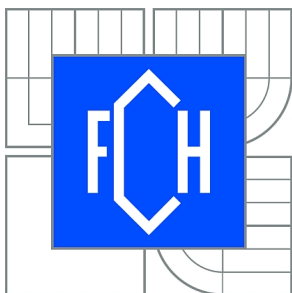




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE HYALURONAN TENZID - DYNAMICKÁ TENZIOMETRIE

DYNAMIC SURFACE TENSION IN STUDY OF HYALURONAN-SURFACTANT INTERACTIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MILAN HERZOG

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0405/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Milan Herzog	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Krouská	

Název bakalářské práce:

Interakce hyaluronan tenzid - dynamická tenziometrie

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o vlivu hyaluronanu na povrchovou aktivitu tenzidů.
2. Seznámit se s měřením povrchového napětí metodou maximálního tlaku v bublině.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k ověření využití uvedené metody ve studiu interakcí hyaluronanu s tenzidy.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi hyaluronanu

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

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

Milan Herzog
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem bylo charakterizovat interakce mezi tenzidem a negativně nabitým biopolymerem hyaluronanem sodným. Zvoleny byly dva kationické tenzidy: cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB). Vzhledem k opačným nábojům hyaluronanu a obou tenzidů lze předpokládat vzájemné interakce, které se projeví například ve změně povrchového napětí. Pro studium těchto interakcí byla zvolena dynamická tenziometrická metoda – metoda maximálního tlaku v bublině.

Byl sledován vliv konstantního přídatku hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech (90 a 1400 kDa) na změnu hodnoty povrchového napětí při zvyšující se době života bubliny. Výsledky byly také srovnány z hlediska různé iontové síly prostředí, protože vzorky byly připraveny ve vodě a v $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$.

Získané výsledky o interakci hyaluronan-tenzid mohou sloužit nejen k popisu dynamického chování tenzidů v přítomnosti zvoleného biopolymeru, ale také v oblasti cílené distribuce léčiv.

ABSTRACT

The main task was to characterize interactions between negatively charged biopolymer sodium hyaluronate and two cationic surfactants: cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB). Interactions between sodium hyaluronate and these surfactants are based on their different charge and can be detected by changes of surface tension.

The influence of constant addition of sodium hyaluronate ($M_w = 90$ and 1400 kDa) on interface tension values at increasing bubble lifetime was observed. For this purpose, the maximum bubble pressure method was chosen. The measurements were performed in water and in $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ solution.

The obtained results can be used as for description of dynamic properties of hyaluronate-surfactant systems as, e.g., in targeting drug delivery.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan sodný, dynamická tenziometrie, povrchové napětí, tenzid

KEY WORDS

sodium hyaluronate, dynamic tensiometry, surface tension, surfactant

HERZOG, M. *Interakce hyaluronan tenzid - dynamická tenziometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 30 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Milan Herzog

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za čas, který mi věnoval, stejně jako za náměty a připomínky. Dále bych rád poděkoval Ing. Jitce Krouské, která mi poskytla řadu užitečných informací a komentářů. Zároveň děkuji své přítelkyni za podporu, bez níž bych se práci nemohl plně věnovat.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	Povrchové napětí a jeho měření	8
3.1.1	Statické metody	8
3.1.2	Semistatické metody.....	9
3.1.3	Dynamické metody.....	10
3.2	Hyaluronan.....	11
3.2.1	Struktura a výskyt.....	11
3.2.2	Zdroje hyaluronanu	12
3.2.3	Biomedicínské aplikace hyaluronanu a jeho derivátů.....	13
3.2.4	Otolaryngologie.....	13
3.2.5	Dermatologie a plastické operace	13
3.2.6	Oftalmologie	14
3.2.7	Ortopedické operace a revmatologie	14
3.2.8	Chirurgické zákroky a hojení ran	14
3.2.9	Farmacie a cílená distribuce léčiv	14
3.3	Interakce hyaluronan-tenzid.....	15
3.3.1	Interakce hyaluronan-TTAB v prostředí s rostoucí koncentrací NaCl.....	15
3.3.2	Léčba rakoviny: Vázání makromolekul a nanonosičů na hyaluronan nebo CD44 – hyaluronanový receptor	15
3.4	Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)	16
3.5	Tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB)	16
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
4.1	Přístroje a pomůcky.....	17
4.1.1	Tenziometr BPA-800P	17
4.2	Příprava vzorků	19
4.3	Nastavení tenziometru a postup měření.....	20
4.4	Zpracování dat.....	20
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	21
5.1	Pozorování	21
5.1.1	Zákal a gelace.....	21
5.2	Výsledky dle molekulové hmotnosti hyaluronanu	22
5.3	Vliv délky řetězce tenzidu	24
5.4	Vliv iontové síly roztoku	25
5.5	Difúzní koeficient.....	26
6	ZÁVĚR	27
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	28
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	30
8.1	Použité zkratky.....	30
8.2	Použité symboly	30

1 ÚVOD

Hyaluronan je přírodní nerozvětvený negativně nabitý polysacharid o velké molekulové hmotnosti. Strukturu tvoří pravidelně se opakující disacharidická jednotka složená z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Hyaluronan tedy patří do skupiny glukosaminoglykanů. Hyaluronan má široké uplatnění v biomedicínských oborech především díky svým unikátním viskoelastickým a reologickým vlastnostem. Hyaluronan proto hraje velmi důležitou roli v živých organismech a je velmi žádaným materiálem v oblasti farmacie, plastické chirurgie a v neposlední řadě také v oboru cílené distribuce léčiv [1].

V živých organismech se hyaluronan vyskytuje především v synoviální tekutině, extracelulární matrix, očním sklivci, chrupavkách a pokožce, kde díky své vysoké hydrofilní povaze zajišťuje především hydrataci a správné mechanické vlastnosti těchto tkání [1].

V oblasti cílené distribuce léčiv se hyaluronan uplatňuje jako velmi dobrý nosič, ovšem až po interakci s nějakou látkou, která je schopna vytvořit s hyaluronanem agregát, který bude obsahovat hydrofobní doménu. Tyto hydrofobní domény jsou nutné pro solubilizaci léčiv, protože ta jsou především hydrofobní povahy. Tenzidy, které jsou tvořeny jak hydrofilní, tak hydrofobní částí, po dosažení kritické micelární koncentrace (CMC) vytvoří micelu tak, že se uhlíkaté řetězce tenzidu shluknou směrem dovnitř micely, a tím vznikne hydrofobní prostor pro solubilizaci léčiva.

Vybrány byly kationické tenzidy cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB), které nesou kladný náboj a proto jsou velmi vhodné pro tvorbu agregátů s negativně nabitým hyaluronanem [2, 3].

Smyslem této práce bylo prozkoumat vliv hyaluronanu na chování tenzidů dynamickou tenziometrií, případně experimentálně prokázat vzájemné interakce a do jaké míry se projevují. Interakce byly hodnoceny z několika hledisek – vliv iontové síly roztoku, délka řetězce tenzidu a molekulová váha použitého hyaluronanu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo prozkoumat vliv hyaluronanu na povrchové napětí v roztoku tenzidu. Tento jev byl sledován pomocí dynamické tenziometrické metody a to metodou maximálního tlaku v bublině. Získaná data mají sloužit k lepšímu popisu očekávaných interakcí mezi tenzidem a hyaluronanem. Byl studován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu, vliv iontové síly roztoku a vliv délky uhlíkatého řetězce tenzidu na snižování povrchového napětí při zvyšujícím se čase života bubliny. Získané informace by měly posloužit v oblasti nosičových systémů biologicky aktivních látek. Výsledky budou hodnoceny také z hlediska toho, zda lze zvolené systémy hyaluronan-tenzid aplikovat v oblasti nosičových systémů biologicky aktivních látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Povrchové napětí a jeho měření

Metody pro stanovení povrchového, či mezifázového napětí, se dají rozdělit do tří základních skupin. Jedná se o metody statické, semistatické a dynamické.

3.1.1 Statické metody

Statické metody jsou založeny na sledování ustáleného rovnovážného stavu studovaného systému. Koncentrace molekul povrchově aktivních látek na povrchu je odlišná od koncentrace v objemu, může zde také docházet k orientacím molekul v prostoru. Tyto děje potřebují jistou dobu, aby dosáhly rovnovážného stavu, proto je tato metoda nevhodná pro použití u rychle se obnovujících povrchů. Ovšem po dosažení rovnováhy je povrchové napětí na čas nezávislé. V praxi se lze často setkat s jevem, kdy povrchové napětí s rostoucím časem klesá. V ideálním případě hodnota povrchového napětí nezávisí na volbě měřicí metody. Do této skupiny metod patří například kapilární elevace, sledování tvaru kapek a bublin v gravitačním poli, nebo metoda vytahování destičky [4].

3.1.1.1 Metoda kapilární elevace

Měří se výška vzestupu kapaliny h ve vertikální kapiláře. Pro povrchové napětí tedy platí:

$$\gamma = \frac{h \cdot \rho \cdot r \cdot g}{2 \cos \theta}, \quad (1)$$

kde ρ je hustota kapaliny (hustota vzduchu se zanedbává), r je poloměr kapiláry, g je gravitační zrychlení, θ je smáčecí úhel. Používají se tenké kapiláry, které jsou dokonale smáčeny kapalinou ($\theta = 0^\circ$, $\cos \theta = 1$). Nejčastěji používaným materiálem pro kapiláry je sklo. Kapiláry musí být dokonale čisté a měly by mít stejný průměr po celé délce. Tato metoda může být použita i pro měření mezifázového napětí [4].

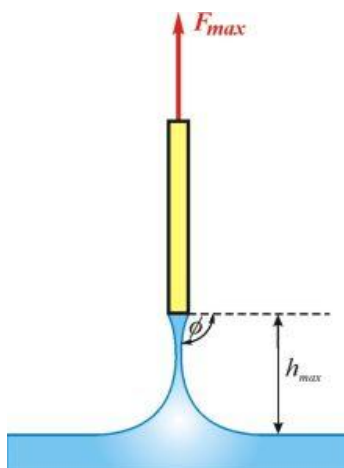
3.1.1.2 Metody založené na sledování tvaru kapek a bublin

Povrchové nebo mezifázové napětí užitím této metody se zjišťuje pozorováním skutečného profilu přisedlé nebo visící kapky. Obraz kapky je pozorován mikroskopem, snímán kamerou a zpracován počítačem. Metoda je absolutní a skutečně statická. K měření je potřeba pouze malé množství studované kapaliny a měření lze provádět i za zvýšeného tlaku i teploty. Metoda umožňuje přesné měření jak velmi nízkých povrchových napětí, tak i vysokých. Měření mohou být prováděna bez zásahu do systému, jak v rychlém sledu, tak i po dlouhou dobu, takže lze sledovat změnu napětí systému s časem. Speciálním případem této metody je *metoda rotující kapky* [4].

3.1.1.3 Metoda vytahování destičky (Willhelmyho)

Tenká destička šířky d , dobře smáčená studovanou kapalinou, se upevní do vahadla vah a ponoří do kapaliny. Na povrchu destičky se vytvoří z obou stran menisky, přičemž celková hmotnost vztlínající kapaliny připadající na jednotku obvodu destičky pak nezávisí na tvaru menisku a při nulovém úhlu smáčení je rovna povrchovému napětí. Pro sílu F (obvykle se měří při takové poloze destičky, kdy její dolní hrana je přesně ve výši hladiny kapaliny), kterou je nutno vynaložit pro vyvážení destičky o šířce d a tloušťce t (t je mnohem menší než d), platí vztah [4]:

$$F = 2(d + t) \cdot \gamma \cong 2d\gamma \quad (2)$$



Obr. 1 Schéma měření vytahování destičky [4]

3.1.2 Semistatické metody

Semistatické metody jsou podobně jako statické metody založeny na dosažení rovnovážného stavu soustavy. V těchto případech je však rovnováha nestabilní. Při zkoumání soustav je nutné zvolit optimální čas k přiblížení k rovnovážnému stavu.

3.1.2.1 Metoda maximálního přetlaku v bublině

Ve studovaném roztoku se za přetlaku p na konci kapiláry, ponořené pod hladinou, vytváří bublina plynu (nejčastěji vzduch). S růstem bubliny se zmenšuje poloměr jejího zakřivení. Přetlak v bublině je roven součtu hydrostatického tlaku a tlaku potřebného k překonání povrchového napětí γ . Platí vztah:

$$p = h \cdot \rho \cdot g + \frac{2\gamma}{r}, \quad (3)$$

kde p je tlak, h je hloubka ponoření kapiláry, g je gravitační zrychlení, γ je povrchové napětí a r je poloměr bubliny, respektive kapiláry [4].

V okamžiku, kdy bublina dosáhne polokulovitěho tvaru, je r minimální a je rovno poloměru kapiláry. Tlak v bublině v tomto okamžiku dosahuje maximální hodnoty. Při dalším zvětšení tlaku poloměr bubliny prudce roste, bublina se stává nestabilní a odtrhne se. Ačkoli se tato metoda řadí do semistatických, byla využita ke zkoumání dynamických vlastností

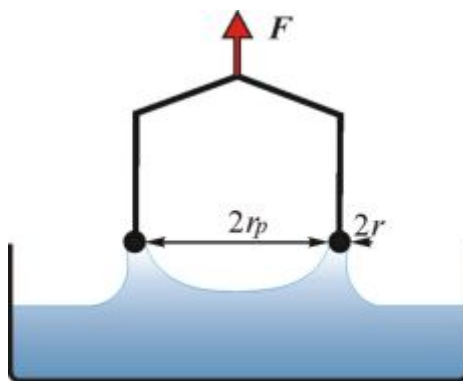
roztoku. Základní předpoklad je, že se na nově tvořící povrch dostanou povrchově aktivní látky. Pokud se bublina tvoří rychle, nestačí se celý povrch zaplnit tensidem a povrchové napětí je tedy vyšší než v případě, kdy je čas delší a tensid zaplní celý povrch [4, 5].

3.1.2.2 Metoda odtrhování kroužku (du Noüyho)

U této metody se měří síla F , která je potřebná k odtržení platinového kroužku z fázového rozhraní. Platinový kroužek musí být dobře smáčen kapalinou, tedy kontaktní úhel by měl být roven nule. Pokud se experiment nastaví tak, aby nedocházelo k odtrhávání kroužku, metoda se dá považovat za statickou (podobně jako Wilhelmyho metoda). Platí vztah:

$$\gamma = \frac{F}{4\pi \cdot r_p} \cdot \phi, \quad (4)$$

kde F je síla potřebná k odtržení kroužku, r_p je poloměr kroužku a ϕ je korekce na kapalinu, která ulpí na kroužku. Tato metoda se dá dobře využít k měření jak povrchového, tak mezifázového napětí [4].



Obr. 2 Schéma odtrhávání kroužku [4]

3.1.2.3 Metoda vážení kapky (stalagmometrická)

Na kapku, tvořící se na konci silnostěnné kapiláry, působí gravitační síla. Protože se kapka zpravidla neodtrhne celá a po odtržení se ještě rozdělí na několik menších kapek, je nutná korekce dle daných tabelovaných dat [4].

3.1.3 Dynamické metody

Do dynamických metod patří například tzv. metoda oscilujícího paprsku. Proud kapaliny je vypouštěn z eliptického otvoru. Působením povrchových sil se proud kapaliny snaží zúžit do tvaru válce s kruhovým průřezem. Tyto změny jsou sledovány optickými prostředky. Metoda není vhodná k měření absolutního povrchového napětí, uplatnění však nachází při měření rychlých změn povrchového napětí [4].

Ačkoli metoda maximálního přetlaku v bublině je dle výše uvedeného rozdělení řazena do semistatických metod, dá se za určitých podmínek považovat i za metodu dynamickou. Základním předpokladem je, že molekuly rozpuštěné látky jsou rozmístěny v objemu.

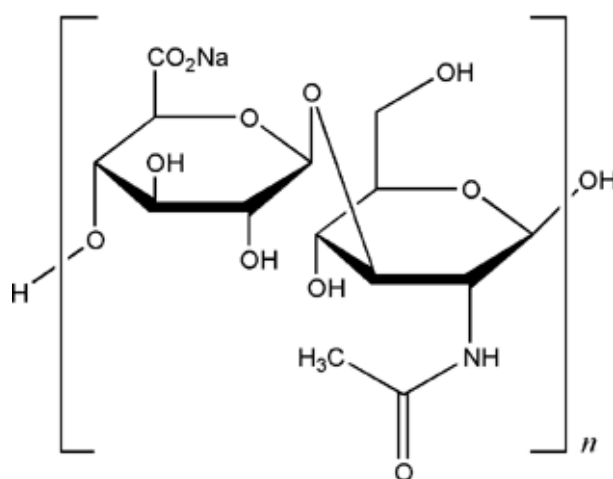
Při tvorbě bubliny (nového povrchu) se tyto molekuly mohou dostat na nově vznikající povrch. Pokud se však bubliny tvoří dostatečně rychle, celý povrch se nestihne nasýtit. Pomocí tohoto jevu se tedy dá popsat, jak moc je daná látka v roztoku pohyblivá.

3.2 Hyaluronan

V roce 1934 se Meyerovi a Palmerovi podařilo extrahovat do té doby neznámý polysacharid z očních čoček hovězího dobytka, který nazvali k. hyaluronová kvůli obsahu kyseliny uronové (uronic acid) a jejího původu z čoček (hyaloid = sklo). Protože se k. hyaluronová prakticky nikdy nenachází ve fyziologickém prostředí jako kyselina, ale jako sodná či jiná sůl, začal se od roku 1996 užívat název hyaluronan pro celou skupinu [6].

3.2.1 Struktura a výskyt

Kyselina hyaluronová (též hyaluronan, hyaluronan sodný, HA) je nerozvětvený polysacharid složený z β -(1-3)-N-acetyl-D-glukosaminu a β -(1-4)-D-glukuronové kyseliny, proto patří do skupiny glykosaminoglykanů [1].



Obr. 3 Hyaluronan sodný, strukturní vzorec [7]

Může dosahovat obrovských molekulových hmotností (až milionů Daltonů) a je zajímavá pro svoje viskoelastické vlastnosti způsobené jejím polymerním a polyelektrolytickým charakterem.

Hyaluronan se vyskytuje jako složka v synoviálních tekutinách a je součástí extracelulárního matrixu. Největší koncentrace hyaluronanu v přírodě se dají najít ve hřebíncích kohoutů, proto se z nich dříve hyaluronan izoloval. V lidském těle je nejvyšší koncentrace hyaluronanu v synoviálních tekutinách, v pupeční šňůře, chrupavce a ve sklívci. Téměř polovina lidského hyaluronanu se vyskytuje v kůži v intracelulárním prostoru, kde může dosahovat koncentrací až 2,5 g/l. Díky svým hydrofilním vlastnostem přispívá k udržení vody v kůži a napomáhá k rychlejší a dokonalejší regeneraci poškozených tkání. Dále přispívá k pohlcování volných radikálů v kůži, které se tvoří při dopadu ultrafialového záření ze slunečního světla [1, 2].

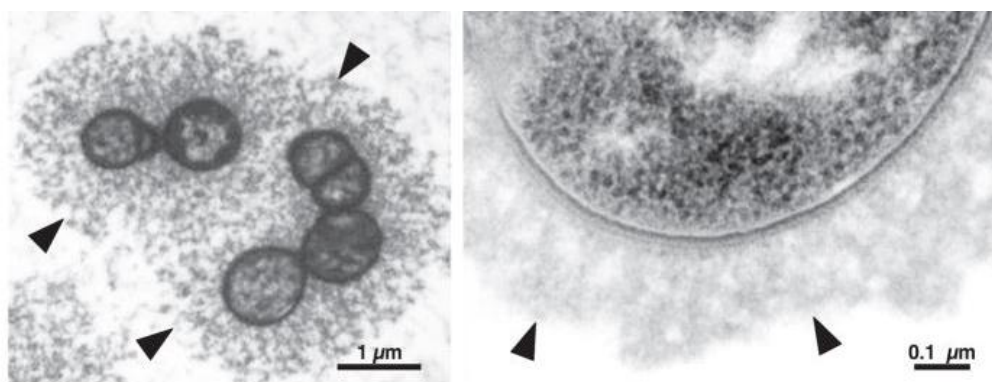
V synoviálních tekutinách se vyskytuje vysokomolekulární hyaluronan o vysokých koncentracích, kde funguje jako nezbytný lubrikant a slouží jako absorbent nárazů.

Pokud z nějakého důvodu klesne koncentrace hyaluronanu v kloubních prostorách, dochází k poškozování kloubů (osteoartritida). Tomu se dá sice předcházet lékařskými zákroky, ale procedura je nezbytně často opakovat.

Pokud dojde ke zjištění obsahu nízkomolekulárního hyaluronanu v krvi, často to znamená přítomnost rakovinného bujení. Rakovinné buňky totiž produkují nízkomolekulární hyaluronan, aby tak unikly imunitnímu systému a přebytky jsou strhávány do krevního řečiště [1].

3.2.2 Zdroje hyaluronanu

Jak již bylo zmíněno, hyaluronan se vyskytuje prakticky ve všech tkáních obratlovců. Kromě kohoutích hřebínků se ve vysokých koncentracích vyskytuje například ve žraločí kůži. Tyto zdroje poskytují vysokomolekulární hyaluronan, ovšem problémem je izolace. Hyaluronan jako takový se ve tkáních nevyskytuje sám, je obklopen řadou dalších molekul, jako jsou proteiny, bakteriální endotoxiny, nukleové kyseliny, chondroitin sulfát a další. Jiný způsob, jak získat čistý hyaluronan, je izolovat jej z některých mikroorganismů. Jsou využívány především kmeny *Streptococcus*, například druhy *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equi*.



Obr. 4 *Streptococcus zooepidemicus* s vrstvou hyaluronanu [8]

Roční světová produkce hyaluronanu získaného z mikroorganismů činí několik desítek tun. Při této výrobě však molekulová hmotnost není příliš vysoká, je sice možné kratší řetězce syntetizovat, ale častěji se využívá genetické modifikace mikroorganismů. Modifikací lze dosáhnout jak větších molekulových vah, tak i většího množství získaného hyaluronanu. Ke genetické modifikaci se využívá například bakterie *Bacillus subtilis*. Výhodou tohoto organismu je rychlé množení a produkce jen malých množství endo a exotoxinů, proto mnoho produktů splňuje normy pro použití v medicíně, kde se v současné době hojně užívá při regeneraci otevřených ran nebo v kosmetické chemii [1].

Problémem stále zůstává, jak hyaluronan dlouhodobě skladovat, protože se jedná o velmi hygroskopickou látku, což je komplikací při přípravě roztoků o přesné koncentraci. Hyaluronan je velmi náchylný na přítomnost mikroorganismů a degraduje už i při kontaktu se vzdušným kyslíkem[9].

3.2.3 Biomedicínské aplikace hyaluronanu a jeho derivátů

Hlavní oblasti, kde se hyaluronan využívá v oblasti medicíny, jsou:

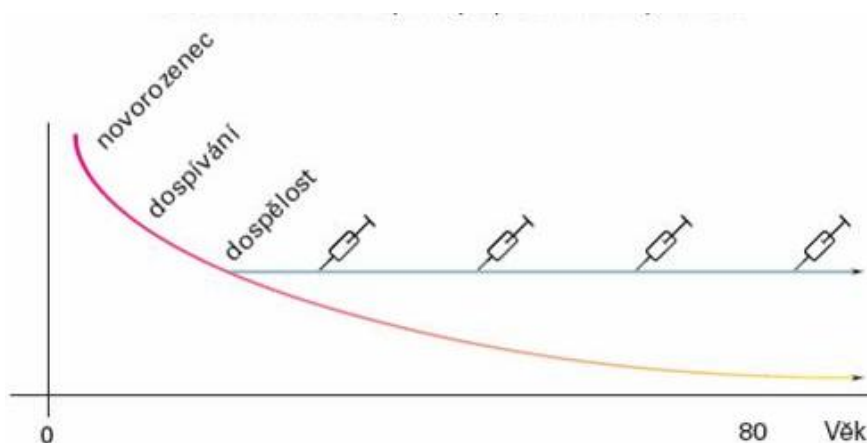
- invazivní operace, kde chrání tkáň a poskytuje prostor pro vlastní operaci
- omlazování tkání, kde se hyaluronan doplní například do kůže, hlasivek nebo hrtanu
- urychlování hojení, kde hyaluronan zvlhčuje ránu a potlačuje zjizvení
- výměna synoviálních tekutin v kloubech, kde ulevuje od bolesti

3.2.4 Otolaryngologie

Ve tkáních zastává hyaluronan několik již zmíněných funkcí, kde dále ovlivňuje například viskozitu a osmotické jevy. Tyto vlastnosti jsou nepostradatelné pro správnou funkci hlasivek, které jsou namáhány neustálými vibracemi. Osmotické, viskoelastické a vyplňovací vlastnosti jsou důležité pro tvorbu hlasu, protože přímo ovlivňují samotný tvar hlasivek. Výzkum v této oblasti stále probíhá, problémem zůstává, že injekčně doplněné deriváty hyaluronanu se ve tkáni udrží pouze několik dní. Proto se hledá vhodný derivát, který by se ve tkáni udržel po delší dobu. Je využíváno i enzymů, případně mechanického zabudování hyaluronanu do hlasivek. V současné době se zkoumá i využití hyaluronanu při operacích ušních bubínků [1].

3.2.5 Dermatologie a plastické operace

Hyaluronan se v současné době hojně využívá k vyhlazování obličejových vrásek a podobně. V gelové formě je dokonce efektivnější než jiné kosmetické úpravy zejména na bázi kolagenu. Díky své elasticitě dokáže hyaluronan rovnoměrně vyplnit prostory, do kterých je dopraven, vyhlazení vrásek je tedy velmi účinné. I zde ovšem platí, že hyaluronan se časem odbourá a je nutné zákrok opakovat. Pro tento typ operací je využíván hyaluronan získaný z kohoutích hřebínků. Benzylester hyaluronanu nachází své uplatnění v cévním inženýrství [1].



Obr. 5 Úbytek hyaluronanu v pokožce vlivem stáří [6]

3.2.6 Oftalmologie

Hyaluronan je hlavní složkou očního sklivce, proto je používán při očních operacích, kde vytváří pracovní prostředí. Nejčastěji prováděnou operací oka s použitím hyaluronanu bývá výměna čočky. Při dřívějších operacích bývala odstraněna celá duhovka s rohovkou a následně byla vyměněna čočka. Tento postup si však vyžadoval dlouhou pozdější regeneraci rány. V současné době se operace provádí tak, že se rohovka pouze nařízne a prostor se vyplní hyaluronanem, samotná čočka se následně rozbije ultrazvukem a je i s hyaluronanem odsáta. Do vzniklého prostoru je pak vsunuta nová svinutá čočka, která se následně rozvine. Regenerace oka se tím značně urychlí a i úspěšnost operací je větší [1].

3.2.7 Ortopedické operace a revmatologie

Jedním z dalších důležitých míst, kde se hyaluronan vyskytuje, jsou kloubní prostory, kde umožňuje bezbolestný a plynulý pohyb. Při poškození kloubů, způsobeném například artritidou, dochází k nadměrnému tření a bolestem. Tyto disfunkce se objevují s přibývajícím věkem. Podle statistik má problémy s artritidou na 10% populace ve věku vyšším než 55 let. Molekulové váhy hyaluronanu obsaženého v kloubech zdravého dospělého člověka se pohybují mez 2 až 7 MDa. Degradace synoviální tekutiny je způsobena přítomnými odumírajícími buňkami, ty při svém zániku uvolňují oxidační činidla a ty se podílí na destrukci kloubních struktur. Léčba kloubních chorob pomocí dávek hyaluronanu je známa od 80. let 20. století. Při léčbě je podáván hyaluronan o molekulové hmotnosti okolo 1 MDa, procedura je opakována každé 3 týdny. Při použití nižších molekulových vah je nutné postup opakovat každý týden [1].

3.2.8 Chirurgické zákroky a hojení ran

Vysokomolární hyaluronan pomáhá při hojení otevřených ran, popálenin, různých vředů a bradavic. Hyaluronan společně s desinfekčními prostředky brání vysychání rány a kryje ji před nečistotami a mikroorganismy. Urychluje se hojení a tím se snižuje zjizvení. V současné době je hyaluronan zabudováván do tzv. „inteligentních obvazů“, které jsou vysoce funkční a cenově dostupné [1].

3.2.9 Farmacie a cílená distribuce léčiv

Karboxylové skupiny na řetězci hyaluronanu jsou vhodné k interakcím, které jsou využívány v oblasti cílené distribuce léčiv. Je buď využíváno přímých interakcí s karboxylovou či hydroxylovou skupinou, nebo jsou léčiva uzavírána do micel. Tyto interakce se uplatňují i v genovém inženýrství [1]. Touto problematikou se zabývá dále odstavec 3.3.2.

3.3 Interakce hyaluronan-tenzid

Problematikou interakcí hyaluronan-tenzid se začíná zabývat stále více odborných pracovišť po celém světě. Pro nás jsou důležité poznatky z experimentů z oblasti fyzikální chemie, jako je měření povrchového napětí, vodivosti, viskozity nebo solubilizace. Ovšem i přesto je počet odborných publikací relativně malý. V současné době také roste zájem o výzkum interakcí mezi hyaluronanem a jinými vysokomolekulárními látkami.

3.3.1 Interakce hyaluronan-TTAB v prostředí s rostoucí koncentrací NaCl

Pro polyelektrolyty je typické, že mají svůj náboj rozložený rovnoměrně po celém řetězci. Nicméně jejich konformace a dynamické vlastnosti jsou dány stupněm ionizace. Ve vodných roztocích jsou také důležité hydrofóbní interakce, které ovlivňují konformaci hlavního řetězce. Interakce mezi negativně nabitým polyelektrolytem hyaluronanem sodným a kationickým tenzidem TTAB byly sledovány ve vodném prostředí. Vlastnosti roztoku byly sledovány z hlediska změny viskozity a povrchového napětí při zvětšování koncentrace NaCl. Při přidávku TTAB do roztoku s nízkou iontovou silou se směs rozdělila na dvě fáze. Pokud byla iontová síla dostatečně vysoká (koncentrace NaCl přibližně $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), došlo ke zhomogenizování roztoku. Těsně nad touto hranicí koncentrace NaCl je viskozita roztoku minimální při zvýšení koncentrace TTAB. Při vyšších koncentracích NaCl se viskozitní vlastnosti podobají vlastnostem roztoků bez přítomnosti TTAB. Tento jev je vysvětlován tak, že polyelektrolytu jsou zablokovány funkční skupiny a řetězec se smrští. Vyšší přídavky TTAB vedou k adsorpci a patrně i degradaci. Viskozita roztoku závisí na tvorbě micel při interakci mezi hyaluronanem a TTAB. Předpokládá se, že tenzid sám tvoří agregáty a ty jsou vázány mnohdy na více jak jeden řetězec hyaluronanu. Při vyšších koncentracích tenzidu se řetězce hyaluronanu více rozevírají, aby mohlo dojít k interakcím, a tím se zvyšuje viskozita roztoku. Elektrostatický náboj hyaluronanu je tím menší, čím vyšší je koncentrace NaCl [9].

3.3.2 Léčba rakoviny: Vázání makromolekul a nanonosičů na hyaluronan nebo CD44 – hyaluronanový receptor

Léčba rakoviny je jedna z nejvýznamějších oblastí, kde probíhá výzkum hyaluronanu a jeho využití pro jeho vazebné schopnosti a biologické vlastnosti. Rakovina epitelálního původu je spojena s nadměrnou činností receptoru CD44, který váže hyaluronan.

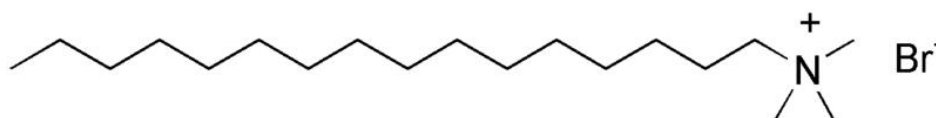
Receptor CD44 patří do skupiny glykoproteinů a je nejlépe prostudovaným receptorem, který váže hyaluronan. Existuje ve více formách primárního transkriptu, které ovlivňují délku receptoru a tím i jeho funkci. Kromě hyaluronanu je schopný vázat fibronectin, laminin, nebo kolagen [10].

V některých typech rakovinného bujení je hyaluronan produkován samotným nádorem. Ačkoli činnost receptoru i přítomnost hyaluronanu je ve tkáních normální, je možné určit místo vznikajícího nádoru. Uvedenou operaci je možno uskutečnit právě proto, že makromolekulární nosiče se přednostně váží na postižené tkáně. Anti-CD44 protilátky byly použity při chemoterapii pro léčbu nádorů s CD44 receptorem. Při prvních testech se prokázalo, že tato léčba dokáže zpomalit nebo zastavit chorobu. Hyaluronan byl použit jako

nosič a ligand pro liposomy nebo nanočástice, aby tyto látky transportoval k buňkám, které ve velké míře aktivují CD44 receptory. Interakce na hyaluronanu byly realizovány buď na karboxylové, nebo hydroxylové skupině (záleží na polaritě léčiva). Takto připravené vzorky byly testovány jak formou *in vitro*, tak i na myších. Další možností je nechat modifikovaný hyaluronan obalit celý nádor a tím zabránit jeho výživě za použití CD44 proteinů. Tato forma léčby poskytuje uspokojivé výsledky a je předmětem dalšího studia [11].

3.4 Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)

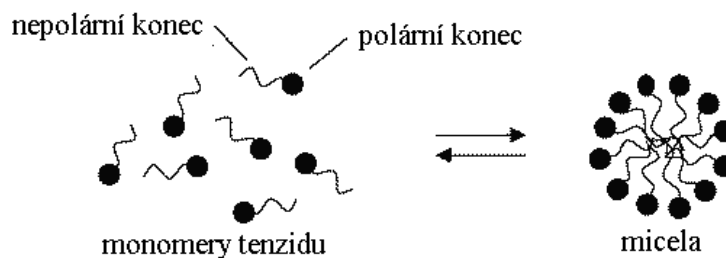
CTAB je kvartérní amoniová sloučenina, která je účinným antiseptikem proti bakteriím a houbám. Jedná se o kationický tenzid, který ve vodném prostředí tvoří micely. Používá se například pro přípravu pufových roztoků pro extrakci DNA, při syntéze zlatých nanočástic a je přidáván do vlasových kondicionérů [12].



Obr. 6 CTAB, strukturní vzorec [13]

CTAB se dodává jako bílá krystalická sloučenina s teplotou tání okolo 244°C. Ačkoli se jedná o stabilní sloučeninu, vykazuje toxické účinky a je nebezpečná pro životní prostředí, především pro vodní organismy, byly prokázány i teratogenní účinky [14].

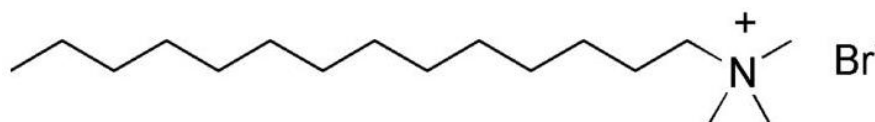
Tenzidy mají obecně schopnost vytvářet agregáty, případně micely. Záleží na prostředí, ve kterém se vyskytují. V polárních rozpouštědle vytvoří micelu tak, že polární konce řetězce jsou vně a nepolární části jsou uvnitř, jak znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7 Tvorba micely [15]

3.5 Tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB)

TTAB je tenzid, který se od CTAB liší délkou uhlíkatého řetězce. Teplotou tání se oba tenzidy příliš neliší. TTAB se mimo jiné využívá jako katalyzátor, emulgátor nebo sterilizátor. Vykazuje, stejně jako CTAB, antiseptické účinky [16].



Obr. 8 TTAB, strukturní vzorec [17]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

K přípravě roztoků bylo použito standardní laboratorní vybavení. K měření povrchového napětí byl použit tenziometr BPA-800P.

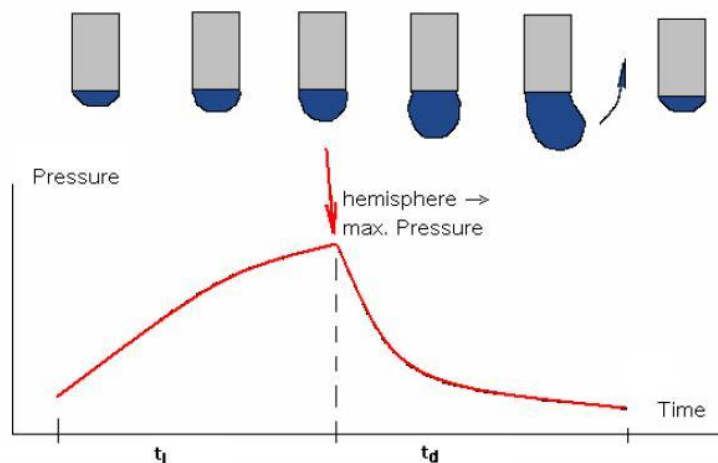
4.1.1 Tenziometr BPA-800P

Tenziometry měřící mezifázové napětí pomocí maximálního tlaku v bublině mají díky své nenáročnosti na technické zázemí řadu uplatnění jak v laboratorních podmínkách, tak i v terénu. Některé z těchto tenziometrů dokáží pracovat s různými kapilárami a při stanovování povrchového napětí dokáží zohlednit hydrostatický tlak a viskozitu roztoku. Pro měření byl použit tenziometr BPA-800P (KSV instruments, Ltd.).

Tab. 1 Základní technické parametry pro tenziometr BPA-800P

Rozsah povrchového napětí	10 – 100 mN/m
Přesnost stanovení	$\pm 0,1$ mN/m
Citlivost	$\pm 0,25$ mN/m
Měřitelné časové rozmezí	10 ms – 10 s
Teplotní rozmezí	0 – 90 °C

Tenziometr BPA-800P měří tlak ve tvořící se bublině. Maximálního tlaku je dosaženo právě tehdy, když se poloměr bubliny rovná vnitřnímu poloměru kapiláry.



Obr. 9 Schéma tvorby bubliny se změnou tlaku v kapiláře [5]

Povrchové napětí je následně automaticky vypočítáno dle vztahu

$$\gamma = f \frac{r \cdot P}{2}, \quad (5)$$

kde γ je povrchové napětí, f je korekční faktor pro kapiláry o poloměru menším než 0,1 mm, r je poloměr bubliny a P je příslušný tlak.

Jak již bylo zmíněno, přístroj dokáže zahrnout do stanovení i vliv hydrostatického tlaku a odporu vzduchu, platí tedy

$$P = P_S - P_H - P_D, \quad (6)$$

kde P je výsledný tlak, P_S je nejvyšší naměřený tlak v bublině, P_H je hydrostatický tlak a P_D je tlak příslušný odporu vzduchu.

Některé tenziometry využívají oscilace, to znamená, že se bubliny neodtrhují. Vždy se nafouknou do poloměru nepatně vyššího než je poloměr kapiláry a poté jsou opět zmenšeny. Tato metoda má výhodu v tom, že roztoky nemají tendenci pění. Ovšem povrch se ne zcela obnovuje a to může zkreslit popis dynamického chování studovaných roztoků.

Software, kterým je tenziometr BPA-800P vybaven, umožňuje čtyři základní nastavení experimentu [5].

4.1.1.1 Standardní experiment

Standardní experiment je přednastaven tak, že čas na tvorbu bubliny se postupně zvyšuje od přibližně 10 ms do přibližně 10 s po malých krocích (minimální a maximální čas se dá nastavit manuálně). Čas na jedno měření se pohybuje okolo 20 minut, při měření viskóznějších roztoků se však může čas zvýšit až na 40 minut. Pro tento typ experimentu je vhodné použít kapiláru o vnitřním průměru 0,25 mm, protože pro tuto kapiláru existují tabulky pro úpravu výsledků vlivem působení viskozity a odporu vzduchu. Přístroj je těmito daty pro korekci vybaven a sám podle toho dokáže výsledky upravit. Pokud operátor přístroje zná viskozitu roztoku, lze ji zadat manuálně. Jedná se o nejčastěji volený experiment, dokáže totiž poměrně spolehlivě získat data pro popis dynamických vlastností roztoků. Nevýhodou může být hromadění pěny, která se tvoří při krátkých časech života bubliny. Ta následně zůstává na povrchu a mění tedy koncentraci povrchově aktivních látek uvnitř roztoku [5].

4.1.1.2 Experiment s konstantní dobou života bubliny

Experiment s konstantní dobou života bubliny sice nedokáže tak precizně popsat dynamické vlastnosti roztoku jako standardní experiment, nicméně je hojně využíván při kontrolách v chemických technologiích a procesních kontrolách. Zařízení udržuje konstantní průtok vzduchu a tím pádem je udržován maximální konstantní tlak v bublině a tedy i čas zůstává konstantní. I v tomto případě přístroj umí výsledky upravit z hlediska viskozity a hloubky ponoření kapiláry [5].

4.1.1.3 Experiment se zvyšujícím se průtokem plynu

Tento experiment je obrácenou variantou standardního experimentu. Čas pro tvorbu bubliny je v malých krocích snižován od přibližně 5 s do 10 ms. Tohoto nastavení se hojně využívá při studiu pěnivých roztoků. Pěna se tvoří až v závěru měření. Nevýhodou je, že přístroj měří od maximálního času bubliny 5 s – pokud je v roztoku obsažena málo mobilní složka, její dynamické vlastnosti nemohou být popsány pro vyšší časy. I při tomto nastavení

přístroj zahrnuje vliv viskozity a odporu vzduchu, pokud hodnota viskozity není zadána manuálně [5].

4.1.1.4 Zrychlený experiment

Zrychlený experiment se využívá k orientačním zkouškám. Průběh experimentu je shodný se standardním experimentem, ovšem nezaznamenává tolik bodů. Doba jednoho měření při zrychleném experimentu je asi 3 – 5 minut [5].

4.2 Příprava vzorků

Byly připraveny zásobní roztoky všech použitých látek. Při přípravě roztoků hyaluronanu bylo potřeba roztok opatrně rozmíchat, protože dlouhé řetězce potřebují ke svému dobrému rozpuštění a hydrataci minimálně 24 hodin. Koncentrace hyaluronanu ve všech vzorcích byla 0,1 %hm. Připravené zásobní roztoky byly v označených nádobkách uchovávány v lednici, aby se snížilo riziko degradace vlivem mikroorganismů. Za tímto účelem byly roztoky hyaluronanu stabilizovány azidem sodným. Roztoky tenzidů a NaCl byly uchovávány při laboratorní teplotě.

Jako rozpouštědlo byla použita injekční voda dodávaná výrobcem *Fresenius Kabi* (šarže WA 3322) o hodnotě povrchového napětí $\gamma = 71,5 \text{ mN/m}$.

Tab. 2 Použité chemikálie

	Výrobce	šarže	M_r
HA	CPN, s.r.o.	050407	90,53 kDa
HA	CPN, s.r.o	210306	1,434 MDa
TTAB	Sigma Aldrich	1377175	336,41 g/mol
CTAB	Sigma Aldrich	140650	364,46 g/mol
NaCl	Lach-Ner, s.r.o.	30677	58,44 g/mol

CMC pro CTAB ve vodě je $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pro TTAB je tato hodnota $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. V případě vzorků připravených v $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl jsou hodnoty CMC zhruba o řád nižší, tedy $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, respektive $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ [18].

S ohledem na CMC tenzidů byly navrženy koncentrační řady roztoků, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 3 Koncentrace měřených roztoků

CTAB v NaCl $c(\text{CTAB}, \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1})$	CTAB ve vodě $c(\text{CTAB}, \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1})$	TTAB v NaCl $c(\text{TTAB}, \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1})$	TTAB ve vodě $c(\text{TTAB}, \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1})$
0,001	0,025	0,05	0,25
0,005	0,05	0,1	0,5
0,01	0,1	0,5	1
0,025	0,25	0,1	2,5
0,1	1	2,5	5

Do kádinek o objemu 25 cm^3 byly pipetovány roztoky v pořadí – hyaluronan, tenzid, rozpouštědlo (H_2O nebo $0,15\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaCl}$) tak, aby výsledný objem činil 20 cm^3 . Poté byly kádinky umístěny do třepačky a míchány po dobu 24 hodin.

4.3 Nastavení tenziometru a postup měření

Pro studium interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy byl zvolen standardní režim měření, tedy nastavení, kdy se zvětšuje čas na tvoření bubliny. Kapilára byla použita nerezová o vnitřním průměru $0,25\text{ mm}$. Nastavení kapiláry bylo provedeno tak, aby kapilára byla ponořena 4 mm pod hladinu. Časové rozmezí bylo ponecháno maximální, tedy od 10 ms do 10 s . Před každým měřením byl proveden test funkčnosti přístroje a kontrola kapiláry. Před měřením samotných vzorků bylo vždy proměřeno čisté rozpouštědlo (voda, resp. $0,15\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ NaCl}$).

Koncentrační řady byly měřeny od nejzředěnějšího roztoku po nejkoncentrovanější. Každý vzorek byl měřen třikrát pro eliminování případných náhodných chyb. Mezi každým měřením byla kapilára očištěna.

Po skončení měření a očištění částí přístroje bylo vždy zapnuto automatické vnitřní vysoušení kapiláry. Uložená data byla následně exportována do Excelu a dále zpracovávána.

4.4 Zpracování dat

Veškerá data z měření byla zpracovávána pomocí MS excel. Byly sestrojeny grafy závislosti povrchového napětí na době života bubliny, grafy se závislostí povrchového napětí na převrácené druhé mocnině doby života bubliny. Dále byly spočítány difúzní koeficienty D a vyneseny v závislosti na době života bubliny. Difúzní koeficienty se počítaly podle vztahu [19]:

$$D = \frac{\pi \left[\frac{\gamma(0) - \gamma(t)}{2RTc} \right]^2}{t}, \quad (7)$$

kde $\gamma(0)$ je povrchové napětí čistého rozpouštědla, $\gamma(t)$ je povrchové napětí v čase t , c je koncentrace tenzidu, R je univerzální plynová konstanta, π je Ludolfovo číslo a T je absolutní teplota.

Při srovnání tří měření v jednom grafu se ukázalo, že odchylky byly zanedbatelné, proto pro sestrojování grafů byla vždy využita data jen z jednoho měření. Průměrování dat by bylo obtížné, protože časy života bubliny se měnily.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Pozorování

5.1.1 Zákal a gelace

U některých roztoků docházelo k zákalu nebo ke gelaci a to již při pipetování tenzidu do připravovaného vzorku. Ve všech takových případech byl zákal trvalý i po 24 hodinách míchání. Tyto vzorky nebyly proměřovány na tenziometru, protože získaná data by byla zkreslena.



Obr. 10 Čirý, zakalený a zgelovatělý vzorek

Při přidavku většího množství tenzidu dojde pravděpodobně k několikanásobným interakcím a vznikající agregáty už jsou natolik objemné, že se objevuje zákal. Seznam vzorků připravených ve vodném prostředí, u nichž se objevil zákal nebo gelace, je uveden v tabulce 5. Vzorky u kterých se objevil zákal nebo gelace v prostředí $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 4 Vzorky u nichž se objevil zákal nebo gelace ve vodném prostředí

tenzid	koncentrace	HA	zákal/gelace
CTAB	0,25 mM	90 kDa	gelace
CTAB	1 mM	90 kDa	gelace
CTAB	0,25 mM	1400 kDa	gelace
CTAB	1 mM	1400 kDa	gelace
TTAB	1 mM	90 kDa	zákal
TTAB	2,5 mM	90 kDa	zákal
TTAB	5 mM	90 kDa	gelace
TTAB	1 mM	1400 kDa	gelace
TTAB	2,5 mM	1400 kDa	gelace
TTAB	5 mM	1400 kDa	gelace

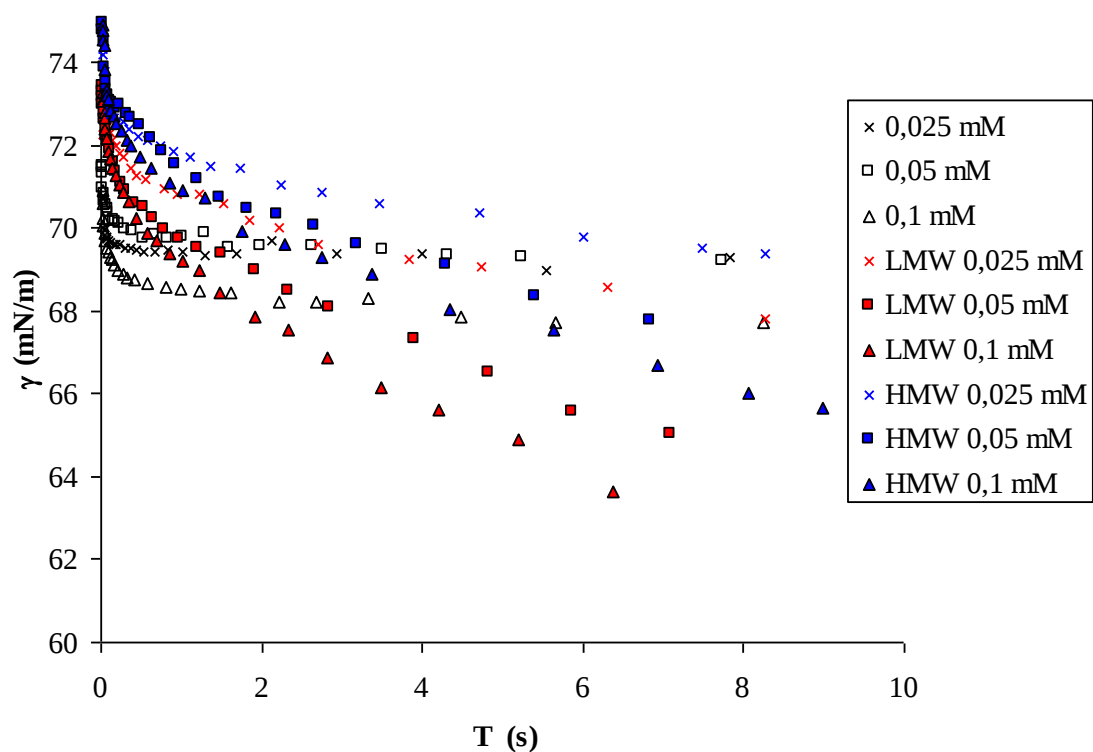
Tab. 5 Vzorky u nichž se objevil zákal nebo gelace v 0,15 mol·l⁻¹ NaCl

tenzid	koncentrace	HA	zákal/gelace
TTAB	0,5 mM	1400 kDa	zákal
TTAB	1 mM	1400 kDa	zákal
TTAB	2,5 mM	90 kDa	gelace
TTAB	2,5 mM	1400 kDa	gelace

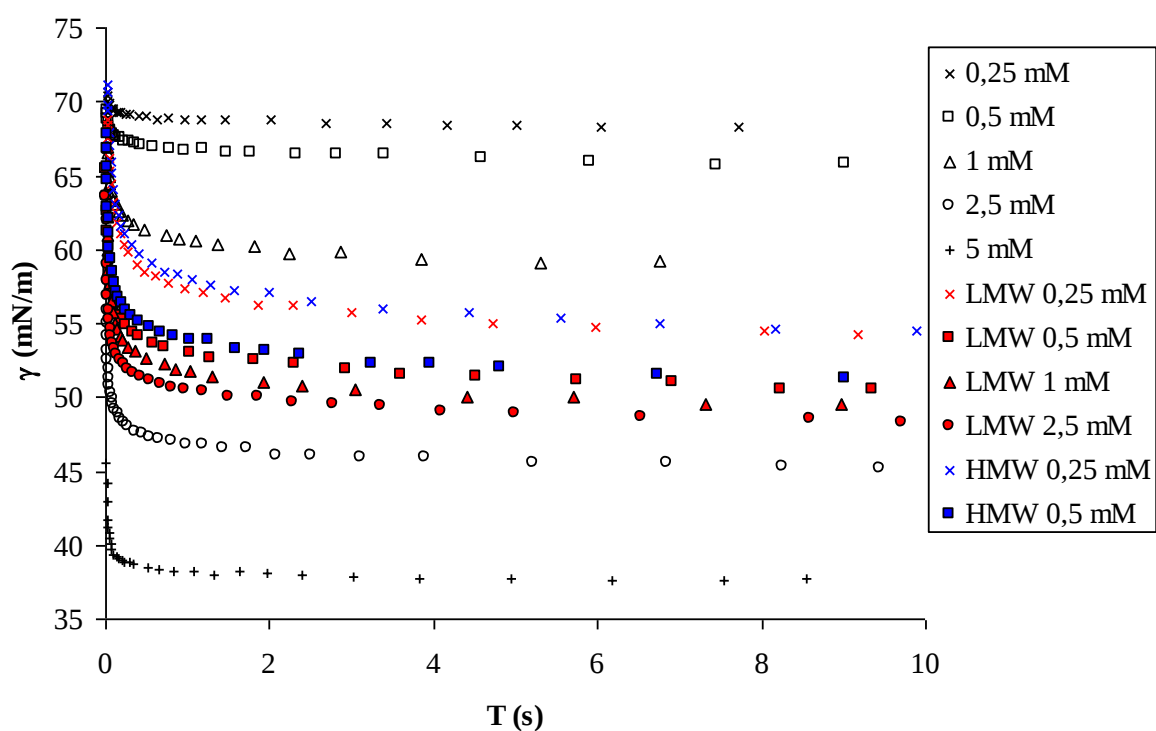
Je zřejmé, že více zakalených nebo zgelovatělych vzorků vzniklo ve vodném prostředí. U těchto vzorků byly použity vyšší koncentrace tenzidů (CMC má vyšší hodnotu). Ke vzniku zákalu nebo gelaci byly také více náchylné vzorky obsahující hyaluronan o vyšší molekulové hmotnosti.

5.2 Výsledky dle molekulové hmotnosti hyaluronanu

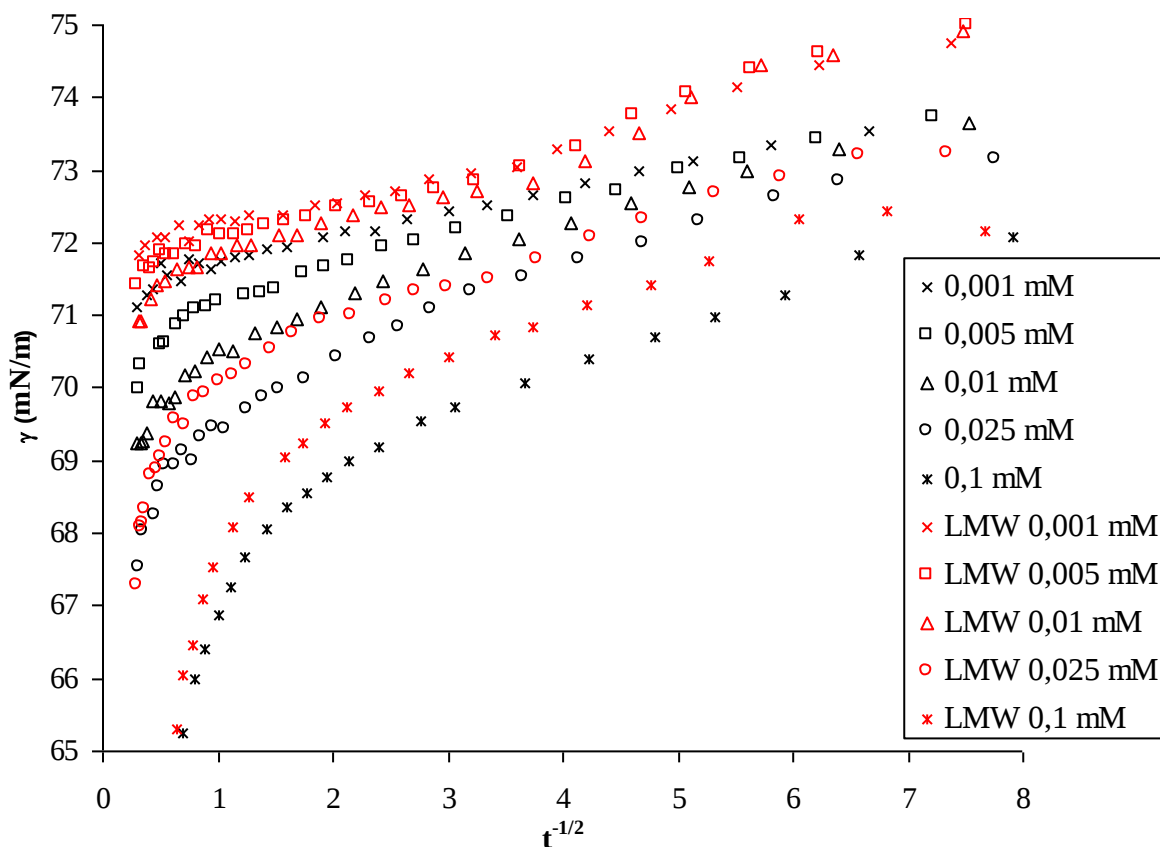
Z Obr. 11 je patrné, že hodnoty povrchového napětí u roztoků s přídavkem hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti (HMW), jsou vyšší než u roztoků s hyaluronanem o nižší molekulové hmotnosti (LMW). Při nižších koncentracích tenzidu tento jev není tolik patrný, protože hyaluronan má dostatek volných vazebných míst pro interakce s tenzidem. Při vyšších koncentracích tenzidu je při použití nízkomolekulárního hyaluronanu větší počet obsazených vazebných míst a tenzid zůstává v roztoku volně. Vysokomolekulární hyaluronan poskytuje dostatečný počet vazebných míst, a proto je tedy možné zaznamenávat vyšší hodnoty povrchového napětí. Tento jev se však objevuje pouze u roztoků, kde bylo jako rozpouštědlo použita voda. V roztocích s NaCl tento jev není tolik patrný, nebo je situace přesně opačná (Obr. 12). NaCl totiž pravděpodobně způsobí smrštění dlouhých řetězců hyaluronanu a tím dojde ke snížení počtu dostupných vazebných míst.



Obr. 11 Závislost povrchového napětí na době života bubliny pro CTAB v H_2O pro různé koncentrace tenzidu



Obr. 12 Závislost povrchového napětí na době života bubliny pro TTAB v H_2O pro různé koncentrace tenzidu



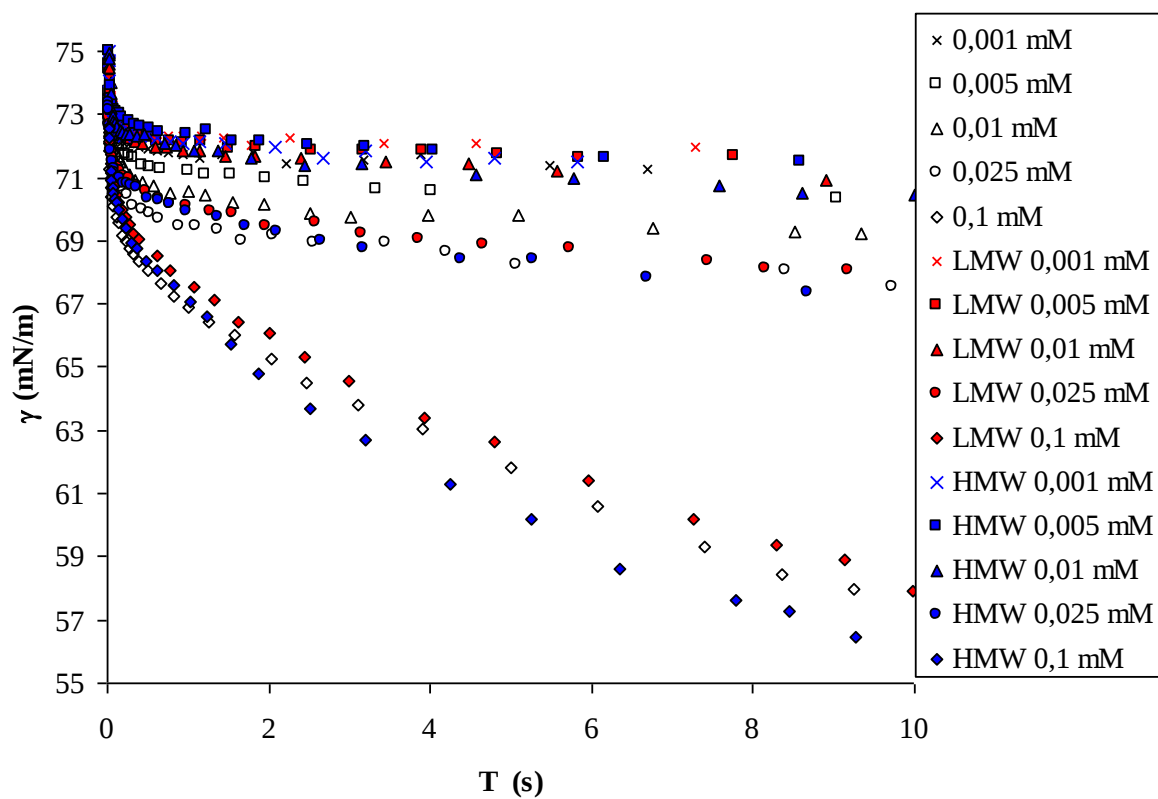
Obr.13 Závislost povrchového napětí na převrácené hodnotě odmocniny z času života bubliny v NaCl s LMW hyaluronanem a bez hyaluronanu

Na Obr. 13 je dobře vidět, že k interakcím dochází. Povrchové napětí roztoku tenzidu bez přítomnosti hyaluronanu je nižší, než za přítomnosti hyaluronanu.

5.3 Vliv délky řetězce tenzidu

Výsledky dále ukázaly, že povrchové napětí se v závislosti na době života bubliny rychleji ustaluje, pokud je v roztoku přítomno TTAB (Obr. 11 a 12). Povrchové napětí u roztoků s TTAB vykazuje téměř konstantní hodnoty od přibližně 2 s života bubliny. Je tedy patrné, že volný TTAB je schopný zaplnit povrch bubliny už během této doby. Oproti tomu hodnoty povrchového napětí u roztoků CTAB klesají v celém rozsahu měření a čím je koncentrace tenzidu větší, tím je tento jev znatelnější. Z tohoto hlediska lze vyvodit, že TTAB je v roztoku mnohem pohyblivější než CTAB a při tvorbě nového povrchu se TTAB téměř okamžitě na tento povrch přemísť. Větší pohyblivost TTAB souvisí s délkou uhlíkatého řetězce, kde je počet uhlíků 14, v případě CTAB je počet uhlíků 16.

5.4 Vliv iontové síly roztoku



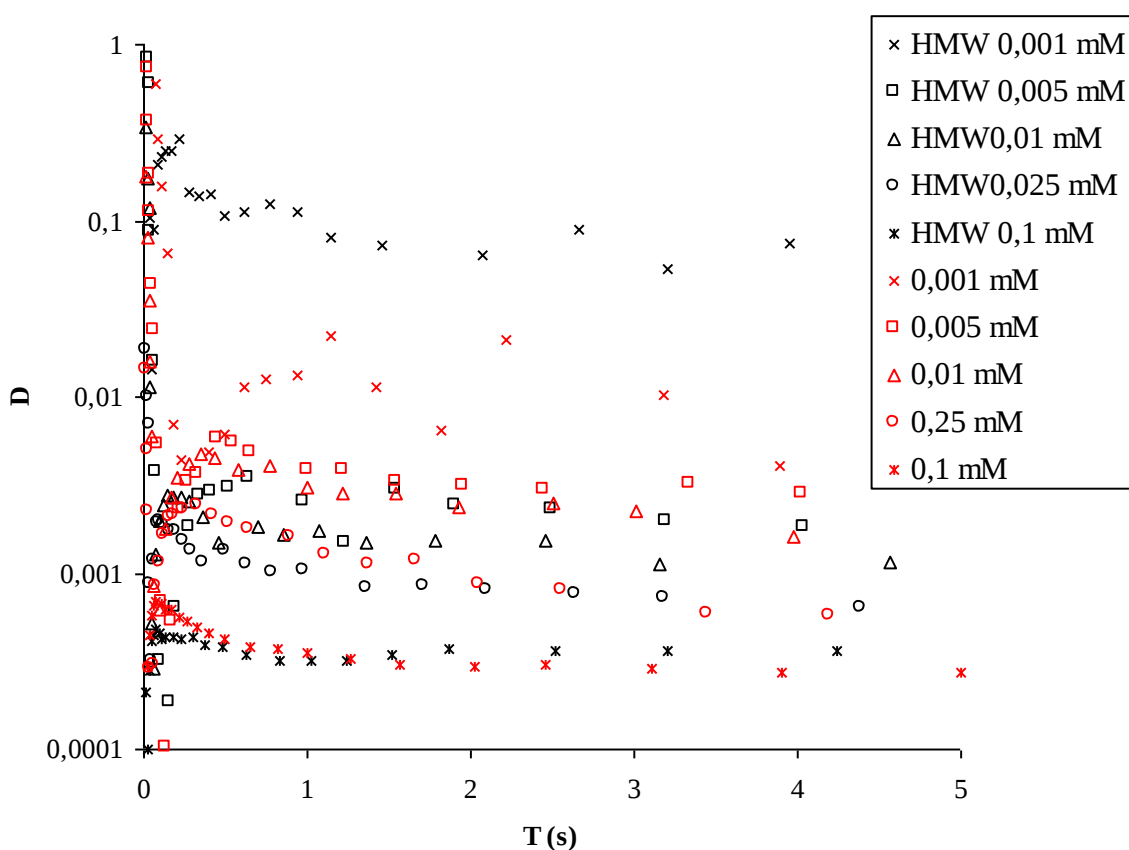
Obr. 14 Závislost povrchového napětí na době života bubliny pro CTAB v $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ pro různé koncentrace tenzidu

Při srovnání Obr. 11 a 14 lze sledovat vyšší pokles povrchového napětí u roztoků ve vodném prostředí. Tento jev pravděpodobně souvisí se třemi faktory:

- přítomnost NaCl v roztoku posune disociační rovnováhu, čímž nebude docházet k tak razantnímu uvolňování Na^+ iontů z karboxylových skupin na hyaluronanu, jako v případě vzorků ve vodě
- řetězec hyaluronanu se smrští vlivem elektrostatických sil a tím dojde k nevhodné prostorové konformaci, vazebná místa jsou pak blokována
- pokles povrchového napětí může být menší vlivem viskozity roztoku, kdy se tenzidy pomaleji dostávají na povrch bubliny

Z hlediska cílené distribuce léčiv je tento jev nežádoucí, přesto však nevyhnutelný. Léčiva je nutné dodávat ve fyziologickém roztoku, tedy v roztoku NaCl o koncentraci přibližně $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vlivem zmíněného jevu jsou tedy kladeny vyšší nároky na spotřebu hyaluronanu pro přípravu léčiv.

5.5 Difúzní koeficient



Obr. 15 Difúzní koeficient v závislosti na době života bubliny pro CTAB v NaCl

Na Obr. 15 lze pozorovat, že difúzní koeficient je při nižších koncentracích tenzidu nižší za přítomnosti hyaluronanu, při vyšších koncentracích tenzidu už rozdíly nejsou tolik patrné.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat, do jaké míry probíhají interakce mezi hyaluronanem a kationickými tensidy CTAB a TTAB. Tyto interakce byly zkoumány dynamickou tenziometrickou metodou maximálního tlaku v bublině při zvyšujícím se čase života bubliny.

Ve všech byl přítomen hyaluronan o koncentraci 0,1 %hm a byl sledován pokles povrchového napětí po přidavku tensidu. Důležitou roli hrála iontová síla roztoku.

Bylo experimentálně prokázáno, že interakce probíhají snáze v roztocích s malou iontovou silou (v tomto případě ve vodě). V roztocích s přítomností NaCl probíhají interakce obtížněji, protože dochází k deformaci prostorové struktury řetězce hyaluronanu a tím dochází ke snížení počtu dostupných vazebných míst.

Množství interakcí záleží i na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Vysokomolekulární hyaluronan na sebe dokáže navázat více tensidu ve vodném prostředí, při přítomnosti NaCl v roztoku vykazuje více interakcí nízkomolekulární hyaluronan.

Z dynamického hlediska byl pohyblivější tensid TTAB, který má oproti CTAB na uhlíkatém řetězci o dva uhlíky méně. Zmíněné se projevovalo rychlejším ustalováním povrchového napětí při zvyšujícím se čase života bubliny. Ukázalo se, že v přítomnosti hyaluronanu mají tensidy v roztoku tendenci tvořit zákal či gel ještě dřív, než jejich koncentrace dosáhne CMC.

Oblast cílené distribuce léčiv je omezena na přípravu roztoků s přítomností NaCl, jak zde bylo prokázáno, interakce v tomto prostředí probíhají obtížněji. Množství interakcí se dá do určité míry zvýšit použitím hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti. Otázkou ovšem zůstává, jak by interakce s hyaluronanem probíhaly při použití vysokomolekulárních sloučenin, případně jak zamezit zakalování a gelovatění roztoků.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Springer Science + Business Media*, 2006, v. 351, s. 2-10.
2. Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L. V., Ojima I.: Recent advantages in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 [online]. 2005, s. 5043-5054.
3. Torchilin, V. P.: Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73 [online]. 2001, 137-172p.
4. Bartovská, L., Šišková, M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*, 2005, s 57-59, ISBN 80-7080-579-X
5. KSV BPA 800P Manual, rev. 1.0. 2004
6. Viscoderm, K. hyaluronová. 2009, Dostupné z: <<http://www.viscoderm.cz/viscoderm/index.php?mid=1>>
7. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2009. Dostupné z: <<http://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/images/ExcSodiumHyaluronateC002.png>>
8. Essentials of Glycobiology, Hyaluronan, 2009. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch15&rendertype=figure&id=ch15.f5>>
9. Herslöf, K., Sundelöf, L., Edsman, K.: Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. *J. Phys. Chem.*, 1992, vyd. 96, č. 5, s. 2345-2348. ISSN 0022-3654
10. Ureš, T.: *Hyaluronan jako prostředek cílené distribuce léčiv* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 34 s.
11. Platt, V., Szoka, F.: Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor. *Mol. Pharmaceutics*, 2008, vyd. 5, č. 4, s. 477-486.
12. Cetrimonium bromide. 2002, Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cetrimonium+bromide&oldid=237099126>>
13. Wikimedia Commons. 2009, Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cetrimonium_bromide.png>
14. Bezpečnostní list pro CTAB. 2004, Dostupné z: <<http://www.fastiddna.com/documents/MSDSFoodDNAKitCTAB.aspx>>
15. Rangel-Yaqui, C., Pessosa, A., Tavares, L.: Micellar solubilization of drugs. *Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology*, Brazil: University of São Paulo, 2005, v. 8, s. 147-143
16. Xaimen XM-Innovation Chemical Co., Ltd., 2010. Dostupné z <http://xm-innovation.en.alibaba.com/product/222336235-200628994/Tetradecyl_Trimethyl_Ammonium_Bromide_TTAB_.html>
17. Wikimedia Commons. 2005, Upravené z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cetrimonium_bromide.png>

18. Sigma Aldrich, Detergents Properties and Applications, 2006. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15402/Detergent_Selection_Table.pdf>
19. Christov, N., Danov, K., Krachlevsky, P.: Maximum Bubble Pressure Method: Universal Surface Age and Transport Mechanisms in Surfactant Solutions. *Langmuir*, 2006, v. 22, č. 18, ISSN 7528-7542

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Použité zkratky

CD44	glykoproteinový receptor
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
HA	hyaluronan
HMW	vysokomolekulární hyaluronan
LMW	nízkomolekulární hyaluronan
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid

8.2 Použité symboly

γ	povrchové napětí
h	výška
ρ	hustota
r	poloměr
g	gravitační zrychlení
θ	smáčecí úhel
ϕ, f	korekční faktory
P	tlak
T	absolutní teplota
t	čas
D	difúzní koeficient
R	univerzální plynová konstanta