechno jsou názvy pro jednu strukturu, která je znázorněna na Obr. 8. Tato látka je kationový surfaktant. Slouží např. jako pufr k extrakci DNA [34], [35], [36]. Používá se také k přípravě zlatých nanočástic [37]. Je to bílá, práškovitá látka bez zápachu. Je dráždivá, zdraví škodlivá a nebezpečná pro životní prostředí. Laboratorně se využívá k modelování interakcí mezi kationovými surfaktanty a záporně nabitými polyelektrolyty, jako je např. hyaluronan.

Tyto interakce se intenzivně zkoumají z důvodu potencionálního využití tohoto systému jako nosiče – především hydrofobních – léčiv (viz současný stav řešené problematiky).



Obr. 8 Kationtový surfaktant CTAB



Obr. 9 Struktura micely

2. 2. 3. Výroba a použití surfaktantů

Světová produkce mýdel, detergentů a jiných surfaktantů byla zhruba 18 milionů tun v roce 1970, 25 milionů tun v roce 1990 a 40 milionů tun v roce 2000. Zhruba 25 % z tohoto množství pak připadá na severoamerický trh a 25 % na trh evropský [38].

Kvalitativní vývoj trhu v posledních 50 letech je velmi významný. Např. v roce 1940 byla hlavní světová produkce surfaktantů zaměřena hlavně na mýdla, její objem byl 1,6 milionů tun ročně. Tato mýdla se vyráběla velmi zastaralým způsobem.

Na konci druhé světové války přinesl průmysl zpracování ropy krátké olefiny, zejména C2–C3 jako produkt katalytického krakování. Na začátku 50. let ještě propylen neměl žádné využití, ale etylen začal být využíván ve výrobě styrenu. Nízká cena propylenu a možnost polymerizace do C9–C12–C15 hydrofobních skupin z něj udělala levnou alternativu k přírodním mastným kyselinám. Byly vyvinuty syntetické detergenty jako alkylbenzensulfonát a brzy nahradily mýdla z praček a jiných domácích použití [28].

Na začátku 60. let mnoho řek a jezer, do nichž ústil odpad z velkých měst, začalo být pokryto persistentními pěny, což vyústilo v ekologické poškození, neboť tenká vrstva pěny zabráňovala fotosyntéze a rozpouštění kyslíku. Na vině bylo větvení alkylové skupiny alkylbenzensulfonátu vyrobeného z propylenu, jehož polymerizace se řídí Markovnikovým pravidlem. Bylo objeveno, že tyto větvené polymery jsou odolné biodegradaci. Následkem

toho vzniknul ve Spojených státech a v Evropě zákon zakazující použití alkylátů na bázi propylenu.

Výrobci surfaktantů museli najít nové materiály k výrobě lineárních alkylátů, např. polymeraci etylenu. Všechny nové cesty syntézy byly dražší než ta původní a proto lineární alkylbensulfonáty jsou doteď nejlevnějšími surfaktanty. Tato situace vedla k vyvinutí jiných typů molekul, které se nyní používají v široké řadě produktů.

Krakování páry v 60. letech (hlavně kvůli produkci etylenu jakožto materiálu pro výrobu různých polymerů) přispěl také k levné dostupnosti etylenoxidu, základní stavební jednotky neionogenních surfaktantů.

70. léta přinesla vývin nových formulí, a silný nárůst použití surfaktantů nejen v domácnostech, ale i v průmyslu. Neionogenní surfaktanty byly používány v mnoha produktech, u kterých byla vyžadována dobrá tolerance k bivalentním kationtům. Kationtové a amfoterní surfaktanty byly nabízeny několika továrnami, ačkoliv jejich použití bylo limitováno jejich vysokou cenou

Mezi roky 1980–1990 se trh se surfaktanty stabilizoval s rychlým nárůstem produkce neionogenních tenzidů oproti aniontovým a hlavně představením nových typů neionogenních surfaktantů, např. alkylpolyglukosidů.

Polymerní surfaktanty často nejsou považovány za surfaktanty a neobjevují se ve statistikách, jako např. v tabulce (Tabulka 2). Jejich význam ale stále roste, jsou součástí mnoha výrobků. Jejich podíl na světovém trhu v roce 2000 mohl být kolem 10 % s produkty jako polyetoxy-polypropylenoxy blokové kopolymery, ethoxylované a sulfonované pryskyřice, karboxyethylcelulóza a jiné deriváty polysacharidů... Dá se předpokládat, že podíl jejich produkce vůči celosvětové produkci surfaktantů bude stále větší.

Tabulka 2 Rozdělení světové produkce surfaktantů v roce 1990 [38]

33% mýdel, karboxylátů, lignisulfonátů:	
50%	mýdla pro domácí užití
35%	jiné kyseliny pro průmyslové využití
22% syntetických detergentů, většinou sulfonátů nebo sulfátů	
50%	domácí užití (prášky)
17%	ropný průmysl
7%	betonová aditiva
4%	zpracování zemědělských a potravinářských produktů
3%	kosmetika, farmacie
40% neionogenních (ethoxyláty, ethoxysulfonáty)	
40%	ethoxyalkoholy
20%	ethoxylované alkylfenoly
15%	mastné kyseliny, estery
10%	aminy, amidy
4% kationtové, většinou kvartérní amoniové soli	
1% amfoterní, většinou betainy a deriváty aminokyselin	

2. 3. Reologie

Reologie je technika studující deformaci a tok hmoty. Hmota může být reologicky klasifikována s použitím dvou různých hodnot, viskozity a elasticity. Jednoduché pevné látky vykazují čistě elastickou odpověď na tlak, energie je v nich uložena. Jednoduché kapaliny vykazují čistě viskózní odpověď na tlak, všechna energie je disipována. Komplexní kapaliny se mohou chovat jak elasticky tak viskózně a říká se jim viskoelastické [39], [40].

Viskozita je koloidně popsána jako vlastnost kapaliny obsahující informaci o tom, jak snadně kapalina teče. Přesnější definice používá dynamickou viskozitu, definovanou jako poměr smykového napětí σ aplikovaného na povrchu smykové rychlosti $\dot{\gamma}$, což je rychlost při které se mění tok [39].

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (1)$$

Obvykle nějaký mechanický reometr aplikuje na kapalinu oscilační smykové napětí o malé amplitudě $\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$, kde γ_0 je amplituda a ω je frekvence oscilace, a měří smykovou deformaci [39], [41]. Smyková deformace γ je také definována jako časový integrál smykové rychlosti. Jestliže je amplituda napětí malá, struktura kapaliny není významně deformována a materiál zůstává v rovnováze, pak časově závislý tlak je lineárně úměrný napětí [39]:

$$\sigma(t) = \gamma_0 [G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)] \quad (2)$$

$G'(\omega)$ je odpověď ve fázi s aplikovaným napětím. Nazývá se elastický nebo úložný (storage) modul a popisuje energii uloženou v systému, když je aplikováno napětí. $G''(\omega)$ se nazývá ztrátový nebo viskózní modul a popisuje energii disipovanou v kapalině, když je aplikováno napětí [39], [41]. Komplexní napěťový modul je definován:

$$G^* = G' + iG'' \quad (3)$$

2. 4. Mikrореologie

Mikrореologie je rodina nedávno vyvinutých metod, které se zaměřují na studium mechanických vlastností měkkých materiálů na mikronové a submikronové stupnici. Ačkoliv konvekční reologie vyžaduje relativně velké množství vzorku pro měření, mikrореologie je schopna stanovit viskoelastické veličiny použitím minima vzorku (v řádu μl). Navíc, měření na reometru měří pouze vlastnosti celého roztoku, zatímco mikrореologie měří jak lokální, tak celkové mechanické vlastnosti.

Mikrореologické techniky jsou rozděleny do dvou oblastí, aktivní a pasivní. V aktivní mikrореologii je použito kontrolované zatížení, které vyvíjí lokální tlak na materiál a výsledná deformace je změřena. Deformační měření jsou pak použita na kvantifikaci viskoelasticity materiálu. Obvykle jsou aktivní zatížení dosaženy pomocí elektrického či magnetického pole nebo mikromechanických sil.

Pasivní mikrореologie ovšem zahrnuje použití inertní tepelné energie materiálu, která způsobuje pohyb sondy (částice) ve zkoumaném vzorku. Říká se jí Brownův pohyb. Totální pohyb (nebo difúze) částice ve vzorku může být změřen a dán do souvislosti s mechanickými vlastnostmi systému. Ačkoliv aktivní techniky dovolují použít pro měření pouze určitý rozsah frekvencí, pasivní mikrореologie garantuje, že měření nezpůsobí poškození materiálu, neboť použité síly jsou pouze v řádu několika pikonewtonů. Pasivní mikrореologie je minimálně invazivní, jestliže použité částice neovlivňují mechanické vlastnosti systému. Další výhodou pasivní mikrореologie je zjednodušení metody a její technické uskutečnění. Zatímco aktivní mikrореologie může vyžadovat sofistikovanou instrumentaci, pasivní metody mohou být tak

jednoduché, jako je značení pohybu mikročástic umístěných nebo už přítomných ve studovaném materiálu.

2. 4. 1. Částicová mikrореologie

Pasivní mikrореologie měří Brownův pohyb částic ve vzorku, abychom dostali mechanické vlastnosti v malém měřítku. Napětí vložené na studovaný materiál pochází ze stochastické kolize molekul systému kolem sondy. Tato stochastická kolize je řízena tepelnou energií systému, $k_b T$. V částicové mikrореologii jsou malé částice (rozsah asi 1 μm až 100 nm) vloženy do vzorku (materiálu). Zvětšená videa Brownova pohybu částic jsou pak natočena kamerou připojenou k mikroskopu.

S pomocí specializovaného softwaru, který zpracovává obraz, detekuje částice a počítá jejich trajektorii, je možné mapovat pohyby částic se sub-pixelovou přesností 10 nm [42]. Trajektorie pak mohou být použity pro výpočet průměrné hladiny posunutí (mean square displacement, MSD) $\Delta r^2(\tau)$ pro každou jednotlivou částici. Mechanické vlastnosti systému se pak získají z generalizované Stokes–Einsteinovy rovnice:

$$\eta = \frac{nk_b T \tau}{3\pi a \langle \Delta r^2(\tau) \rangle}, \quad (4)$$

kde n je počet dimenzí, k_b Boltzmannova konstanta, T je teplota, τ je časový interval, a je poloměr částic a $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ je průměrná hodnota posunu.

Částicová mikrореologie vyžaduje materiál dostatečně jemný k tomu, aby byly částice řízeny pouze tepelnou energií a také materiál transparentní, aby byly částice vidět pod mikroskopem. Měřitelný viskoelastický modul má rozsah asi 10 μPa až 1 Pa. Výhodou částicové mikrореologie je to, že částice mohou být analyzovány individuálně a poskytovat tak lokální měření, nebo mohou být zprůměrovány a poskytovat tak průměrné mechanické vlastnosti heterogenního materiálu. Byly vyvinuty techniky k mapování prostorové a časové změny mechanických vlastností studovaného materiálu [43].

Rovnice 4 bude platit v čistě viskózních kapalinách, kde MSD poroste lineárně na logaritmické stupnici časového intervalu. Ve více komplexních kapalinách tento vztah nebude fungovat a MSD poroste různě, v závislosti na konstantě τ^a [44]. Nový nelineární vztah může být vyjádřen následovně:

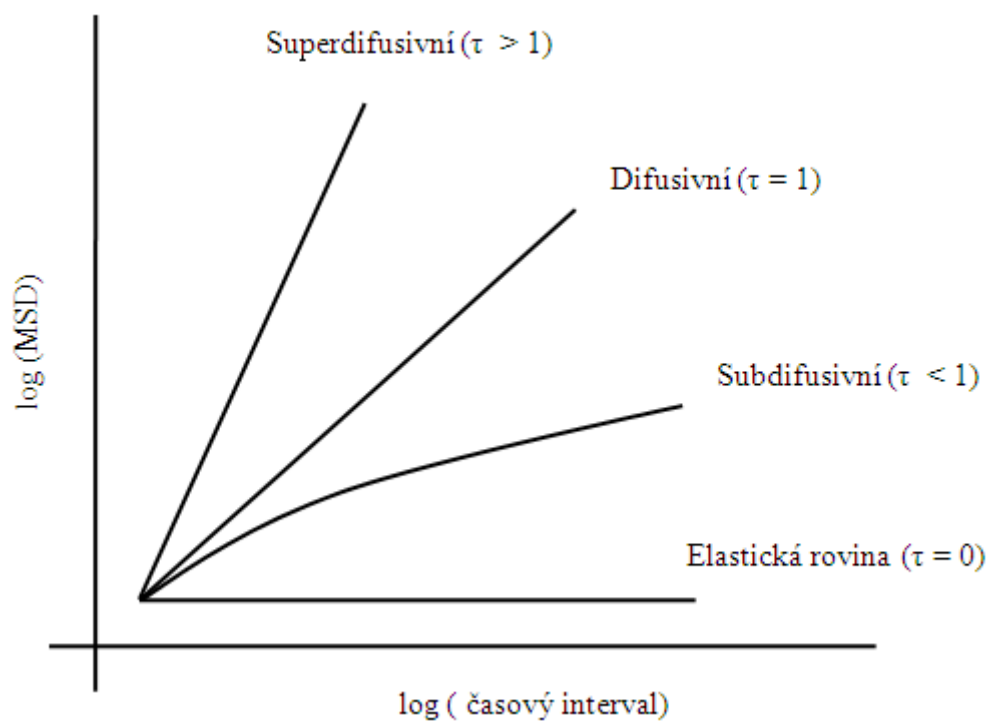
$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle \propto \tau^a \quad (5)$$

Na Obr. 10 jsou znázorněny závislosti pro různé konstanty úměrnosti. V čistě viskózním materiálu je $a = 1$ a MSD roste lineárně. Ve viskoelastickém materiálu je $0 < a < 1$. V čistě elastickém materiálu je $a = 1$.

Komplexní smykový modul může být vyjádřen pomocí MSD Brownova pohybu s použitím generalizované Stokes–Einsteinovy rovnice (rovnice 4). V tomto případě viskózní část je vyjádřena jako $G^*(\omega) = G_1 + G_2 i$, kde reálná složka je elastický modul a imaginární reprezentuje ztrátový modul. Generalizovaná Stokes–Einsteinova rovnice je pak vyjádřena jako:

$$G^*(\omega) = \frac{k_b T}{\pi i \omega \Im_u \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle} \quad (6)$$

kde $\Im_u$ je Unilaterální Laplaceova transformace [45].



Obr. 10 Závislosti MSD na časovém intervalu reprezentující různé druhy difúze a různá prostředí [44]

2. 3. Současný stav řešení problematiky

Kyselina hyaluronová byla objevena v roce 1934 **Karlem Meyerem** [46], který ji izoloval z oka hovězího dobytka. Nachází se především v kohoutích hřebíncích, kloubní tekutině, pupečních šňůrách, očních sklívcích, je přítomná v extracelulární matrix a v pouzdrech některých patogenních bakterií jako jsou *Streptococcus* a *Pasteurella* [47]. Je to bílá práškovitá látka, silně hygroskopická, působí jako lubrikant a humektant. Mezi důležité vlastnosti kyseliny hyaluronové patří, že je to látka tělu vlastní – není tedy cytotoxická, imunogenní ani teratogenní a je biodegradabilní. Všechny tyto unikátní vlastnosti vedou k tomu, že hyaluronan (sůl kyseliny hyaluronové, HyA) se používá v kosmetickém průmyslu (díky svým hydratačním vlastnostem), v medicíně, v ophthalmochirurgii (např. k transplantaci rohovky), v ortopedii, k hojení ran a ve tkáňovém inženýrství. V neposlední řadě se hyaluronanu využívá jako cíleného nosiče léčiv [48], [49].

Také komplexy hyaluronan–tenzid představují potenciální nosiče léčiv, především z důvodu možnosti rozpustit hydrofobní látku (léčivo) v micelách tenzidu a za pomoci hyaluronanu, který vykazuje vysokou afinitu k nádorovým buňkám, jej dopravit na místo účinku. Volbou směsi dvou různých hyaluronanů o výrazně odlišné molekulové hmotnosti bychom byli schopni měnit a řídit vlastnosti tohoto systému. Je proto třeba co nejlépe charakterizovat chování tohoto systému.

Interakcemi systému hyaluronan/kationaktivní tenzid se podrobně zabývali **Kyrre Thalberg** a **Björn Lindman** z různých hledisek. Jeden z prvních článků [50] se zabývá interakcemi hyaluronanu a kationaktivního tenzidu typu alkyltrimethylammonium bromid metodami fázové separace, NMR vlastní difúze, vodivosti a solubilizace barviv. Výsledky jejich výzkumu ukazují, že vázání surfaktantu na hyaluronan nastává až pro tenzidy s délkou řetězce větší než 10 uhlíků. Několik pozorování indikuje vznik micelám podobným strukturám adsorbovaným na řetězec polyelektrolytu. Mezi tato pozorování patří například vysoká kooperativita a závislost délky řetězce tenzidu při vázání na hyaluronan, vázání protiiontu nebo solubilizační síla tenzidu navázaného na hyaluronan zdokumentovaná rozpuštěním hydrofobního barviva. V určitém stupni vázání nejsou tyto agregáty dále rozpustné a nastává fázová separace. Dvoufázový region se rozšiřuje při koncentracích vyšších, než je CMC daného surfaktantu. Přidáváním velkého nadbytku surfaktantu dochází k opětovnému rozpuštění sraženiny. Toto se děje proto, že systém upřednostňuje volné micely před micelami navázanými na hyaluronan.

Dále zkoumali vliv délky uhlíkatého řetězce a molekulové hmotnosti hyaluronanu na fázové chování systému [51]. Zjišťují, že čím delší je uhlíkatý řetězec surfaktantu typu alkyltrimethylammonium bromid, tím větší je dvoufázová oblast ve fázovém diagramu. To se děje v důsledku silnějších interakcí mezi micelami a polymerním řetězcem, stejně jako v důsledku tvorby menších micel surfaktantů s krátkým uhlíkatým řetězcem, než jsou micely surfaktantů s delším uhlíkatým řetězcem. Fázová separace nenastává v systému se surfaktanty, které mají kratší uhlíkatý řetězec než 10 uhlíků, neboť elektrostatické interakce zde jsou příliš malé. Poměr surfaktantu k hyaluronanu v koncentrované fázi dosahuje oblasti roviny, tzv., plato, což indikuje nasycení řetězce hyaluronanu surfaktantem. Po překročení plata koncentrace surfaktantu je jeho další nadbytek distribuován rovnoměrně mezi dvě fáze. Molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňuje fázový diagram pouze nepatrně.

Stejná skupina se zabývala se také vlivem soli na systém hyaluronan/C₁₄TAB [52]. Zjistili, že nízká koncentrace NaBr vede k redukci dvoufázové oblasti ve fázovém diagramu a po překročení koncentrace 250 mmol·l⁻¹ fázová separace nenastává. Při překročení koncentrace

$500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nastává opět fázová separace, je ovšem zcela jiného typu než předešlá a zahrnuje rozdělení systému na roztok s velkou koncentrací polymeru a roztok s velkou koncentrací surfaktantu.

Stejní autoři zkoumali vznik gelů v systému polyaniontu a opačně nabitého surfaktantu [53]. Polyaniont je v tomto případě hyaluronan a surfaktanty jsou alkyltrimethylamonium bromidy. Gely se formují v průběhu procesu fázové separace a jsou složeny jak z polyelektrolytu, tak ze surfaktantu. Všechny gely zahrnuté v této studii jsou izotropní, transparentní, kontinuální a obsahují hydrofobní domény. NMR příčná relaxace *N*-methylových a methylenových protonů je rychlejší v gelu než v micelárním roztoku, což je způsobeno vznikem agregátů podobných micelám v gelu. Vlastní difúze surfaktantů v gelu je velmi pomalá, což je následek vysoké koncentrace obou složek v gelu. Micelární roztoky mají koeficienty vlastní difúze ve stejném řádu, jako jsou koeficienty vlastní difúze surfaktantů v gelech, takže fakt, že tvoří agregáty s polymerním řetězcem, vlastní difúzi surfaktantů příliš neovlivňuje. Difúze vody do gelů je také velmi pomalá, což je důsledek přítomnosti vázané vody.

Interakcemi záporně nabitého polyelektrolytu hyaluronanu sodného (NaHyA) a kladně nabitého iontu surfaktantu tetradecyltrimethylamonium bromidu (TTAB) v prostředí se zvyšující se koncentrací NaCl se zabývá **Asa Herslof a spol.** [54]. Vlastnosti tohoto systému jsou zkoumány pomocí měření viskozity, povrchového napětí a fázového chování. Měřením viskozity dochází k závěru, že změny viskozity systému jsou způsobeny vázáním micel TTAB na polymer. Pro malé koncentrace TTAB vznikají asociáty jednoho polymerního řetězce „obalené“ kolem jedné nebo více micel nebo agregáty jednoho či více řetězců polymeru sdílejících jednu micelu. Tyto efekty způsobují pokles viskozity roztoku. Se vzrůstající koncentrací TTAB začíná být dostatek volných micel na to, aby se řetězce mohly roztáhnout či „neagregovat“. To vede k nárůstu viskozity v roztoku. Elektrostatická povaha těchto interakcí je demonstrována poklesem vázání řetězce na micelu se vzrůstající koncentrací NaCl.

Podobný systém zkoumají **Kazuhiro Fukada a spol** [55], kteří měří fázové chování, viskozitu a dynamický smykový modul roztoků NaHyA a dekatrimethylamonium bromidu (C_{10}TAB) a NaCl. Zjišťují, že při koncentraci C_{10}TAB od $0,3$ do $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentraci NaHyA nad $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se systém rozděluje do dvou fází. Pro roztoky obsahující nadbytek C_{10}TAB (nad $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) je hranice mezi zředěnou a polozředěnou oblastí určena měřením specifické viskozity za nulového smykového napětí (zero-shear specific viscosity data). Poté srovnávají vnitřní viskozitu a dynamický smykový modul roztoků s NaCl a roztoků bez NaCl. Zjišťují, že NaHyA a C_{10}TAB tvoří komplexy v $0,35 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{C}_{10}\text{TAB}$, které mají nízkou vnitřní viskozitu a jejichž velikost narůstá se zvyšující se koncentrací C_{10}TAB . Dále zjišťují, že pokud je koncentrace NaCl $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a polymer se nachází v polozředěné oblasti, pak hustota propletených řetězců NaHyA je vyšší v roztoku s C_{10}TAB než v roztoku s NaCl.

Zkoumáním chování směsí vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek se zabývají následující autoři. **Soumya S. Patnaik a Ruth Pachter** [56] se ve svém článku zabývají mísitelností a fázovým chováním směsí obsahujících polymethylmetakrylát (PMMA) a 4-*n*-pentyl-4'-kyanobifenyl (5CB), dále methakrylát oligomer a 5CB, a nakonec methakrylát monomer a 5CB. 5CB je nízkomolekulární kapalný krystal. Mísitelnost a fázové chování těchto směsí je zkoumáno pomocí technik molekulárního modelování a slouží jak k pochopení fázového chování uvedených binárních směsí, tak k potvrzení efektivnosti dané

metody při studiu mísitelnosti binárních směsí polymerů a molekul s nízkou molární hmotností.

Studie vychází z poznatku, že nutnou podmínkou pro mísitelnost je záporná volná energie mísení. V případě mísení polymeru a tekutého krystalu je tato energie ovlivněna dvěma hlavními příspěvky a to příspěvkem z izotropního mísení a příspěvkem z anizotropního uspořádání. Jednou z cest pro popis fázového chování této směsi je tedy kombinace Flory-Hugginsovy volné energie pro izotropní mísení a Maier-Saupeho volné energie pro nematické uspořádání.

Za jakékoliv teploty je volná energie nematického uspořádání významná pouze při velmi vysokých koncentracích kapalného krystalu a ve většině případů dominuje vliv volné energie izotropního mísení. Proto v tomto článku počítají pouze Flory-Hugginsovu volnou energii pro izotropní mísení. Pro řešení mísitelnosti a fázového chování výše uvedených látek ji kombinují s technikami molekulárního modelování a používají dvě metody.

První metoda – metoda dvou fragmentů – slouží k rychlému vyhodnocení mísitelnosti. V této metodě jsou vypočítány lokální interakce mezi fragmentem polymeru a organickou molekulou a energie mísení je odhadována pomocí koordinačních čísel. Nevýhodou této metody je poměrně obtížná definice jednotlivých koordinačních čísel.

Druhá metoda používá kohezní energie čistých složek odvozené z molekulového modelování. Interakční parametr je pak získáván z jejich rozdílu. Nevýhodou této metody je, že je velmi nákladná.

Výsledky dokazují, že s pomocí molekulového modelování je možné teoreticky předpovídat mísitelnost. Plné atomistické modelování dává nejdůvěryhodnější výsledky, ovšem pro popis mísitelnosti polymerů lze použít i kombinaci různých simulačních technik.

Denny Mahlin a spol. [57] zkoumají pevné směsi polárního lipidu monooleinu (MO) a poly(ethylenglykolu) (PEG) o různých molekulových hmotnostech (1 500, 4 000 a 8 000) metodou diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a rentgenového rozptylu při malém úhlu (SAXS).

Výsledky jejich práce ukazují, že PEG o nižší molekulové hmotnosti je do své struktury schopen navázat více MO než PEG o vyšších molekulových hmotnostech. PEG 1 500 krystalizuje s plně rozvinutou šroubovicí, kde MO je přítomno ve více než 15 %hm. Je nejpravděpodobnější, že skládaná struktura obsahuje „vmezeřený“ MO. Oproti tomu stupeň skládání u ostatních PEG roste s rostoucí koncentrací MO. Rostoucí koncentrace MO také způsobuje snížení bodu tání u všech tří polymerů. Pokud byla při přípravě vzorků použita koncentrace MO větší než ta, při které byla fáze bohatá na PEG nasycena, došlo k vytvoření dvou různých fází MO. Toto neprobíhalo při použití PEG 8 000 – autoři se domnívají, že je to způsobeno malou koncentrací MO v počáteční fázi bohaté na PEG. Tento výzkum je použitelný pro další studium fázového chování pevných polymerních materiálů, stejně jako v pevných disperzích pro cílenou distribuci léčiv.

Paul Dubin a Peter Tong věnují jednu kapitulu své knihy [58] adsorpci ze směsi dlouhých a krátkých řetězců polymerů. V první části kapitoly jsou uvažovány interakce dlouhého řetězce z N monomerů rozpuštěného v matici kratších řetězců podobného druhu, ale s P jednotkami. P může být v rozsahu od 1 do N . Pokud P je rovno 1, předpokládáme, že monomer je dobrým rozpouštědlem pro zkoumaný dlouhý řetězec. V tom případě tento řetězec nabobtná. V opačném případě, když $P \approx N$ je systém podobný tavenině. Je také zajímavé uvažovat situaci, která nastává, pokud délka jednotky P v matici je změněna.

V druhé části kapitoly je řešena adsorpce z roztoku polymeru rozpuštěného v dobrém rozpouštědle. Předpokladem je, že povrch je nepropustný a pouze mírně přitažlivý pro monomery. Pak je volná energie systému dána přírůstkem monomerů dlouhého řetězce na povrchu. Bylo diskutováno několik případů. Pokud je polymer zcela rozpuštěný, pak nejzajímavější oblastí je tzv. plato, kdy je povrch nasycen. Koncentrační profil zahrnuje – se zohledněním centrálních a proximálních zón přítomných v jednoduchém rozpouštědle – ideální oblast v bezprostřední blízkosti povrchu, jejíž šířka závisí na struktuře rozpouštědla. V polorozpuštěných oblastech je dlouhý řetězec lokalizován v blízkosti povrchu pro koncentrace menší než C_1 . Pro koncentrace mezi C_1 a C_2 se formují velké smyčky dlouhého řetězce, dokonce i přesto, že většina adsorbovaných řetězců zůstává v adsorpční vrstvě se šířkou D . V koncentracích menších než C_2 je koncentrace monomerů na povrchu úměrná N , zatímco v koncentracích nad C_2 je tato koncentrace úměrná $N^{\frac{1}{2}}$. Dlouhé smyčky se rozšiřují k poloměru řetězce a obsahují konečný zlomek adsorbované hmoty. Kvůli vlivu adhezních sil oblast mezi koncentracemi C_1 a C_2 odpovídá případu, kdy dlouhý řetězec má N monomerů na povrchu je na něm dobře zakotvený. Rozsáhlé smyčky dlouhého řetězce se tvoří především při koncentraci nad C_2 , v tomto případě je ale na povrchu adsorbováno pouze $N^{\frac{1}{2}}$ monomerů. Toto vede k rovnováze mezi těmito protikladnými vlastnostmi, jako je zejména rozšiřování dlouhých smyček a velmi dobrá adheze.

N. Berriaud a spol. studují ve svém článku [59] smykový tok roztoků hyaluronanů připravených ze směsi hyaluronanů o různých molekulových hmotnostech. Studie byla provedena s použitím pěti komerčních hyaluronanů sodných (HyA-1 až HyA-5). Směsi těchto hyaluronanů byly nejprve rozpuštěny v roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{NaCl}$, aby byly eliminovány elektroviskozitní efekty a poté byly stejné experimenty provedeny při totální iontové koncentraci C_T odpovídající $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku hyaluronanu ve vodě. Ve všech roztocích je zkoumán smykový tok, vnitřní viskozita a molekulová hmotnost. U všech vzorků je matematicky stanovena specifická viskozita a tato je porovnána s experimentálně získanou hodnotou. Rozdíly experimentálně a matematicky získaných specifických viskozit nepřesahují 5 %. Výsledky jejich výzkumu prezentují skutečnost, že roztoky směsí dvou hyaluronanů o různých molekulových hmotnostech mají reologické chování ekvivalentní k roztokům jednotlivých čistých hyaluronanů. Teoretická hodnota vnitřní viskozity může být odhadnuta na základě klasického aditivního pravidla. Při nízkých iontových silách musí být použito izoionické ředění k měření viskozity jednotlivých vzorků a k následnému odhadování vnitřní viskozity směsí.

Viskozita – za dané teploty a iontové síly – je v první aproximaci funkcí překryvového parametru $C[\eta]$ jak pro samotné hyaluronany, tak i pro jejich směsi. Je tedy možné s poměrně dobrou přesností předvídat viskozitu roztoků směsí pro určitou koncentraci polymeru pro kteroukoliv iontovou sílu.

3 MATERIÁLY A METODY

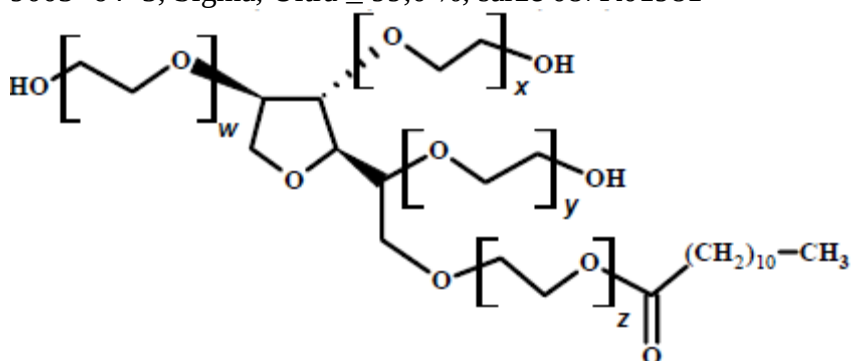
3.1. Materiály

Hyaluronan

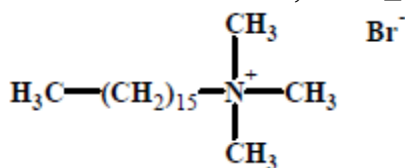
HyA M_w =17 kDa, CPN spol. s. r. o., šarže 190908-E1
 HyA M_w =73 kDa, CPN spol. s. r. o., šarže 071207-P1
 HyA M_w =300 kDa, CPN spol. s. r. o., šarže 160708-E1
 HyA M_w =806 kDa, CPN spol. s. r. o., šarže 211341
 HyA M_w =1800 kDa, CPN spol. s. r. o., šarže 211180
 HyA M_w =1,46 MDa, CPN spol. s. r. o., šarže 141008-E1

Tenzidy

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

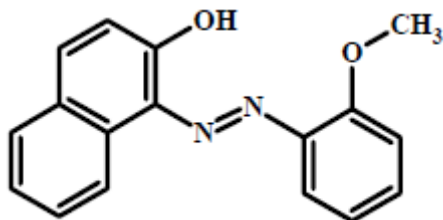


CTAB, cetyltrimethylammonium bromide, CAS: 57-09-0, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Ultra $\geq 99,0$ % šarže 52365



Hydrofobní barvivo

Súdánová červeň G, CAS: 1229-55-6, Sigma Aldrich Chemie GmbH, šarže 17373



Rozpouštědla

Mili-Q voda (Milipore Academic)
 aceton, Penta, 99,5 %, šarže 1302030210

Ostatní

NaCl, chlorid sodný, CAS: 7647-14-5, Merci s.r.o., 99,9 %

3. 2. Metody

3. 2. 1. Příprava vzorků

3. 2. 1. 1. Pozorování interakce samotné nízkomolekulární HyA s tenzidem

Byl připraven zásobní roztok HyA 17 kDa o koncentraci $3,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Ze zásobního roztoku barviva připraveného v předchozím experimentu bylo pipetováno do vialek takové množství, aby po odpaření těkavého rozpouštědla byla výsledná koncentrace ve zkoumaném vzorku o objemu 5 cm^3 řádově $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Těkavá látka byla odpařena.

Po odpaření rozpouštědla byl do vialek pipetován zásobní roztok CTAB ve vodě, resp. v NaCl. Rozsah koncentrací CTAB byl volen od 0 do $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB. Vialky byly umístěny do ultrazvukové lázně, a to po dobu 15 min a při teplotě 30°C , aby došlo k důkladné solubilizaci barviva. Poté byly vzorky doplněny vodou, resp. roztokem NaCl tak, aby výsledný objem vzorků po přidání konstantního objemu zásobního roztoku HyA 17 kDa byl 5 cm^3 . Nakonec byl přidán konstantní objem zásobního roztoku HyA 17 kDa tak, aby výsledná koncentrace HyA 17 kDa ve vzorku byla $0,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Namíchané vzorky byly ponechány přes noc na třepačce a následující den byly vyfotografovány.

3. 2. 1. 2. Pozorování interakcí směsí HyA s tenzidy

Nejprve byly namíchány zásobní roztoky směsí hyaluronanů. Pro namíchání směsi byla vždy použita HyA o molekulové hmotnosti 1,46 MDa, která byla zkombinována s jednou z pěti jiných molekulových hmotností hyaluronanu v různém poměru. Jako druhá složka směsi s HyA 1,46 MDa byly voleny tyto molekulové hmotnosti HyA: 17 kDa, 73 kDa, 300 kDa, 806 kDa a 1800 kDa. Směsi hyaluronanů byly namíchány v hmotnostních poměrech 70:30, 50:50 a 30:70 (druhé číslo vždy udává poměr HyA 1,46 MDa ve směsi).

Postup namíchání zásobních roztoků směsí HyA byl následovný: byly naváženy složky směsi v příslušném poměru, doplněny vodou, ponechány míchat na magnetické míchačce nejméně 12 hod. a doplněny na příslušný objem. Celková koncentrace směsi HyA ve všech zásobních roztocích byla $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Dále byly namíchány zásobní roztoky tenzidů. Pro přípravu vzorků byly použity dva zásobní roztoky CTAB ve vodě o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zásobní roztok barviva byl připraven tak, že příslušné množství Súdánové červeně bylo rozpuštěno v acetonu tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku byla řádově $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jako poslední byl namíchán nasycený roztok NaCl o koncentraci $5,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěním přebytkového množství NaCl ve vodě.

Postup přípravy vzorků je stejný ve všech případech: nejprve byl do vialek napipetován zásobní roztok barviva v těkavém rozpouštědle tak, aby výsledná koncentrace barviva ve vzorku činila $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Aceton byl ponechán se odpařit. Po odpaření rozpouštědla byl do vialek napipetován zásobní roztok CTAB v požadovaném množství. Rozsah koncentrací CTAB ve vzorcích byl volen mezi $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a v koncentrační řadě CTAB bylo celkem sedm vzorků. K vzorkům byla doplněna voda tak, aby konečný objem vzorku po přidání všech složek činil 5 cm^3 . Vzorky byly ponořeny do ultrazvukové lázně po dobu 15 min při teplotě 30°C , aby došlo k solubilizaci barviva.

Následně bylo ke každému vzorku přidáno požadované množství nasyceného roztoku NaCl tak, aby jejich iontová síla byla v rozmezí $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Každý vzorek v koncentrační řadě CTAB se lišil iontovou silou, tedy sedm různých koncentrací CTAB, z nichž každá měla čtyři různé iontové síly, tvořilo experiment o 28 vzorcích.

Nakonec bylo do všech vzorků napipetováno konstantní množství zásobního roztoku směsi HyA tak, aby po doplnění vzorků na celkový objem 5 cm^3 byla koncentrace směsi ve vzorku $1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Vzorky byly umístěny na třepačku a ponechány interagovat nejméně 12 hod. Následujícího dne byly popsány a vyfotografovány (příloha).

3. 2. 1. 3. Pozorování interakcí bez vnějšího mechanického zásahu

Postup přípravy vzorků je stejný jako v oddíle 3. 2. 1. 1. s tím rozdílem, že vzorky byly namíchány do zkumavky a ponechány interagovat bez mechanického zásahu (bez třepačky a ultrazvuku) Následující den byly vyfotografovány.

3. 2. 1. 4. Vysušování, rehydratování a zahřívání vzorků

Vzorky z předchozího experimentu s rostoucí koncentrací CTAB a měnící se iontovou silou byly vysušeny v sušárně při 50°C a následně k nim bylo přidáno 5 cm^3 vody. Koncentrace CTAB ve vzorcích byla v rozmezí od 0 do $80\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, iontová síla v rozmezí od $0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a směs hyaluronanů o molekulových hmotnostech 73 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích byla v poměru 30:70. Vzorky byly ponechány 3 hodiny v klidu, následně byly vyfotografovány a bylo zapsáno pozorování.

Druhá řada vzorků z předchozího experimentu, ve které byl poměr směsi hyaluronanů o molekulových hmotnostech 73 kDa a 1,46 MDa 50:50, byla použita pro pozorování změn ve vzorcích při jejich zahřívání. Vzorky byly zahřáty až na teplotu 100°C , poté 10 min vařeny. Výsledné pozorování bylo zapsáno a vyfotografováno.

3. 2. 1. 5. Měření velikosti částic

Pro vytvoření modelové řady vzorků byly použity zásobní roztoky z předchozích experimentů. Byl to zásobní roztok směsi hyaluronanů o molekulových hmotnostech 1,46 MDa a 17 kDa v poměru 30:70, dále zásobní roztok CTAB o koncentraci $20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $100\text{ nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve vodě a také nasycený roztok NaCl.

Do vialek bylo napipetováno požadované množství zásobního roztoku CTAB, poté byly doplněny vodou tak, aby výsledný objem vzorku (po přidání směsi hyaluronanů) činil 5 cm^3 . Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 15 min při teplotě 30°C . Iontová síla vzorků byla upravena přidávkem nasyceného roztoku NaCl. Poté byl do vzorku přidán konstantní objem směsi hyaluronanů tak, aby její výsledná koncentrace ve vzorku byla $1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace CTAB byla v rozmezí od 0 do $80\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, iontová síla v rozmezí od 0 do $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Vzorky byly přes noc ponechány na třepačce, následující den zfiltrvány přes filtrační papír a změřeny na přístroji Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern. Měřena byla velikost částic ve vzorku.

3. 2. 1. 6. Vliv přípravy na velikost a vzhled částic ve vzorcích

S použitím předem namíchaných zásobních roztoků byly připraveny 4 modelové řady pro posouzení vlivu přípravy vzorků na vzhled a velikost částic, které se ve vzorcích tvoří. Nejprve byl namíchán roztok směsi hyaluronanů o molekulových hmotnostech 1,46 MDa a 17 kDa v poměru 50:50 o celkové koncentraci $5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byla navážena požadovaná množství obou hyaluronanů, zalita vodou a ponechána míchat přes noc. Následující den byl roztok doplněn na požadovaný objem. Takto připravený roztok byl použit pro přípravu dvou modelových řad vzorků.

Pro přípravu zbývajících dvou řad byl použit roztok vzniklý smícháním roztoků hyaluronanů o molekulových hmotnostech 1,46 MDa a 17 kDa v poměru 50:50 tak, aby

celková koncentrace směsi hyaluronanů byla $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednotlivé roztoky byly naváženy předchozí den, ponechány míchat přes noc a poté doplněny na požadovaný objem. Směs roztoků byla ponechána míchat magnetickým míchadlem 15 minut.

Vzorky byly připraveny dvěma způsoby. První způsob: nejprve byla do vialek napipetována Súdánová červeň tak, aby její výsledná koncentrace ve vzorcích byla $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rozpouštědlo bylo ponecháno se odpařit. Poté bylo do vzorků napipetováno požadované množství zásobního roztoku CTAB. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně zahřáté na 30°C po dobu 15 min. Poté byly doplněny vodou tak, aby konečný objem vzorku po přidání směsi hyaluronanů činil 5 cm^3 . Iontová síla vzorků byla upravena přidáním nasyceného roztoku NaCl. Nakonec byla do vzorků napipetována směs hyaluronanů tak, aby její konečná koncentrace ve vzorcích byla $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Druhý způsob přípravy se lišil pouze tím, že vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně až po přidání vody.

Takto připravené vzorky byly umístěny přes noc na třepačku, následující den popsány a vyfotografovány.

3. 2. 1. 7. Reologická měření

Ze zásobních roztoků směsi hyaluronanů v různém poměru namíchaných v předchozích experimentech byly připraveny vzorky. Ze zásobního roztoku směsi hyaluronanů o molekulové hmotnosti 17 kDa a 1,46 MDa v poměru 70:30 byly namíchány vzorky s rostoucí iontovou silou.

Nejprve byla do vialek napipetována voda tak, aby po přidání určeného množství směsi hyaluronanů byl výsledný objem ve vialce 5 cm^3 . Poté byla upravena iontová síla ve vzorcích přidáním nasyceného roztoku NaCl. Nakonec bylo přidáno požadované množství směsi hyaluronanů tak, aby koncentrace této směsi ve vzorku o objemu 5 cm^3 byla $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Iontová síla byla v rozmezí od 0 do $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Dále byly připraveny vzorky obsahující všechny směsi hyaluronanů použité v této práci. Tyto vzorky byly namíchány pouze s vodou. Koncentrace použitých směsí v každém vzorku byla $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro porovnání vlivu způsobu přípravy na viskozitu vzorku byl připraven vzorek obsahující směs hyaluronanů o molekulové hmotnosti 17 kDa a 1,46 MDa v poměru 70:30 o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ve vzorku o objemu 5 cm^3 . Způsob přípravy byl následovný: nejprve byly namíchány zásobní roztoky obou hyaluronanů o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Poté byly tyto roztoky smíchány v poměru 70:30 a míchány 15 min. Do vialky byla nejprve napipetována voda tak, aby po přidání určeného množství směsi hyaluronanů byl výsledný objem ve vialce 5 cm^3 . Poté byl přidán objem připravené směsi hyaluronanů potřebný k dosažení koncentrace $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve vzorku.

U všech takto připravených vzorků byla změřena viskozita.

3. 2. 1. 8. Mikroreologická měření

Mikroreologická měření byla provedena na všech směsích HyA použitých v této práci. Vzorky byly namíchány následovně: do vialek byla napipetována voda tak, aby po přidání směsi HyA a doplnění vzorku na objem 5 cm^3 byla koncentrace směsi $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Poté byl přidán konstantní objem zásobního roztoku směsi. Ke všem vzorkům byla přidána kapka roztoku mikročástic o velikosti $1 \mu\text{m}$ a vzorky byly důkladně promíchány na Vortexu. U takto připravených vzorků byla viskozita určena mikroreologicky.

3. 2. 2. Měření a vyhodnocení dat

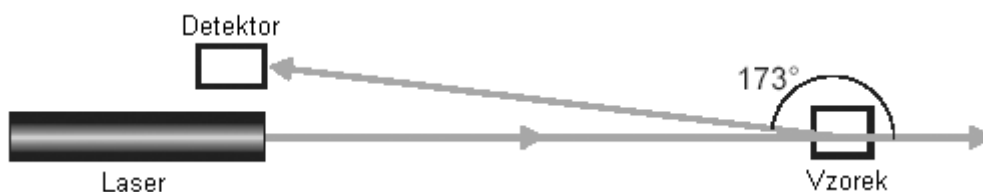
3. 2. 2. 1. Měření velikosti částic

Velikost částic ve vzorcích byla stanovována pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern metodou dynamického rozptylu světla(DLS). Principem měření je sledování fluktuací intenzity rozptýleného světla vzorkem. Jako zdroj světla je použit He–Ne laser o vlnové délce 632,8 nm. Částice ve vzorku se neustále pohybují na základě Brownova pohybu.

Důležitým rysem Brownova pohybu pro DLS je to, že se malé částice pohybují rychle a velké částice se pohybují pomaleji. Na základě sledování intenzity rozptýleného světla, se určí difúzní koeficient částic. Následně pomocí Stokes–Einsteinovy rovnice (7) lze přímo určit i jejich hydrodynamický poloměr.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (7)$$

Zetasizer Nano ZS detekuje světlo rozptýlené pod úhlem 173° (Obr. 11). Měření tohoto tzv. zpětného rozptylu světla přináší oproti klasické 90° detekci několik výhod. Je možné měřit i vyšší koncentrace vzorků, jelikož lze detektor fokusovat na světlo rozptýlené částicemi blízko stěny kyvety. Tak dochází k eliminaci tzv. efektu mnohonásobného rozptylu světla, při kterém je světlo rozptýlené jednou částicí rozptylováno dalšími částicemi a dochází tak ke zkreslení měření. Mimo jiné lze tímto nastavením omezit i efekt rozptylu světla velkých kontaminujících prachových částic, které převážně rozptylují v přímém směru. Naopak v případě vzorků s nižšími koncentracemi dojde k fokusaci detekce na světlo rozptýlené částicemi uprostřed kyvety.



Obr. 11 Schéma uspořádání měření velikosti částic

Brownův pohyb je významně ovlivňován teplotou. Z důvodů minimalizace tohoto vlivu byly vzorky před samotným měřením temperovány v přístroji na 25 °C. Systém využívá automatickou optiku, která sama zvolí optimální nastavení měřicí pozice v kyvetě i clony laseru podle koncentrace částic ve vzorku. Měření probíhalo v plastových spektroskopických kyvetách. Získaná data byla exportována z měřicího Zetasizer softwaru od firmy Malvern do programu MS Excel.

3. 2. 2. 2. Reologická měření

Zdánlivá viskozita vzorků byla měřena na přístroji AR – G2, od firmy TA Instruments. Před měřením vždy proběhla temperace vzorku na 25°C. Pro měření vzorků byla použita geometrická soustava deska–kužel s kuželem C60mm/1° (průměr kužele/úhel zkosení). Tokové vlastnosti roztoků byly měřeny pomocí metody steady–state. Každý bod tokové křivky byl změřen pro určité tečné napětí celkem dvakrát. V průběhu každého opakování nesměla odchylka překročit hranici 5% průměrné naměřené viskozity.

Výsledky reologických měření byly zpracovány v programu TA Data Analysis. Viskózní křivka zobrazená programem byla proložena vhodným reologickým modelem. Všechny vzorky se chovaly jako neneutonské kapaliny, jako vhodný model byl pro ně tedy vybrán Crossův reologický model (8), kde η_0 je limitní viskozita, η_∞ je asymptotická viskozita, $\dot{\gamma}$ je smyková rychlost, $\dot{\gamma}_c$ je kritická smyková rychlost. Byla odečítána viskozita η_0 , tedy limitní viskozita.

$$\eta = \eta_\infty + \frac{(\eta_0 - \eta_\infty)}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^m} \quad (8)$$

Odchylka definovaná vztahem (9) nesměla překročit hodnotu 20:

$$\frac{\left[\frac{(x_m - x_c)^2}{n - 2} \right]^{\frac{1}{2}}}{\text{rozsah}} \cdot 1000, \quad (9)$$

kde x_m značí naměřené hodnoty, x_c jsou vypočítané hodnoty, n značí počet dat v křivce a *rozsah* označuje rozdíl mezi maximální a minimální hodnotou měřených dat.

3. 2. 2. 3. Mikroreologická měření

Z předem připravených vzorků obsahujících mikroreologické částice definované velikosti bylo odebráno 12 μl na podložní sklíčko. Vzorek byl zakryt krycím sklíčkem a po rozprostření kapaliny pod krycím sklíčkem byl kolem krycího sklíčka aplikován silikon, aby se zabránilo vysychání vzorku. Vzorek byl umístěn pod objektiv optického mikroskopu značky NikonEclipse e200 a ponechán ustálit.

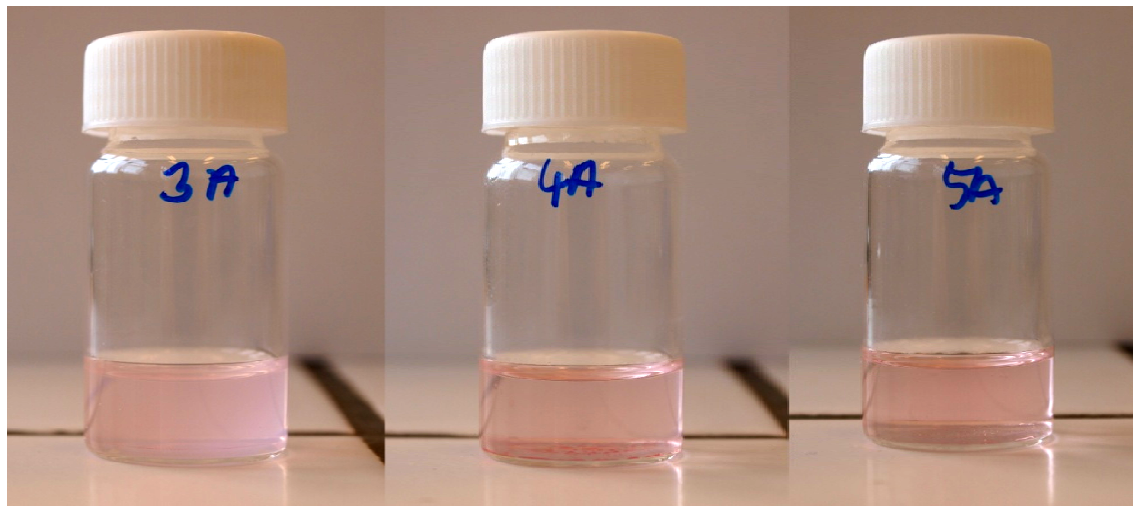
Po ustálení byl vzorek nasvícen baterkou zespodu a světlé body na tmavém pozadí byly pozorovány při čtyřicetinasobném zvětšení. Bylo pořízeno video pohybu částic ve vzorku, a to pomocí barevné CCD kamera Canon EOS 550D. Pro každý vzorek byla pořízena tři šestisekundová videa v různých místech vzorku.

Upravená videa byla otevřena v programu ImageJ, kde byla zmapována trajektorie jednotlivých částic pomocí speciálního pluginu ParticleDetector&Tracker. Trajektorie jednotlivých částic byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel, kde byly vypočítány hodnoty MSD pro 17 částic vzorku. Byl vynesena graf průměrné hodnoty MSD těchto 17 částic na čas. Z rovnice grafu byla získaná hodnota dosazena do rovnice 4 a byla vypočítána hodnota viskozity pro daný vzorek.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4. 1. Pozorování interakce samotné nízkomolekulární HyA s tenzidem

Na Obr. 12 jsou 3 vybrané vzorky reprezentující výsledek experimentu.



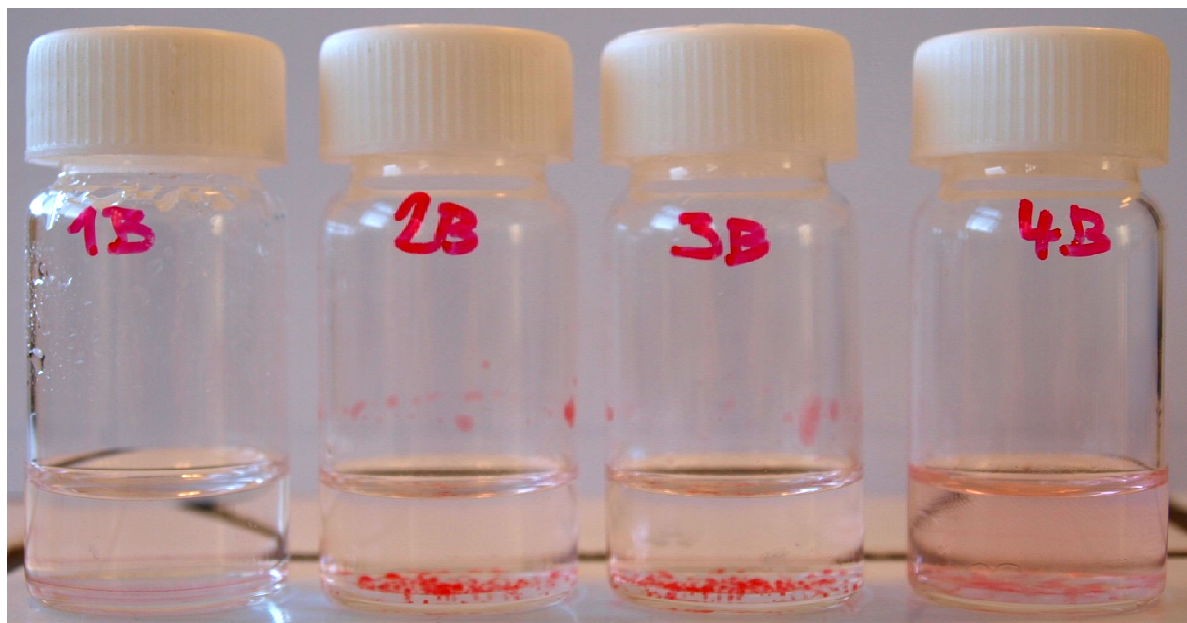
Obr. 12 Vybrané koncentrace CTAB ($0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Vzorky o koncentraci CTAB nižší než $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dostatečně nesolubilizovaly barvivo (červené tečky na dně vialky označené jako 4A nejsou „perličky“, ale nerozpuštěná Súdánová červeně) v ostatních koncentracích se netvořil ani gel, ani perličky.

Vzorek 3A byl zakalený, což ukazuje na přítomnost velkých koloidních částic rozptylujících světlo. Ostatní vzorky byly čiré, vzorek 3A se dá tedy považovat za jakýsi zlomový bod, kdy jsou nejlepší podmínky pro interakci tenzidu s nízkomolekulárním hyaluronanem.

4. 2. Pozorování interakcí směsí HyA s tenzidy

U většiny vzorků namíchaných v kapitole 3. 2. 1. 1. byl pozorován zvláštní fenomén vzniku nekontinuální separované fáze. Byly to částice jasně viditelné pouhým okem, různých tvarů, plavající ve vzorku. Příklad, jak tyto částice mohou vypadat je vyobrazen na Obr. 13. Jedna celá experimentální řada je vyfocena a popsána v příloze. Tyto částice byly růžově zbarveny Súdánovou červení, dá se tedy předpokládat, že jsou do jisté míry hydrofobní. Částice byly pojmenovány kvůli svému tvaru jako perličky či kuličky, později se však ukázalo, že mohou zaujímat v podstatě jakýkoliv tvar.



Obr. 13 Výsledky experimentu pro vzorky s iontovou silou $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a rostoucí koncentrací CTAB ($0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Použitá směs HyA byla $17 \text{ kDa} + 1,46 \text{ MDa}$ v poměru 70:30

4. 2. 1. Vznik perliček

4. 2. 1. 1. Vznik perliček s CTAB

Následující grafy zobrazují porovnání vzniku perliček ve vzorcích pro jednotlivé směsi. Jednotlivé grafy se liší pouze směsí hyaluronanů, která byla použita pro namíchání vzorků.

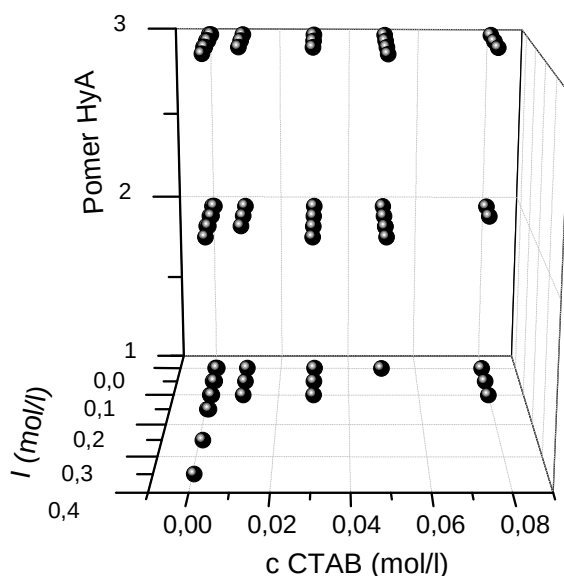
Na Obr. 14 je graf vzniku perliček ve vzorcích, kde byla použita nejnižší molekulová hmotnost HyA, a to 17 kDa . Perličky v těchto vzorcích vznikají při všech třech poměrech smíchaných hyaluronanů a při všech koncentracích CTAB. Hlavní roli v procesu vzniku perliček tedy hraje iontová síla, neboť při vysokých iontových silách (což je v tomto případě $0,1\text{--}0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) perličky už nevnikají. Je to dáno vysokým počtem nábojů, které odstíní elektrostatické interakce mezi záporně nabitými karboxyly hyaluronanu a kladně nabitým CTAB.

Za pozornost stojí spodní vrstva grafu, což je směs hyaluronanů v poměru 70:30 ($17 \text{ kDa}:1,46 \text{ MDa}$), kde při koncentraci CTAB $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází k vytvoření perliček pouze při nulové iontové síle. Dá se to vysvětlit různě. Buď k vytvoření perliček došlo, ale nejsou pouhým okem viditelné, jsou přítomny ve formě malého zákalu, nebo bylo všechno CTAB při dané iontové síle spotřebováno na tvorbu gelu (gelového lemu) v roztoku, nebo v roztoku plave pouhým okem neviditelný gel. Jelikož při ostatních poměrech směsi hyaluronanů se ale při této koncentraci CTAB a vyšších iontových silách perličky tvoří, je možné, že tam bylo prostě nedostatečné množství vysokomolekulárního hyaluronanu, který je potřebný k vytvoření perliček při vyšších iontových silách.

Obr. 15 znázorňuje tvorbu perliček pro směsi s hyaluronanem trochu vyšší molekulové hmotnosti, a to 73 kDa . Z grafu je patrné, že perličky se tvoří téměř v každé koncentraci CTAB a každé iontové síle. Iontová síla jde od $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až do $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což je iontová síla fyziologického roztoku, která slouží pro modelaci chování systému v organismu. Nejméně perliček se tvoří opět při použití směsi hyaluronanů, kde je nejvyšší zastoupení

nízkomolekulární HyA, vysoká koncentrace CTAB a vysoká iontová síla. Je možné, že v této kombinaci je iontová síla příliš vysoká a ruší interakce mezi směsí a CTAB a není tedy důvod k agregaci a vytvoření perliček. Může to být také tím, že ve směsi není obsaženo dostatečné množství vysokomolekulárního hyaluronanu na překonání této vysoké iontové síly a vytvoření perliček.

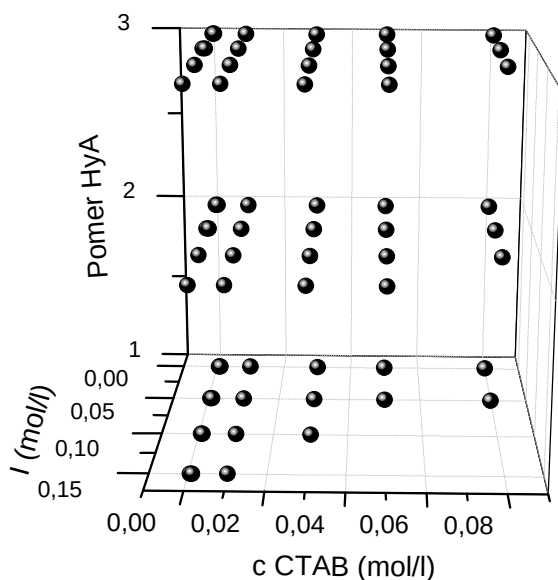
Molekulová hmotnost nízkomolekulární HyA ve směsi se postupně zvyšuje. Na Obr. 16 je vyobrazeno chování systému (vznik perliček) při použití směsi, kde jako nízkomolekulární HyA figuruje HyA 300 kDa. Za pozornost stojí body grafu při všech poměrech HyA (ve všech vrstvách), koncentraci CTAB $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nulové iontové síle. V těchto podmínkách se perličky netvoří. V těchto vzorcích se naopak vyskytuje patrný zákal (příloha), který značí, že jsou přítomny velké koloidní částice, které rozptylují světlo. Je to dáno zřejmě tím, že tato hodnota přibližně odpovídá koncentraci, kde se začínají tvořit micely (CMC). V tomto případě zřejmě vzniká nějaký systém s netypickým poměrem micel, indukovaných micel a hyaluronanu, který toto chování způsobuje. Stejně jako v předchozích případech, při nejmenším obsahu vysokomolekulárního hyaluronanu se perličky netvoří za vysokých iontových sil a vysokých koncentrací CTAB.



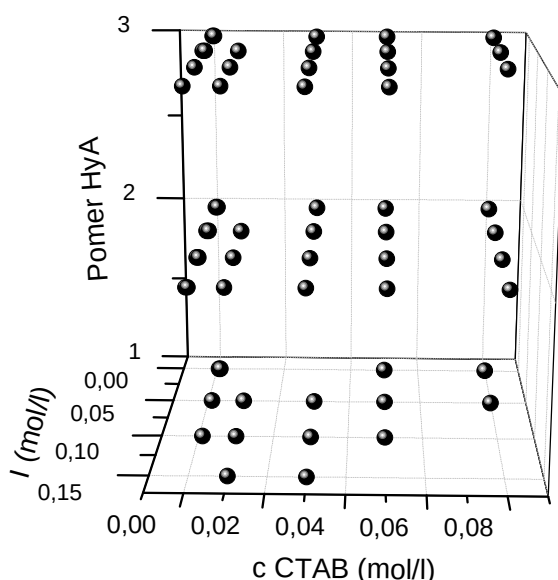
Obr. 14 Trojrozměrný graf znázorňující přítomnost perliček ve vzorcích o dané koncentraci CTAB a dané iontové síle. Vertikální osa reprezentuje poměr hyaluronanů o molekulových hmotnostech 17 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích, přičemž ve vrstvě 1(dole) je tento poměr 70:30, ve vrstvě 2 je 50:50 a ve vrstvě 3 je 30:70

Jako další molekulová hmotnost do směsi byla použita HyA 806 kDa. Nedá se už mluvit o nízkomolekulárním hyaluronanu, neboť tato molekulová hmotnost už se blíží 1,46 MDa, což je hyaluronan, který byl použit pro namíchání všech směsí. Znázornění vzniku perliček pro tuto směs lze vidět na Obr. 17. Perličky vznikají téměř ve všech koncentracích a iontových silách, kromě tří případů. Ve vrstvě jedna a dva perličky nevznikají při koncentraci CTAB $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a iontové síle $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jelikož je to přesně koncentrace odpovídající CMC a poměrně vysoká iontová síla, dá se předpokládat, že interakce mezi malým množstvím vznikajících micel a směsí HyA jsou odstíněny. Dalším případem je poměr složek směsi 50:50, koncentrace CTAB $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nulová iontová

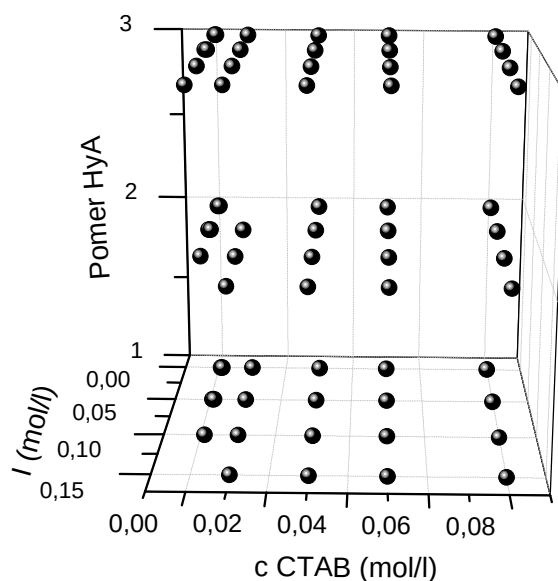
síla. V tomto případě byl také pozorován zákal. Zajímavé je, že perličky se začaly tvořit i při nejnižším poměru „nízkomolekulární“ HyA ve vysokých koncentracích CTAB a vyšších iontových silách. **Zřejmě tedy při vzniku perliček hraje roli délka řetězce hyaluronanu stejně jako jeho zastoupení v roztoku.** Při nižších molekulových hmotnostech je potřeba více hyaluronanu ve směsi na vytvoření perliček, zatímco při použití vyšší molekulové hmotnosti je i ten nejnižší poměr ve směsi dostačující.



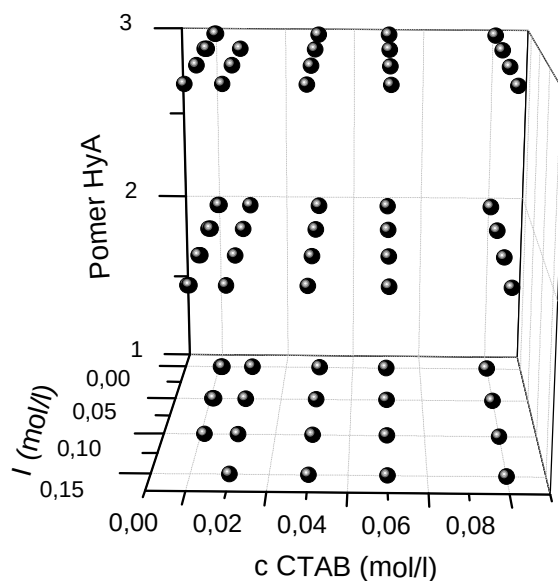
Obr. 15 Trojrozměrný graf znázorňující přítomnost perliček ve vzorcích o dané koncentraci CTAB a dané iontové síle. Vertikální osa reprezentuje poměr hyaluronanů o molekulových hmotnostech 73 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích, přičemž ve vrstvě 1 je tento poměr 70:30, ve vrstvě 2 je 50:50 a ve vrstvě 3 je 30:70



Obr. 16 Trojrozměrný graf znázorňující přítomnost perliček ve vzorcích o dané koncentraci CTAB a dané iontové síle. Vertikální osa reprezentuje poměr hyaluronanů o molekulových hmotnostech 300 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích, přičemž ve vrstvě 1 je tento poměr 70:30, ve vrstvě 2 je 50:50 a ve vrstvě 3 je 30:70



Obr. 17 Trojrozměrný graf znázorňující přítomnost perliček ve vzorcích o dané koncentraci CTAB a dané iontové síle. Vertikální osa reprezentuje poměr hyaluronanů o molekulových hmotnostech 806 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích, přičemž ve vrstvě 1 je tento poměr 70:30, ve vrstvě 2 je 50:50 a ve vrstvě 3 je 30:70



Obr. 18 Trojrozměrný graf znázorňující přítomnost perliček ve vzorcích o dané koncentraci CTAB a dané iontové síle. Vertikální osa reprezentuje poměr hyaluronanů o molekulových hmotnostech 1800 kDa a 1,46 MDa ve vzorcích, přičemž ve vrstvě 1 je tento poměr 70:30, ve vrstvě 2 je 50:50 a ve vrstvě 3 je 30:70

Obr. 18 znázorňuje vznik perliček pro směs namíchanou s dvěma vysokomolekulárními hyaluronany a to 1,46 MDa jako ve všech směsích spolu s HyA 1800 kDa. Zatímco doteď byla první HyA míchána pouze s hyaluronany o nižší molekulové hmotnosti, tady je to naopak. Na grafu lze vidět, že při rovnoměrném poměru obou hyaluronanů se perličky tvoří všude. Při vyšším zastoupení HyA 1800 kDa se perličky netvoří pouze ve vzorku s iontovou

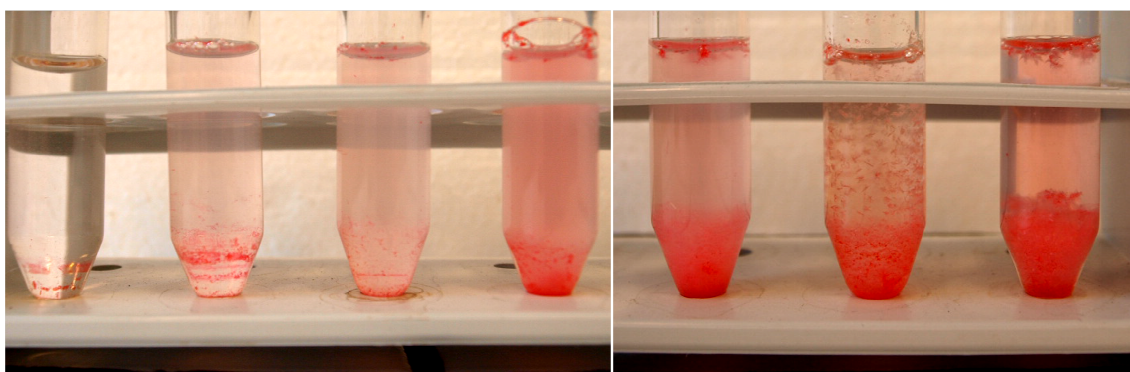
silou $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrací CTAB $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zřejmě je vytvořeno ještě málo micel na to, aby překonaly velkou iontovou sílu vzorku a interagovaly s tak dlouhým řetězcem. V ostatních poměrech je více pravděpodobné, že už vytvořené micely narazí na kratší řetězec. Ve vrstvě 3, kde je naopak nejméně HyA 1800 kDa a nejvíce 1,46 MDa nedochází k vytvoření perliček pro vzorek o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB a nulové iontové síle. I v tomto případě je ale patrný zákal, který značí přítomnost velkých koloidních částic. Je možné i to, že částice se vytvořily tak malé kvůli velmi vysoké viskozitě vzorku, která může stěžovat interakce.

4. 1. 1. 2. *Testování tvorby perliček s TWEEN 20*

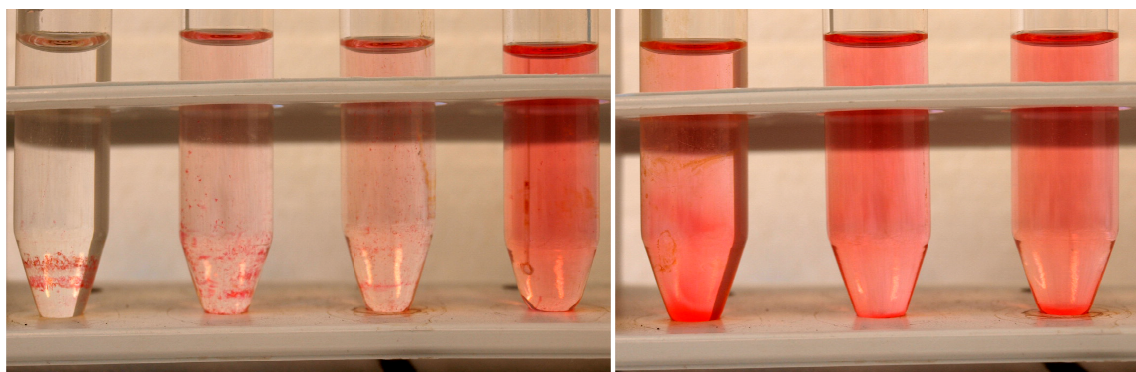
Při použití neionogenního tenzidu označovaného TWEEN 20 nedošlo ke vzniku perliček ani v jednom vzorku. Interakce, vedoucí ke vzniku perliček jsou tedy vyloženě elektrostatické povahy a dějí se pouze v přítomnosti kationaktivního tenzidu, jako je CTAB. Foto v příloze 3.

4. 3. Samovolná interakce CTAB se směsí HyA 17 kDa a Hya 1,4 MDa

Obr. 19 a Obr. 20 ukazují 2 experimentální řady, obě s rostoucí koncentrací CTAB, ovšem s rozdílnou iontovou silou, které byly po namíchání ponechány interagovat bez mechanického zásahu. První řada (s nulovou iontovou silou) se liší od druhé zakalením vzorků 2-5, přičemž u všech vzorků s výjimkou prvního můžeme pozorovat perličky plavoucí na hladině a od třetího vzorku i usazené na dně.



Obr. 19 Řada vzorků s rostoucí koncentrací CTAB (zleva) a směsí hyaluronanů při nulové iontové síle



Obr. 20 Řada vzorků s rostoucí koncentrací CTAB (zleva) a směsí hyaluronanů při iontové síle $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

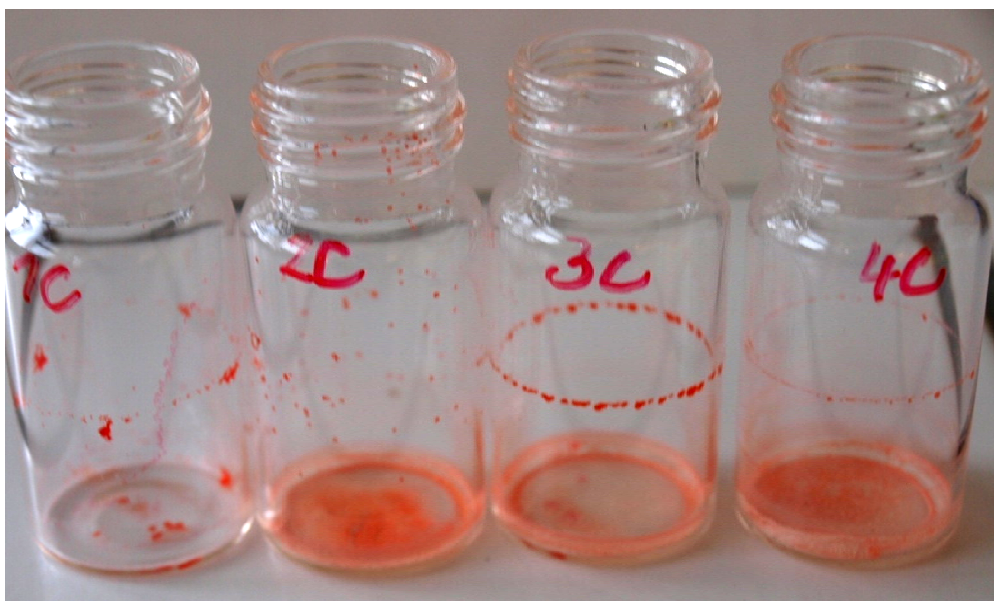
Bohužel, od čtvrtého vzorku došlo k vysrážení CTAB v roztoku, které leží na dně zkumavek spolu s perličkami, které jsou jím obalené. Toto zřejmě znamená, že došlo k vysrážení nadbytečného CTAB v roztoku a pro interakci se směsí hyaluronanů a solubilizaci barviva bylo použito jen omezené množství CTAB. To, že jsou perličky obalené vysráženým CTAB může znamenat, že jsou buď na povrchu hydrofobní, nebo že mají náboj.

Oproti tomu u vzorků s iontovou silou $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ žádné perličky nejsou (Obr. 20) a do třetího vzorku je barvivo nesolubilizované. Poté dochází k vzniku zákalu, který je na obrázku patrný a ukazuje na vznik gelu, který sedimentuje na dně zkumavek. Z toho se dá usuzovat, že iontová síla odstiňuje interakce mezi CTAB a směsí hyaluronanů vedoucí ke vzniku perliček a systém preferuje vznik gelu.

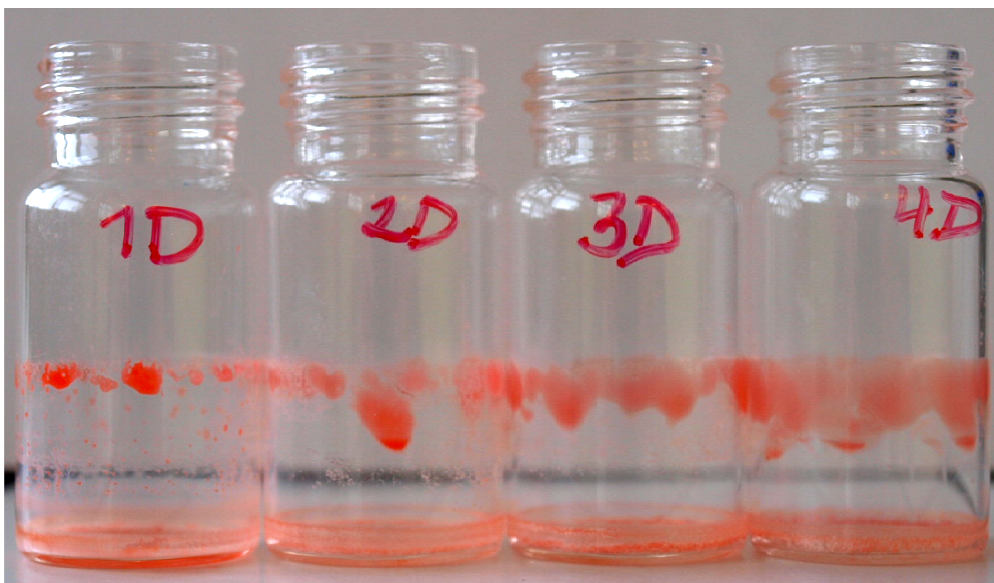
4. 4. Vysušení a rehydratování vzorků, zahřívání vzorků

Obr. 21 a Obr. 22 ukazují kompletně vysušené vzorky, na dně vialky, kde byl původně gel, zůstala slabá, místy popraskaná vrstva xerogelu. Po přidání vody (Obr. 23 a Obr. 24) tento xerogel znovu nabobtnal (na stěnách vialek) nebo se úplně rozpustil.

Zahříváním vzorků a jejich vařením došlo k zakoncentrování vzorků, což u vysokých koncentrací CTAB ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a vyšších iontových sil ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) vedlo ke vzniku velmi viskózního (netekoucího) gelu, který se zachoval i po zchlazení.



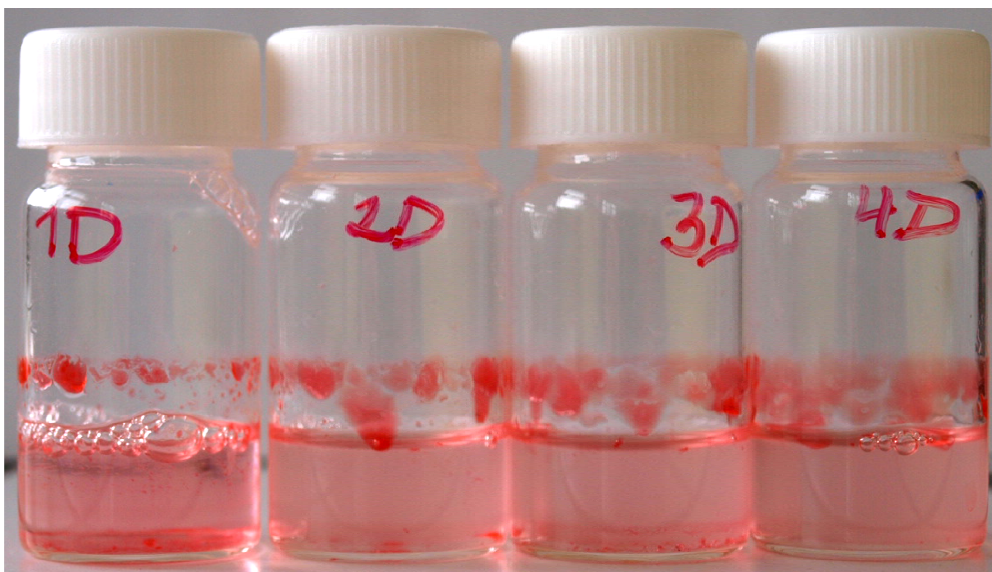
Obr. 21 Vzorky o konstantní koncentraci CTAB ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a rostoucí iontové síle ($0-0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po vysušení při 50°C



Obr. 22 Vzorky o konstantní koncentraci CTAB ($0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a rostoucí iontové síle ($0-0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po vysušení při 50°C



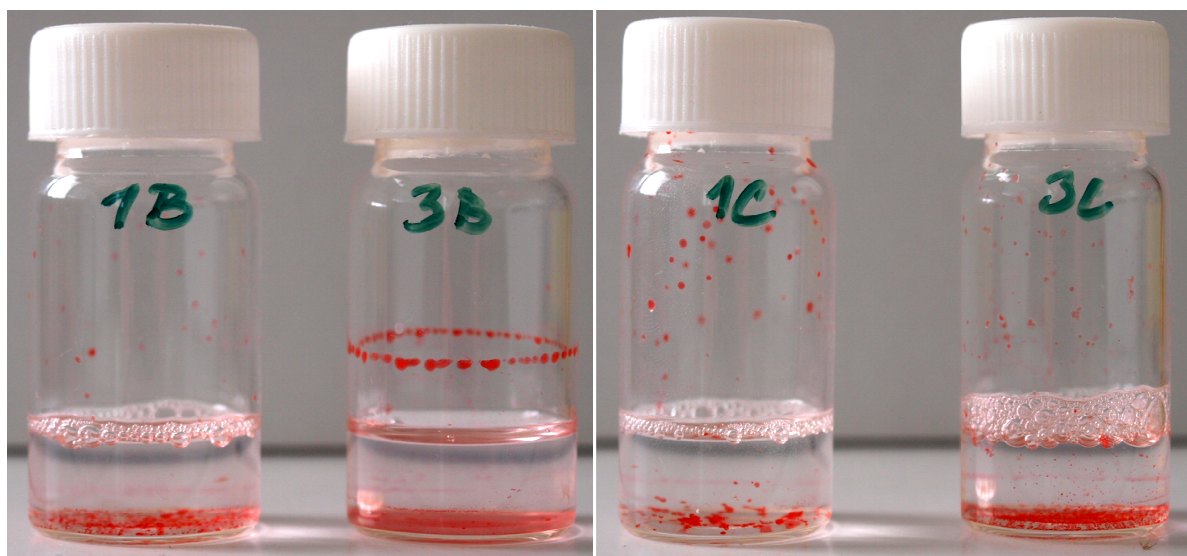
Obr. 23 Vzorky o konstantní koncentraci CTAB ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a rostoucí iontové síle ($0-0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po vysušení při 50°C a přidání 5 cm^3 vody. Foceno po dvou hodinách rozpouštění



Obr. 24 Vzorky o konstantní koncentraci CTAB ($0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a rostoucí iontové síle ($0-0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po vysušení při 50°C a přidání 5 cm^3 vody. Foceno po dvou hodinách rozpouštění

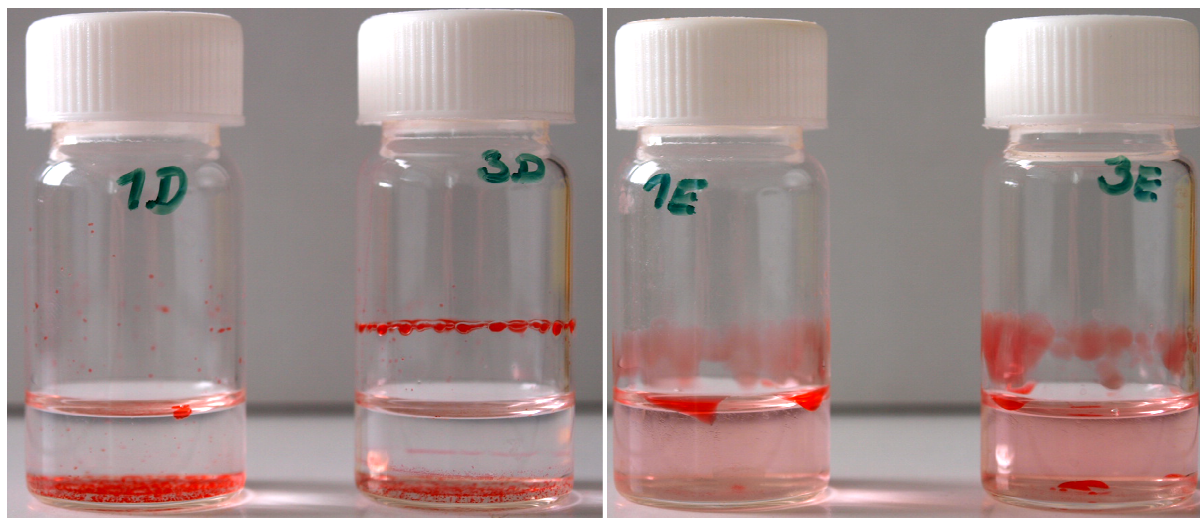
4. 5. Vliv přípravy na velikost a vzhled částic ve vzorcích

Porovnáním vzorků řady B, C a D s odlišným způsobem přípravy (Obr. 25, Obr. 26) je vidět, že vzorky namíchané s použitím směsi hyaluronanů, která vznikla smícháním jejich roztoků v daném poměru, vznikají menší částice, než při standardním způsobu přípravy.



Obr. 25 Porovnání výsledků experimentu se vzorky obsahujícími odlišně namíchanou směs hyaluronanů. Směs hyaluronanů ve vzorcích označených jako 1 byla namíchána standardně navážením hyaluronanů v daném poměru a rozmícháním s vodou, vzorky označené jako 3 byly namíchány s použitím směsi vzniklé smícháním dvou roztoků v daném poměru. Písmena označují koncentrace CTAB a iontovou sílu ve vzorcích dle tabulky (Tabulka 3)

U vzorku s gelem (řada E) je vidět větší množství gelu na dně vialky. Je tedy možné, že při nestandardním způsobu přípravy řetězce hyaluronanů nemají čas se do sebe proplést a částice jsou tak menší. I viskozita nestandardně připraveného roztoku je menší (oddíl 4. 5. 2).



Obr. 26 Porovnání výsledků experimentu se vzorky obsahujícími odlišně namíchanou směs hyaluronanů. Směs hyaluronanů ve vzorcích označených jako 1 byla namíchána standardně navážením hyaluronanů v daném poměru a rozmícháním s vodou, vzorky označené jako 3 byly namíchány s použitím směsi vzniklé smícháním dvou roztoků v daném poměru. Písmena označují koncentrace CTAB a iontovou sílu ve vzorcích dle tabulky (Tabulka 3)

4. 5. Reologická a mikroreologická měření

4. 5. 1. Reologie směsí

V tabulce (Tabulka 4) jsou uvedeny hodnoty, ze kterých byly vytvořeny následující grafy. Zatímco u hodnot viskozity získaných reologicky je uveden pouze průměr, neboť se téměř nelišily, hodnoty získané mikroreologicky jsou uvedeny všechny, neboť mezi nimi byly opravdu velké rozdíly, což je důvodem, proč u těchto hodnot nejsou znázorněny chybové úsečky.

Tabulka 3 Označení vzorků

písmeno	$c_{\text{CTAB}} (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$	$I (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$
B	0,0005	0,1
C	0,001	0,05
D	0,001	0,1
E	0,01	0,05

Na Obr. 27, Obr. 28, Obr. 29, Obr. 30, Obr. 31 jsou vyobrazeny závislosti viskozity pěti směsí používaných v této práci na poměru, ve kterém byly jednotlivé složky smíchány. Grafy na těchto obrázcích ukazují také porovnání hodnot získaných reologicky a mikroreologicky. Hlavní rozdíl těchto dvou metod spočívá v tom, že zatímco reologie měří viskozitu celého

objemu vzorku, mikrореologie měří viskozitu lokální, tzn. právě v tom místě na podložním sklíčku, na které je zaměřen objektiv mikroskopu.

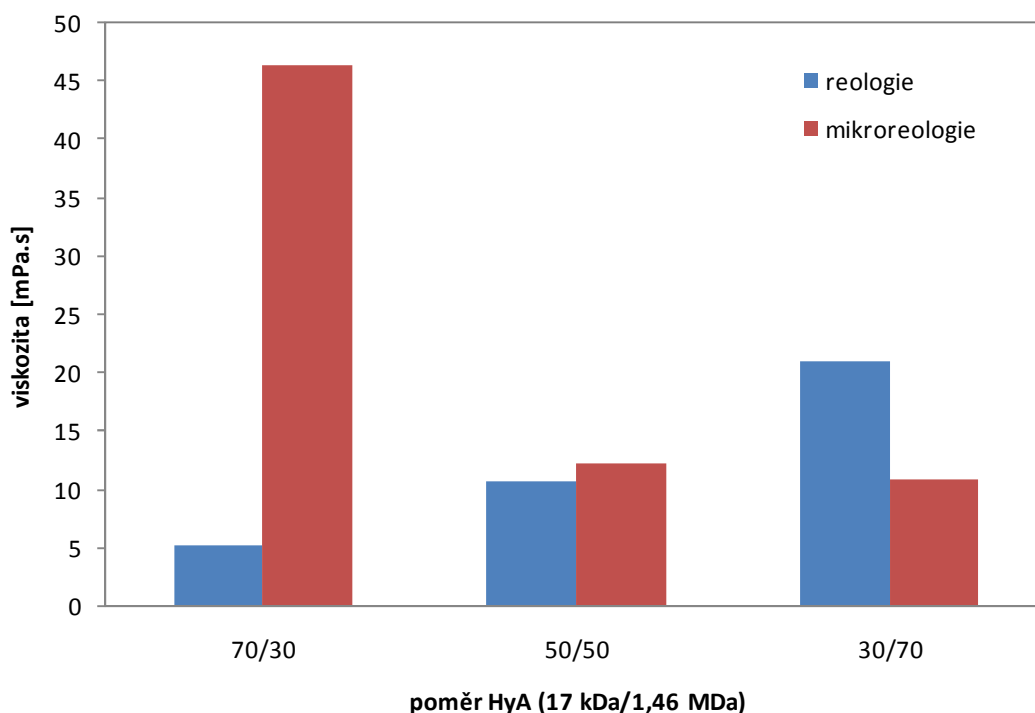
Reologicky získané hodnoty na Obr. 27 a Obr. 28 vykazují nárůst viskozity vzorku společně s tím, jak se zvyšuje podíl vysokomolekulárního hyaluronanu. Oproti tomu na Obr. 29 viskozita překvapivě klesá zároveň se zvyšováním podílu vysokomolekulárního hyaluronanu ve vzorku. Může to být způsobeno tím, že při nejvyšší koncentraci nízkomolekulárního hyaluronanu se oba řetězce pevně zapletou do sebe a tím způsobí vysokou viskozitu a při jiných poměrech prostě jen plavou vedle sebe v roztoku.

Na Obr. 30 je vidět, že nejvyšší viskozita je při nejvyšším poměru HyA 806 kDa a nejnižší, pokud jsou oba hyaluronany zastoupeny stejně. Je to překvapivé, protože pokud by viskozity byly aditivní, jak tvrdí článek [58], měla by logicky mít nejvyšší viskozitu směs třetí, neboť je v ní nejvíce vysokomolekulárního hyaluronanu. Zřejmě se to opět dá přisuzovat větší propletenosti řetězců v prvním případě.

Reologicky získané viskozity směsi dvou vysokomolekulárních hyaluronanů o molekulových hmotnostech 1800 kDa a 1,46 MDa (Obr. 31) ukazují nejvyšší hodnotu viskozity pro směs, kde jsou oba hyaluronany zastoupeny stejným dílem. Zřejmě toto je tedy ideální poměr, kde dochází k mírnému zaplétání řetězců a zvýšení viskozity. Tato viskozita je ale jen o něco větší, než ve směsi s vyšším podílem HyA 1800 kDa, která by správně měla mít nejvyšší viskozitu. Nejnižší viskozitu má směs s nejvyšším podílem HyA 1,46 MDa, což by tak být i mělo, pokud by míchání hyaluronanů podléhalo aditivnímu pravidlu.

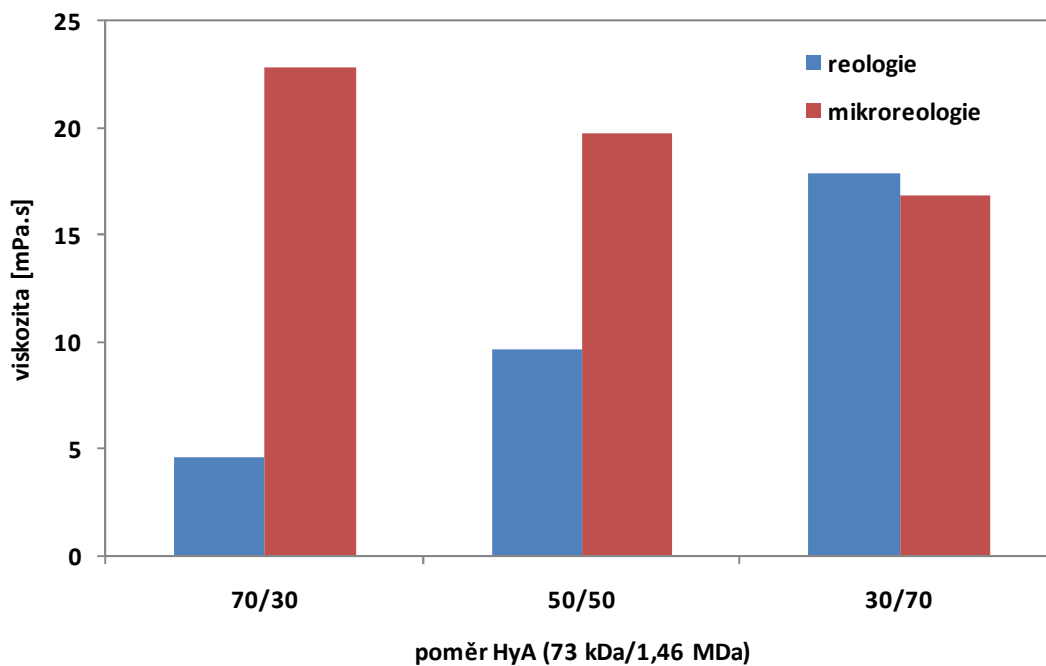
Tabulka 4 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikrореologicky

směs	poměr	limitní viskozita [mPa·s]			
		reologie		mikrореologie	
		průměr	odchylka	1. měření	2. měření
17 kDa+1,46 MDa	70/30	5,16	0,50	8,94	46,38
	50/50	10,72	0,10	18,06	12,26
	30/70	21,05	0,60	61,29	10,86
73 kDa+1,46 MDa	70/30	4,58	0,95	22,88	11,67
	50/50	9,63	0,55	19,73	6,09
	30/70	17,91	0,30	16,82	–
300 kDa+1,46 MDa	70/30	25,77	0,03	10,04	11,00
	50/50	19,78	0,72	11,44	6,89
	30/70	10,56	0,11	11,44	9,98
750–1000 kDa+1,46 MDa	70/30	32,69	0,25	16,99	37,31
	50/50	18,53	2,55	10,04	6,04
	30/70	25,47	2,06	28,60	11,00
1750–2000 kDa+1,46 MDa	70/30	40,89	0,59	33,65	27,68
	50/50	43,55	0,96	8,89	19,07
	30/70	33,06	0,79	4,10	9,81

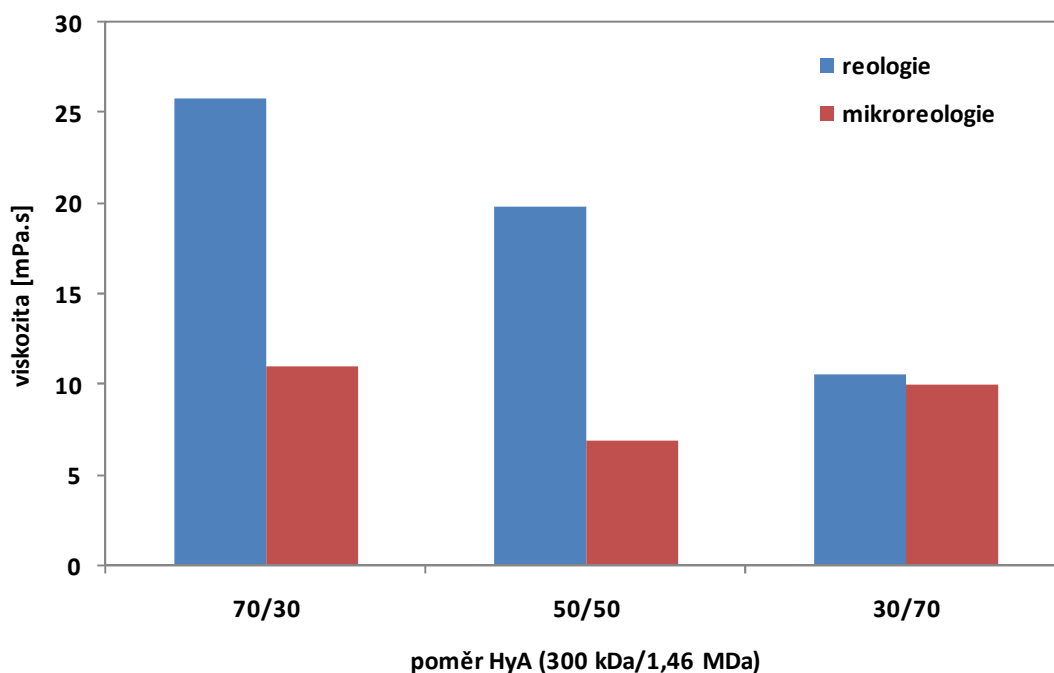


Obr. 27 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikroreologicky pro směs HyA 17 kDa a 1,46 MDa v různých poměrech

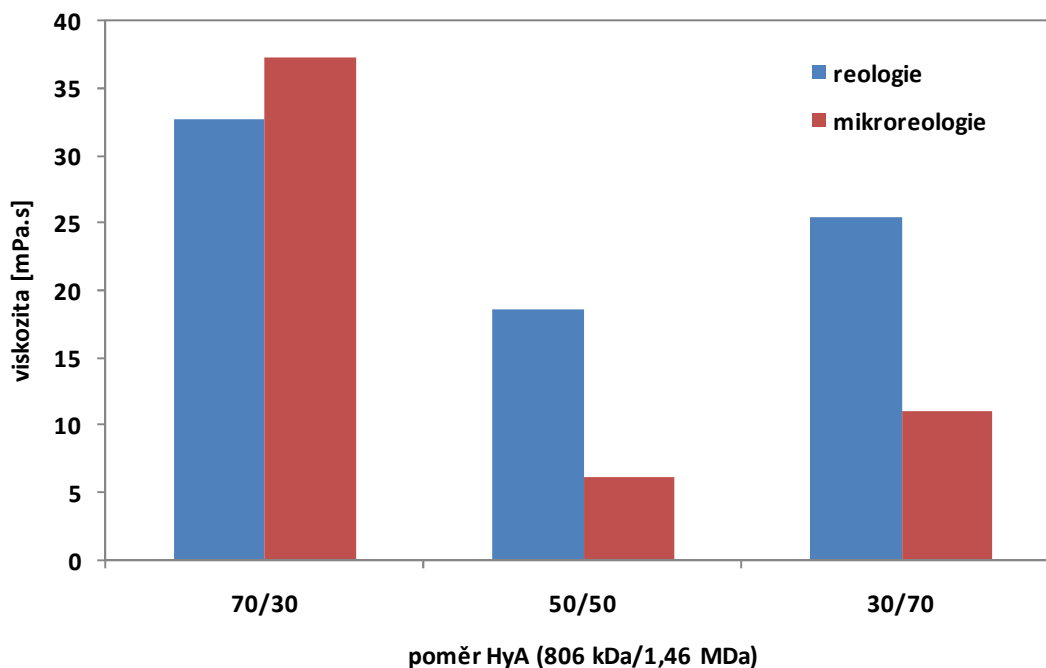
Pokud se podíváme na data získaná mikroreologicky, lze zkonstatovat, že v některých případech se viskozita značně liší od hodnot naměřených reologicky. Toto je způsobeno především samotnou podstatou mikroreologie jako měřící techniky, která se soustřeďuje pouze na určitou část vzorku a ne na vzorek jako celek. Směsi dvou různých molekulových hmotností hyaluronanů jsou velmi složitý systém, který zvoleným postupem přípravy nebylo možné promíchat ani homogenizovat tak, aby se ve vzorcích nevyskytovaly oblasti s různou viskozitou. Protože mikroreologická data byla získávána z průměrných hodnot 17 částic z 3 míst vzorku, mohlo se stát, že určitý zlomek částic se pohyboval ve vysokomolekulárním hyaluronanu, zatímco ostatní v nízkomolekulárním, a vypočítané hodnoty viskozit tedy byly pouze lokální. Proto nemohou odpovídat reologicky naměřeným hodnotám z celého roztoku. Vzorky měřené pomocí mikroreologie se tak dají rozdělit na stabilní, jejichž hodnoty viskozity se moc neliší, a vzorky heterogenní, jejichž viskozita se liší hodně.



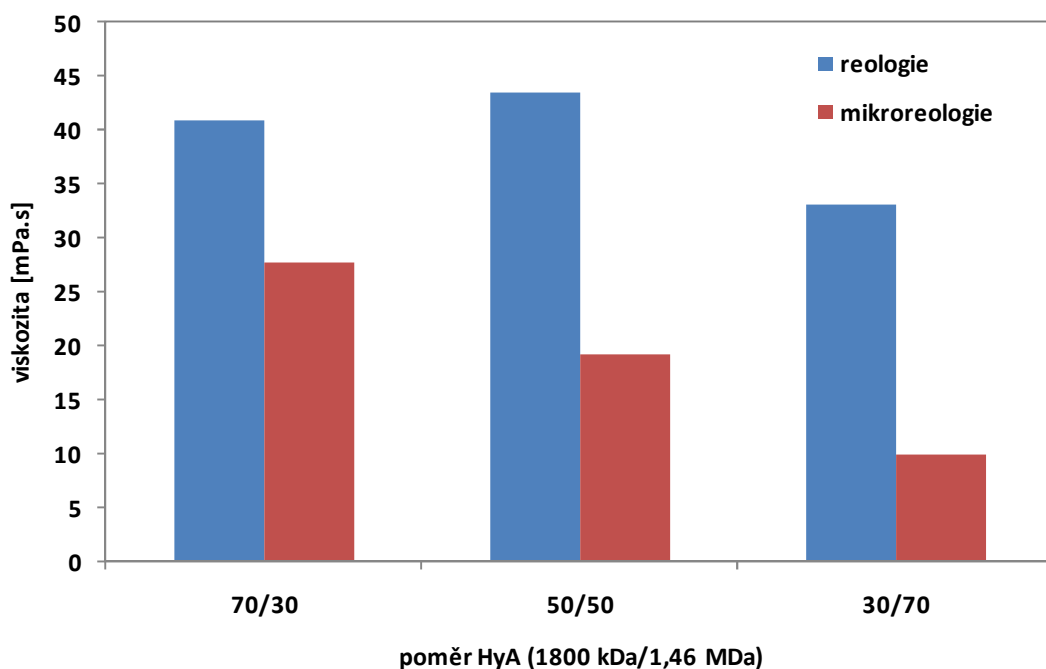
Obr. 28 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikroreologicky pro směs HyA 73 kDa a 1,46 MDa v různých poměrech



Obr. 29 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikroreologicky pro směs HyA 300 kDa a 1,46 MDa v různých poměrech



Obr. 30 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikroreologicky pro směs HyA 806 kDa a 1,46 MDa v různých poměrech



Obr. 31 Porovnání hodnot viskozity získaných reologicky a mikroreologicky pro směs HyA 1800 kDa a 1,46 MDa v různých poměrech

4. 5. 2. Vliv přípravy a iontové síly na reologii směsi

Reologickými měřeními bylo zjištěno, že směs hyaluronanů obsahující nejvyšší procento molekulové hmotnosti 1,46 MDa má nejvyšší viskozitu a naopak (Tabulka 5). S rostoucí iontovou silou se viskozita vzorku snižuje, protože přidaná sůl odlišuje elektrostatické interakce mezi hyaluronany a CTAB.

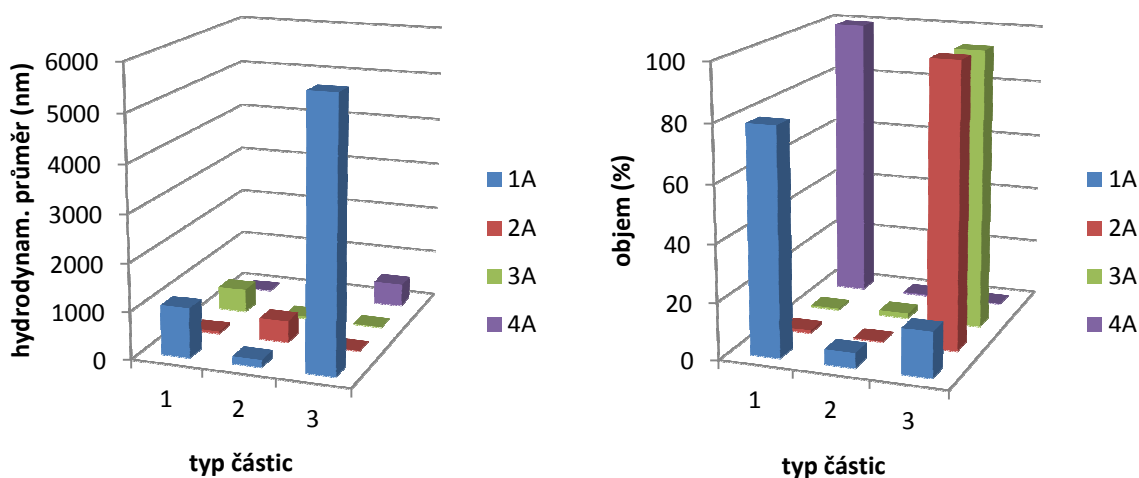
Směs hyaluronanů ve vzorku označeném v poznámce jako „příprava“ byla připravena odlišným způsobem než ostatní směsi, popsáním v oddílu 3. 2. 2. 2. Vzorek s touto směsí vykazuje menší viskozitu než vzorek připravený standartním způsobem, způsob přípravy tedy může ovlivňovat vlastnosti systému, např. velikost perliček, jejich tvar, viskozitu, viskozitu gelu apod.

Tabulka 5 Porovnání viskozity vzorků s různým poměrem hyaluronanů ve směsi

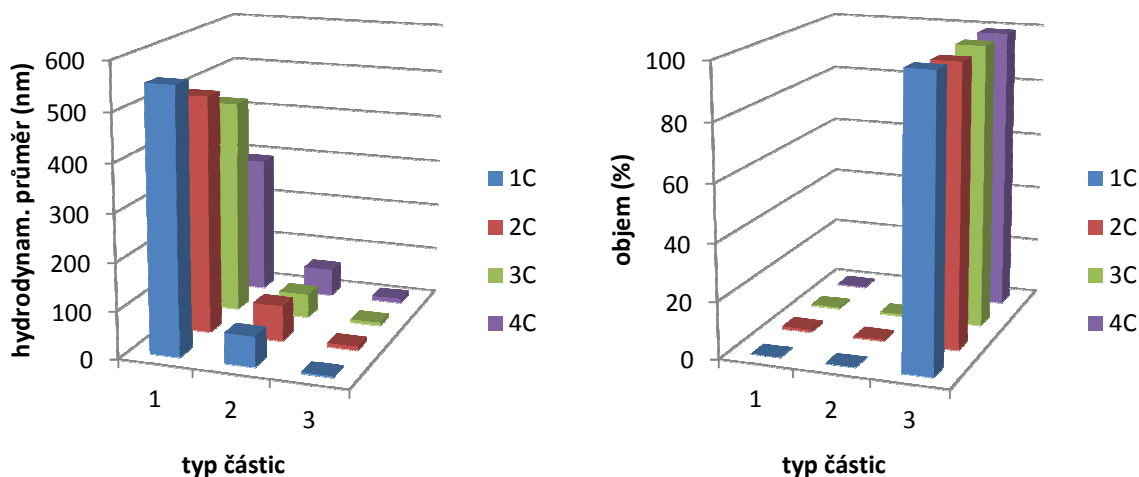
I (mol·dm ⁻³)	HyA 17 kDa (%)	HyA 1,46 Mda (%)	η_0 (mPa·s)	Pozn.
0	30	70	23,40	
0	50	50	11,49	
0	70	30	7,03	
0	70	30	5,84	příprava
0,05	70	30	1,76	
0,01	70	30	1,67	
0,15	70	30	1,53	

4. 6. Měření velikosti částic

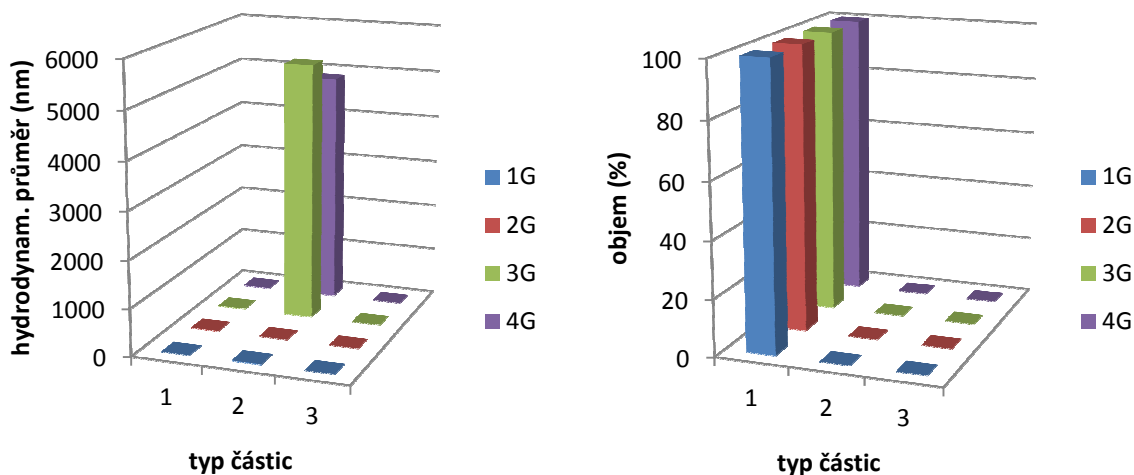
Na Obr. 32, Obr. 33, Obr. 34 jsou znázorněny grafy pro hydrodynamický průměr (d_h) částic ve vzorcích, měřený na přístroji Zetasizer NanoZS od firmy Malvern. Vzorky označené jako 1–4 reprezentují iontovou sílu (0, 0,05, 0,1 a 0,15 mol·dm⁻³). Vzorky označené písmenem reprezentují koncentraci CTAB (A=0 mol·dm⁻³, C=0,001 mol·dm⁻³, G=0,08 mol·dm⁻³). Tyto grafy jsou pouze výběr mezi koncentracemi 0–0,08 mol·dm⁻³, které ale všechny vykazují podobný trend, a to, že nejmenší částice zabírají ve většině vzorků největší objem.



Obr. 32 Porovnání velikosti částic a jejich objemu v roztoku pro vzorky 1A–4A



Obr. 33 Porovnání velikosti částic a jejich objemu v roztoku pro vzorky 1C–4C



Obr. 34 Porovnání velikosti částic a jejich objemu v roztoku pro vzorky 1G–4G

Vzorky obecně obsahují 3 typy částic: částice s d_h do 100 nm, částice s d_h do 1000 nm a částice větší. To by ukazovalo na 3 složky systému: CTAB, HyA 17 kDa a HyA 1,46 MDa. Nejmenší částice budou zřejmě volné micely, ty větší budou tvořeny převážně z kratšího řetězce HyA a největší z dlouhého řetězce HyA. Na Obr. 32 jsou znázorněny grafy pro vzorek neobsahující žádné CTAB. Tyto grafy ukazují, že nejméně je naopak nejmenších částic, neboť micely tam žádné nejsou. Přesto objem nejmenších částic v roztoku dosahuje 5,3 %, jsou to ale částice s velikostí $d_h = 154,1$ nm, může se tedy jednat o nějaké znečištění nebo o krátký řetězec HyA. Ostatní částice v roztoku mají d_h větší než 1000 nm.

Ostatní vzorky mají největší objem částic s d_h do 100 nm. Toto dokazuje nevhodnost použití této metody měření pro daný systém, vzorky jsou příliš polydisperzní a částice ve vzorcích příliš velké, za hranici měřitelnosti daného přístroje. Filtrací hrozí odfiltrování složek systému, který je zkoumán a tím pádem neužitečnost a nepoužitelnost měření.

5 ZÁVĚR

Zadané cíle diplomové práce byly splněny. Cílem této práce bylo prozkoumat interakci tenzidů se směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti. Nejprve byla provedena literární rešerše na toto téma, kde bylo zjištěno, že problematikou interakcí tenzidu s hyaluronanem, resp. polysacharidy, resp. polyelektrolyty se zabývá nespočet různých autorů, ovšem interakcí směsi hyaluronanů s tenzidy se ale v odborných člancích nezabýval zatím nikdo.

Byl tedy navržen počáteční experiment, a to smíchat dvě velmi rozdílné molekulové hmotnosti hyaluronanu, v tomto případě 17 kDa a 1,46 MDa s kationaktivním CTAB a pozorovat, jak tento systém interaguje. Do systému bylo přidáno hydrofobní barvivo a pomocí něj bylo zjištěno, že tento systém tvoří jakési kuličky či perličky, které jsou mezi sebou navzájem separované, mají různý tvar a velikost, plavou v roztoku a jsou nějakým způsobem hydrofobní, protože byly obarvené. Zároveň s kuličkami tvoří systém při vyšších koncentracích CTAB i gel.

Počáteční experiment vedl k myšlence prozkoumat chování systému pouze nízkomolekulárního hyaluronanu s tenzidem, další experiment byl tedy zaměřen na to, zda se tvoří kuličky i se samotným nízkomolekulárním hyaluronanem. Tato myšlenka byla vyvrácena a bylo zjištěno, že k tvorbě kuliček je třeba směs hyaluronanů o různých molekulových hmotnostech společně s tenzidem.

Další kroky tedy vedli k charakterizaci podmínek, za jakých kuličky vznikají, konkrétně tedy za jakých koncentrací CTAB, s použitím jakých iontových sil a při jaké kombinaci molekulových hmotností. Pro tento účel byly navrženy experimentální řady směsí hyaluronanů o různých molekulových hmotnostech. V těchto směsích byl vždy obsažen HyA o molekulové hmotnosti 1,46 MDa, který reprezentoval vysokomolekulární hyaluronan, v kombinaci s jednou z následujících pěti molekulových hmotností HyA: 17 kDa, 73 kDa, 300 kDa, 806 kDa, 1 800 kDa. tyto směsi byly míchány vždy v poměru 30:70, 50:50 a 70:30, přičemž druhé číslo je vždy obsah HyA 1,46 MDa. Koncentrace CTAB v experimentálních řadách se pohybovala mezi $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $0,08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a rozsah iontové síly pro každou koncentraci CTAB byl $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Podrobné výsledky experimentů jsou uvedeny v sekci 4.1.1. Obecně se dá říct, že při použití vyššího poměru nízkomolekulárního (17 kDa a 73 kDa) hyaluronanu perličky nevznikají při vyšší koncentraci CTAB a vyšší iontové síle. Pro vznik perliček při těchto podmínkách tedy zřejmě hraje důležitou roli délka řetězce HyA, neboť při použití vyšších molekulových hmotností v těchto podmínkách už perličky vznikají. Jako další víceméně charakteristický rys chování těchto systémů je vznik zákalu ve většině vzorků o nulové iontové síle a koncentracích CTAB $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento zákal značí přítomnost koloidních částic dost velkých na to, aby rozptylovaly světlo, ale malých na to, aby byly viditelné pouhým okem. Zřejmě v koncentracích okolo CMC a těsně nad CMC dochází ke specifickým interakcím, které vedou ke vzniku tak malých částic. Pro přípravu stejných vzorků byl také použit neionogenní tenzid TWEEN 20. Při použití tohoto tenzidu nedošlo ke vzniku perliček, pouze k solubilizaci barviva.

Důležitým bodem výzkumu bylo zjistit, nakolik je vznik perliček mechanickou záležitostí, např. jestli to není pouze důsledek dvanáctihodinového třepání na třepáče. Proto byly namíchány dvě řady s rostoucí koncentrací CTAB a směsí HyA 17 kDa + 1,46 MDa v poměru 70:30, přičemž jedna měla nulovou iontovou sílu a jedna měla iontovou sílu $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tyto řady byly namíchány do zkumavek a ponechány samovolně interagovat

bez mechanického zásahu. Dá se konstatovat, že při nulové iontové síle dochází k vytvoření perliček i bez mechanického zásahu, zatímco při iontové síle $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ systém preferuje vznik mikrogelu.

Hotový systém s perličkami a mikrogelem byl dále podroben zkouškám chování a stability, např. byl ponechán v klidu stát a po týdnu nebyly pozorovány žádné výrazné změny, nebo byl vysušen a rehydratován. Po vysušení vznikl xerogel na dně vialky, který místy popraskal, po rehydratování došlo k zpětnému nabotnutí xerogelu, popř. úplnému rozpuštění. Vzorky s perličkami a mikrogelem byly také zahřívány, dokonce vařeny (rozsah teplot $20\text{--}100^\circ\text{C}$), ovšem nebyla pozorována žádná změna struktury perliček, pouze došlo k zakoncentrování roztoku. U vzorků s vysokým obsahem CTAB tak došlo k vytvoření gelu.

Dále byl prozkoumán vliv přípravy vzorků na velikost a vzhled částic ve vzorcích. Zejména bylo bráno na zřetel, zdali se používá již předem připravená směs HyA, nebo se roztoky dvou různých HyA smíchají až těsně před namícháním vzorků. Výsledky experimentu ukazují, že při použití předem smíchané směsi hyaluronanů vznikají větší částice než při použití směsi vzniklé smícháním dvou roztoků těsně před přípravou vzorků. Příprava směsi, resp. vzorků tak hraje důležitou roli jak pro velikost a vzhled částic, tak pro viskozitu vzorku, kterou jsme se zabývali v následujícím experimentu.

Viskozita všech směsí použitých v této práci byla změřena jak reologicky, tak mikrereologicky. Ve výsledných hodnotách viskozity vzorků se obě metody značně liší, zejména proto že reologie se zabývá vzorkem jako celkem, zatímco mikrereologie měří viskozitu pouze lokálně, v určitých částech vzorku. Těmito měřeními a zejména jejich porovnáním bylo zjištěno, že směsi hyaluronanů nejsou nikdy zcela homogenizovány a dostatečně promíchány tak, aby v každé části vzorku byla stejná viskozita. Také bylo zjištěno, že ani viskozita celého roztoku měřená reologicky není aditivní a předvídatelná, což by podle článku [59] měla být. Může to být způsobeno např. odlišným způsobem přípravy vzorků, stářím vzorků, nedostatečným promícháním vzorků, jinými podmínkami měření atd.

Protože částice ve vzorcích charakterizuje především jejich tvar a velikost, bylo provedeno také měření DLS na přístroji Zetasizer od firmy Malvern. Měření bylo dosti problematické a to především z toho důvodu, že částice ve vzorcích, které nás zajímají, jsou viditelné pouhým okem a tudíž pro toto měření moc velké. Byly tedy odfiltrovány a měřen byl pouze zbytek roztoku. Z měření bylo zjištěno, že roztoky obsahují částice tří velikostí odpovídající micelám, krátkým řetězcům HyA a dlouhým řetězcům HyA. Po spotřebování molekul HyA na tvorbu perliček tak ty ostatní zřejmě jen tak plavou v roztoku společně s volnými micelami. Bylo ale zkonstatováno, že pro tento systém není DLS měření na použitém přístroji vůbec vhodné, neboť vzorky jsou příliš polydisperzní a obsahují obrovské částice na hranici měřitelnosti systému. Je tedy nutná filtrace, kterou ale můžeme odstranit i žádoucí složky systému.

Závěrem je nutno říci, že směsi hyaluronanů o různých molekulových hmotnostech jsou velmi složitý systém, který nelze jednoduše charakterizovat, neboť v něm hrají roli jak elektrostatické, tak hydrofobní interakce, dále stérické interakce, vzájemná mísitelnost a v neposlední řadě také rozdílná viskozita různých molekulových hmotností. Pokud k tomuto už tak dost složitému systému přidáme ještě tenzid, vzniká systém, který se za každých podmínek může chovat jinak. Proto si myslím, že do budoucna bude důležité určit, z čeho konkrétně jsou perličky složeny, v jakém uspořádání a v jakém poměru, což nám dá alespoň nějakou představu, jak by se tento systém mohl za různých konkrétních podmínek (např. v lidském těle) chovat.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MEYER, K. a J. W. J. PALMER. Polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*. 1934, č. 107, s. 629-634.
- [2] HARDINGHAM, T. E. a A. J. FOSANG. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB Journal*. 1992, č. 6(3), s. 861-870.
- [3] ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER. *Molecular Biology of the Cell*. 5. vyd. New York: Garland Publishing, 2007. ISBN 9780815341055.
- [4] MCDONALD, J. A. Extracellular matrix assembly. *Annual Review of Cell Biology*. 1988, č. 4, s. 183-207.
- [5] LAURENT, T. C. a J. R. E. FRASER. Hyaluronan. *FASEB Journal*. 1992, č. 6, s. 404-2397.
- [6] HAY, E. D. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. 2. vyd. New York: Plenum Press, 1991. ISBN 0-306-43951-4.
- [7] BALAZS, E. A.; BIOTRICS INC. *Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof* [patent]. USA. Patent, US4141973. Uděleno 27. 2. 1979
- [8] LAPČÍK, L., S. DE SMEDT, J. DEMEESTER a P. CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical reviews*. 1998, č. 8, 2663-2684.
- [9] STERN, R., A. A. ASARI a K. N. SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*. 2006, č. 85, s. 699-715.
- [10] STAUB, N. C.; TAYLOR A. E.: *Edema*. 1. New York: Raven Press, s. 189-228. ISBN 0890047251.
- [11] DEED, R., P. ROONEY, P. KUMAR, J. D. NORTON, J. SMITH, A. J. FREEMONT a S. KUMAR. Early response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *International Journal of Cancer*. 1997, č. 71, s. 251-256.
- [12] DEMLMAGE, J. M., D. R. POWARS, P. K. JAYNES a S. E. ALLERTON. The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1986, č. 16, s. 303-310.
- [13] DE LA MOTTE, C. A., V. C. HASCALL, J. DRAZBA, S. K. BANDYOPADHYAY a S. A. STRONG. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *American Journal of Pathology*. 2003, č. 163, s. 121-133.
- [14] KUJAWA, M. J., C. A. CARRINO a A. I. CAPLAN. Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size-dependent stimulation of chondrogenic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture. *Developmental Biology*. 1986, č. 114, s. 519-528.
- [15] KUJAWA, M. J. a A. I. CAPLAN. Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures. *Developmental Biology*. 1986, s. 504-518.
- [16] FROST, S. J. a P. H. WEIGEL. Binding of hyaluronic acid to mammalian fibrinogens. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990, č. 1034, s. 39-45.
- [17] NOBLE, P. W., F. R. LAKE, P. M. HENSON a D. W. RICHIES. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis

- factor- α -dependent mechanism in murine macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993, č. 91, s. 2368–2377.
- [18] WEST, D. C., I. N. HAMPSON, F. ARNOLD a S. KUMAR. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. č. 228, s. 1324–1326.
- [19] ROONEY, P., M. WANG, KUMAR a S. KUMAR. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 1993, č. 105, 213–218.
- [20] LOKESHWAR, V. B., C. OEBEK, M. S. SOLOWAY a N. L. BLOCK. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Research*. 1997, č. 57, s. 773–777.
- [21] SCOTT, S. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. The Biology of Hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium*. 1989, č. 143, s. 6–14.
- [22] HASCALL a T. C. LAURENT. Hyaluronan Structure and Physical Properties. *GlycoForum* [online]. 1997, č. 1 [cit. 2012–03–03]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [23] SCOTT, J.E., C. CUMMINGS, A. BRASS a Y. CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing–electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, č. 274, 699–705.
- [24] SCOTT, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB Journal*. 1992, č. 6, 2639–2645.
- [25] CHANG, N. S., R. J. BOACLE a G. ARMAND. Hyaluronic acid–complement interactions. I. Reversible heat-induced anticomplementary activity. *Molecular Immunology*. 1985, č. 22, s. 391–397.
- [26] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. *GlycoForum* [online]. 1998, č. 2 [cit. 2012–03–03]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [27] BECHER, P. *Emulsions: Theory and Practice*. Dotisk. New York: R. E. Krieger Pub, 1977. ISBN 0882755897.
- [28] SCHWARTZ, A. M., PERRY a J BERCH. *Surface active agents and detergents*. Dotisk. New York: R. E. Krieger Pub, 1977. ISBN 0882751573.
- [29] MCCUTCHEON. *McCutcheon's Emulsifiers and Detergents*. New Jersey: Mccutcheon Div Mc Pub Co ., 1991. ISBN 9780944254080.
- [30] LINFIELD, W. M. *Anionic surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc, 1976. ISBN 0824761588.
- [31] HOLMBERG, K., B. JONSSON, B. KRONBERG a B. LINDMAN. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2002. ISBN 0–471–49883–1.
- [32] SCHICK, I. a J. MARTIN. *Nonionic surfactants*. 2. New York: Marcel Dekker, 1988. ISBN 0–8247–7530–9.
- [33] JUNGGERMANN, E. *Cationic Surfactants*. New York: Marcel Dekker Inc, 1970. ISBN 0824713400.
- [34] DOYLE a J. L. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990, č. 12, s. 13–15
- [35] MICHIELS, A., W. VAN DEN ENDE, M. TUCKER a L. VAN RIET. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 2003, č. 315.

- [36] SMITH, D. S., P. W. MAXWELL a S. H. DE BOER. Comparison of Several Methods for the Extraction of DNA from Potatoes and Potato-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, č. 53, s. 9848–9859.
- [37] SMITH a B. A. KORDEL. The Importance of the CTAB Surfactant on the Colloidal Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods. *Langmuir*. 2008, č. 24, s. 644–649.
- [38] SALAGER, J. L. Surfactants Types and Uses. *FIRP BOOKLET # E300-A* [online]. 2002, 2. [cit. 2012-03-03]. Dostupné z: <http://nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>
- [39] R. G., LARSON. *The structure and rheology of complex fluids*. New York: Oxford University Press, 1999. ISBN 019512197X.
- [40] WAIGH, T. A. Microrheology of complex fluids. *Reports on Progress in Physics*. 2005, č. 68, s. 685.
- [41] BREUER, Kenneth S. *Microscale diagnostic techniques*. Berlin: Springer, 2005, s. 1–44. ISBN 3-540-23099-8.
- [42] CROCKER, J. C. a D. G. GRIER. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of colloid and interface science*. 1996, č. 179(1), s. 298–310.
- [43] VALENTINE, M., P. KAPLAN, D. THOTA, J. CROCKER, T. GISLER a R. PRUD'HOMME. Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Physical Review*. 2001, č. 64(6).
- [44] MASON a D. A. WEITZ. Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. *Physical Review Letters*. 1995, č. 74(7), 1250–1253.
- [45] LEVINE a T. LUBENSKY. One-and Two-Particle Microrheology. *Physical Review Letters*. 2000, č. 85, 1774–1777.
- [46] MEYER, K. a J. W. J. PALMER. Polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*. 1934, č. 107, s. 629–634.
- [47] ELIAS, Hans-Georg. *Macromolecules. Volume 2: Industrial polymers and Syntheses*. Weinheim: WILEY-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31173-6.
- [48] DROBNÍK, J. Hyaluronan in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, č. 2, 295–308.
- [49] BROWN, B. M. Hyaluronan: Investigations into the Mode of Action of Hyaluronan in Topical Drug Delivery. *ACS Symposium Series*. 2006, č. 934, 141–153.
- [50] THALBERG a LINDMAN. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Journal of Physical Chemistry*. 1989, č. 93, 1478–1483.
- [51] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTRÖM. 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, 3370–3376.
- [52] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTRÖM. Phase Behavior of a System of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: The Effect of Salt. *Journal of Physical Chemistry*. 1991, č. 95, 6004–6011.
- [53] THALBERG, K., B. LINDMAN. Gel Formation in Aqueous Systems of a Polyanion and an Oppositely Charged Surfactant. *Langmuir*. 1991, č. 7, 277–283.
- [54] HERSLÖF a L. SUNDELÖF. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/ Sodium Chloride/Water System. *Journal of Physical Chemistry*. 1992, č. 96, 2345–2348.
- [55] FUKADA, K., E. SUZUKI a T. SEIMIYA. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions. *Langmuir*. 1999, č. 15, 4217–4221.

- [56] SOUMYA, S. P. a R. PACHTER. A molecular simulations study of the miscibility in binary mixtures of polymers and low molecular weight molecules. *Polymer*. 2002, č. 43, 415–424.
- [57] MAHLIN, D., J. UNGA, A. RIDELL, G. FRENNING a S. ENGSTRÖM. Influence of polymer molecular weight on the solid-state structure of PEG/monoolein mixtures. *Polymer*. 2005, č. 46, 12210–12217.
- [58] DUBIN, P. a P. TONG. *Colloid-polymer interactions*. 1. vyd. New York: Maple Press, 1993. ISBN 0841226962.
- [59] BERRIAUD, N., M. MILAS a M. RINAUDO. Rheological study on mixtures of different molecular weight hyaluronates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994, č. 3, 137–142.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7. 1. Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ECM	extracelulární matrix
HyA	kyselina hyaluronová, hyaluronan
PMN	polymorfonukleární neutrofil
NMR	nukleární magnetická rezonance
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PEG	polyethylen glykol
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CMC	kritická micelární koncentrace
MSD	průměrná hodnota posunu
C ₁₄ TAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
TTAB	N-tetradecyltrimethylamonium bromid
NaHyA	hyaluronan sodný
C ₁₀ TAB	decyltrimethylamonium bromid
PMMA	polymethylmetakrylát
5CB	4-n-pentyl-4'-kyanobifenyl
DSC	diferenční kompenzační kalorimetrie
MO	monoolein
CCD	zařízení s vázanými náboji (charge-coupled device)
DLS	dynamický rozptyl světla

7. 2. Seznam symbolů

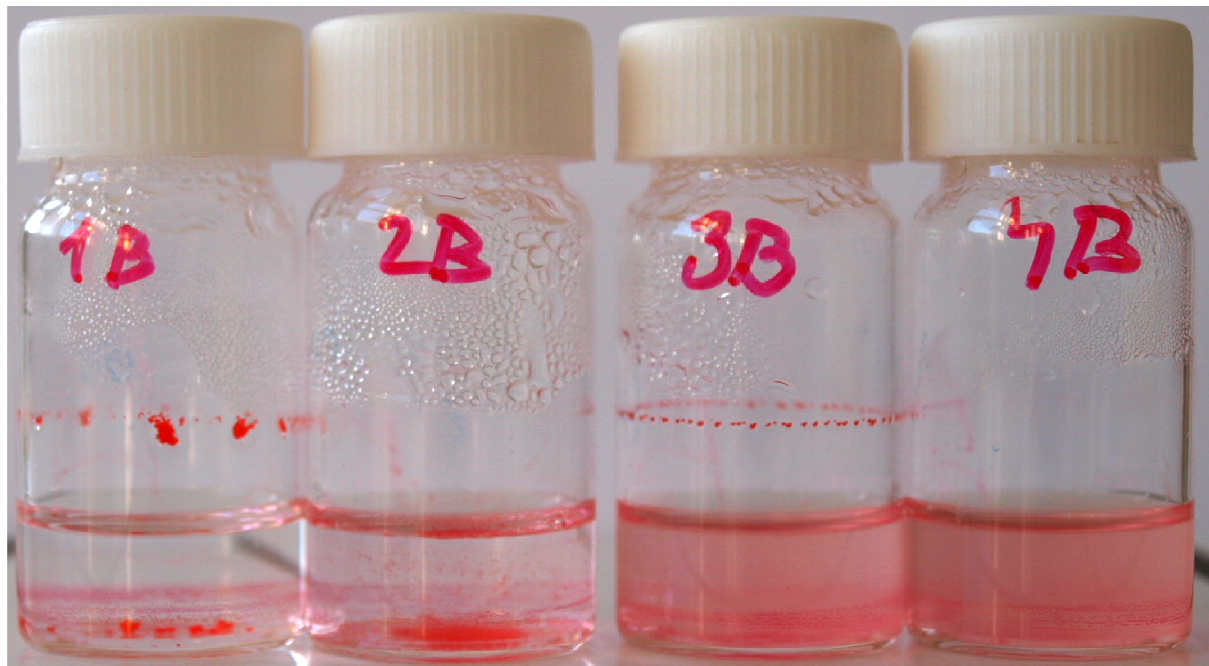
Symbol	Název veličiny
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
σ	smykové napětí
η	dynamická viskozita
γ_0	amplituda
ω	frekvence
γ	smyková deformace
$G'(\omega)$	elastický modul
$G''(\omega)$	viskózní modul
k_B	Boltzmannova konstanta
T	teplota
$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$	průměrná hodnota posunu
τ	časový interval
a	poloměr částic
$\mathfrak{S}_u$	unilaterální Laplaceova transformace
a	konstanta úměrnosti
C[η]	překryvový parametr
N	počet monomerů
P	počet jednotek v monomeru
C ₁ , C ₂	koncentrace
M _w	molekulová hmotnost

8 SEZNAM PŘÍLOH

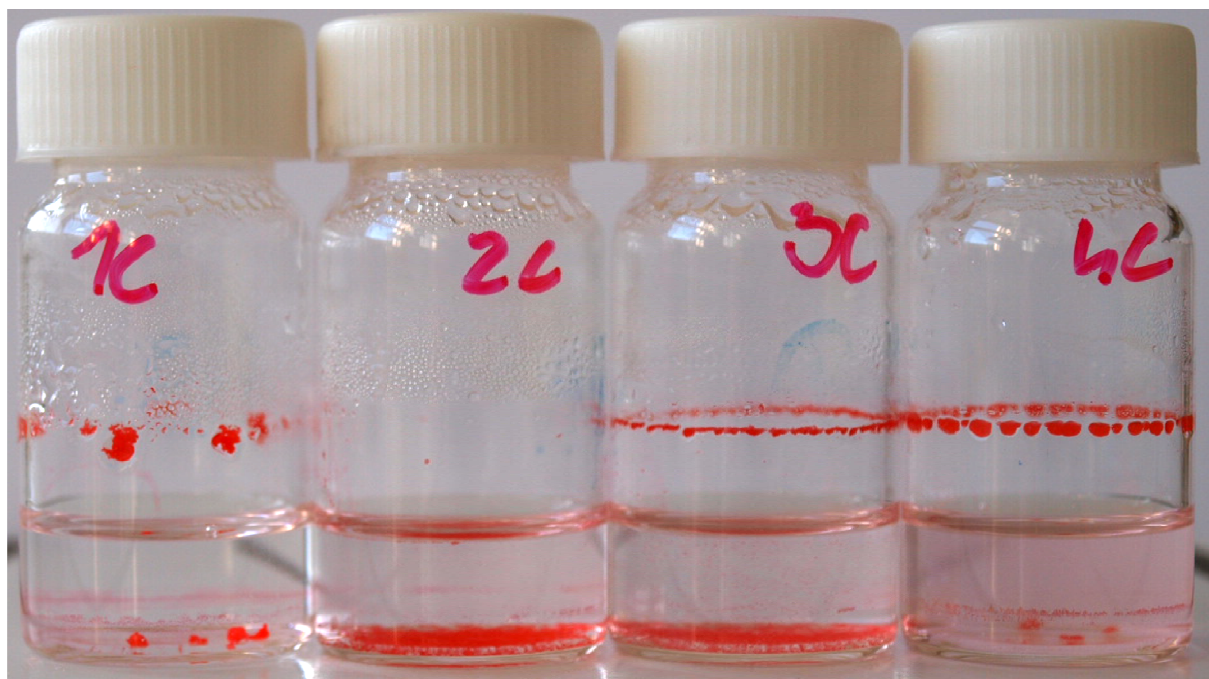
- Příloha 1: Vizualizace interakcí směsi HyA 300 kDa a 1,46 MDa (70:30) s CTAB
Příloha 2: Popis vzorků směsi HyA 300 kDa a 1,46 MDa (70:30) s CTAB
Příloha 3: Vizualizace interakcí směsi HyA 17 kDa a 1,46 MDa (50:50) s TWEEN 20

9. PŘÍLOHY

9. 1. Příloha 1



Obr. 35 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,0005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 36 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 37 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. 38 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. 39 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. 40 Vizualice perliček ve směsi HyA 300 kDa+1,46 MDa (70:30). Koncentrace CTAB $0,08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

9. 2. Příloha 2

Tabulka 6 Zápis pozorování ve vzorcích se směsí HyA 300 kDa a 1,46 MDa (70:30)

C_{CTAB} (mmol·l ⁻¹)	I (mol·l ⁻¹)			
	0	0,05	0,1	0,15
0,5	Oddělená nekontinuální fáze (vločky), lem, čirý bezbarvý roztok	Oddělená nekontinuální fáze (velmi malé vločky), čirý bezbarvý roztok	Lem z malých vloček, růžový zakalený roztok	Růžový zakalený roztok
1	Oddělená nekontinuální fáze (velké vločky na stěně i v roztoku), lem, čirý bezbarvý roztok	Oddělená nekontinuální fáze (velmi malé vločky), čirý bezbarvý roztok	Oddělená nekontinuální fáze (velmi malé vločky), čirý bezbarvý roztok, lem z malých vloček	Lem z vloček na stěně, velké vločky plavou v roztoku (asi 3)
10	Lem z velkých perliček (nekontinuální gelový lem), růžový zakalený roztok	Gelový lem (nekontinuální), pospojované perličky ležící na dně, růžový čirý roztok	Gelový lem (nekontinuální), malé množství (méně) pospojovaných perliček, růžový čirý roztok	Gelový lem, malé množství (nejméně) plavajících perliček, růžový čirý roztok
30	Gelový lem (nekontinuální), malé množství perliček plavoucích v roztoku zachycených v gelu na dně, růžový čirý roztok	Gelový lem (kontinuální), pospojované perličky ležící na dně, růžový čirý roztok	Gelový lem (kontinuální), malé množství (méně) pospojovaných perliček, růžový čirý roztok	Gelový lem, velmi málo plavajících perliček, růžový čirý roztok
50	Gelový lem (s bublinami!), malé množství perliček plavoucích v roztoku zachycených v gelu na dně, růžový čirý roztok	Gelový lem, malé množství pospojovaných perliček plavoucích v roztoku, růžový čirý roztok	Gelový lem, malé množství plavajících perliček růžový čirý roztok	Spojené agregáty, plavoucí řetězec, růžový čirý roztok
80	Lem (nekontinuální), růžový čirý roztok, malé množství perliček zachycených v gelu na dně	Lem, růžový čirý roztok, malé množství perliček zachycených v gelu na dně, jedna obrovská perla	Lem, růžový čirý roztok, řetězec plavoucí na hladině	Lem, gel na dně, růžový čirý roztok

9. 3. Příloha 3



Obr. 41 Vizualizace interakce směsi HyA 17 kDa a 1,46 MDa (50:50) s tenzidem TWEEN 20 o koncentraci $0,08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, iontová síla stoupá zleva doprava $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$