VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

INTERAKCE HYALURONANU A AMFIFILNÍCH MOLEKUL
INTERACTION BETWEEN HYALURONAN AND AMPHIPHILIC MOLECULES

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE
SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE Ing. TEREZA HALASOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.
SUPERVISOR

BRNO 2013

KLÍČOVÁ SLOVA

interakce, hyaluronan, cetyltrimetylamonium bromid, hydrofobně modifikované aminokyseliny, fluorescence, termogravimetrie, reologie

KEYWORDS

interaction, hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, hydrophobicaly modified amino acids, fluorescence, thermogravimetry, rheology

NÁZEV PRACOVIŠTĚ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

OBSAH

1 ÚVOD 5

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 5

2.1 Cílené nosiče léčiv 5
2.2 Nosiče na bázi hyaluronanu 6
2.3 Nosiče na hydrogelové bázi 7
2.4 Interakce polyelektrolyt - tenzid 8
2.5 Interakce hyaluronan – tenzid 8
2.6 Fluorescenční spektroskopie 9
2.6.1 Fluorescenční sondy..*9*
2.6.2 Fluorescenční korelační spektroskopie.....................................*10*
2.7 Reologie 11

3 MATERIÁLY A METODY 12

3.1 Materiály 12
3.2 Příprava vzorků 12
3.2.1 Metoda fluorescenční sondy...*12*
3.2.2 Fluorescenční korelační spektroskopie.....................................*12*
3.2.3 Termogravimetrie a reologie *13*
3.3 Metody a standardní vyhodnocení 13
3.3.1 Fluorescenční sonda pyren *13*
3.3.2 Fluorescenční korelační spektroskopie.....................................*14*
3.3.3 Termogravimetrie..*14*
3.3.4 Reologie...*14*

4 VÝSLEDKY A DISKUZE 15

4.1 Systémy hyaluronan – tenzid v roztoku 15
4.1.1 Mapování interakce Hya s různými tenzidy *15*
4.2 CTAB 15
4.2.1 Vliv hyaluronanu na agregaci CTAB ve vodě.............................*15*
Fluorescenční korelační spektroskopie 18
4.3 Hydrofobně modifikované aminokyseliny 19
4.3.1 Gelové systémy hyaluronan – tenzid.......................................*20*
Termogravimetrie...20
Relogie 22

5 ZÁVĚR...22

6 LITERATURA..25

7 ŽIVOTOPIS 30

8 ABSTRAKT...32

1 ÚVOD

Interakce hyaluronanu (Hya) a amfifilních molekul, téma této práce se zdá být poměrně konkrétní, je však pouhou částí mnohem obsáhlejšího výzkumu cílených nosičů léčiv, jejichž vývoj a uvedení do praxe je snahou mnoha výzkumníků po celém světě, kteří se snaží získat převahu v boji s rakovinou. Je alarmující jak běžnou se za poslední roky stala tato nemoc a dokazují to nejen statistiky Světové zdravotnické organizace, ale také čekárny onkologických ordinací.

Tato práce si klade za cíl alespoň částečně přispět k vývoji cílených nosičů léčiv a to prozkoumáním jednoho z potencionálně využitelných systémů. Čtenář se na jejích stránkách seznámí s výzkumem interakcí hyaluronanu a různých amfifilních molekul a to pomocí metody fluorescenční sondy. Dále pak je podrobně zkoumán průběh interakcí v jednom z vybraných systémů, k čemuž byla použita také jedna z nejmodernějších fluorescenčních metod – fluorescenční korelační psektroskopie (FCS). U tohoto systému pak byly provedeny také prvotní testy cytotoxicity.

Systémy v roztoku však nejsou jedinou náplní práce, její část se věnuje také kondenzovaným fázím vznikajícím právě na základě interakce mezi hyaluronanem a opačně nabitým tenzidem. Jak je uvedeno v rešerši, ani tyto systémy nemohou být jako potencionální nosiče léčiv opomenuty, ale naopak s sebou mohou nést některé výhody, jako je například prodložené uvolňování aktivní látky. Zkoumání základních vlasntostí těchto gelů a jejich termogravimetrické a reologické charakterizaci je pak věnována nezanedbatelná část práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 CÍLENÉ NOSIČE LÉČIV

Vývoj cíleného nosiče léčiva je poměrně složitou záležitostí z důvodu kombinace velkého množství požadavků na tento systém. Ten musí být biokompatibilní a biodegradabilní, pro účely cílené distribuce musí mít určitou velikost a popřípadě také schopnost interagovat specificky v místě účinku. Dalšími důležitými vlastnostmi jsou také netoxicita produktů jeho degradace a pokud možno co nejmenší sklon k jejich depozici v životně důležitých orgánech, která by je mohla poškozovat [1,2].

Aby byl splněn jeden za základních požadavků uvedených výše a bylo možno využít pasivního cílení, je pro nosič léčiva kritickou vlastností velikost. Tento názor sdílí i ***Fox M. a spol.*** [3] ve svém článku, kde zdůrazňují klíčovou roli tzv. "architektury" nosiče, zahrnující bilancování základních vlastností nosiče jako jsou právě velikost související s molekulovou hmotností a hydrodynamickým poloměrem ale také flexibilita polymerního řetězce, větvení a lokace připojené aktivní látky. Dle jejich názoru je právě velikost rozhodujícím faktorem řídícím rovnováhu mezi doručením aktivní látky do místa účinku na jedné straně a odbouráním nosiče metabolickými cestami přes játra nebo ledviny.

Pasivní cílení je tedy zajištěno samotnou velikostí nosiče a zabezpečeno právě jeho polymerní povahou. Aktivní cílení však souvisí se schopností nosiče nebo některé jeho části specificky interagovat s buňkami v rakovinné tkáni. Při zvážení všech požadavků a faktorů uvedených výše je hyaluronan považován za polymer vhodný pro cílenou distribuci léčiv a to ze dvou hlavních důvodů, které spolu logicky souvisí. Je to tělu vlastní polymer, u něhož je

biokompatibilita a biodegradabilita samozřejmostí a je schopen interagovat s buněčnými receptory a zajistit také díky svojí polymerní povaze oba druhy cílení [4].

Zvláště důležitou roli pak hraje specifický receptor pro hyaluronan s názvem CD 44 [5-7]. Tento transmembránový receptor důležitý pro proliferaci, migraci a angiogenezi buněk, se nachází na povrchu většiny savčích buněk. Ve výrazně větším počtu je pak hyperexprimován na buněčném povrchu velkého množství rakovinných buněk. Z toho důvodu jsou buňky tumoru na přítomnost hyaluronanu ve svém okolí velmi citlivé. Jedním z procesů, který CD 44 spouští je i endocytóza, která je pak základem pro úspěšný transport cíleného nosiče léčiva dovnitř rakovinné buňky [8-12].

Specifickou vazbou Hya na receptor CD 44 se zabývali ***Qhattal S. a spol.*** [13]. Konkrétně zkoumali liposomy s navázaným hyaluronanem a zabývali se vlivem jeho molekulové hmotnosti, hustoty navázaných řetězců hyaluronanu (Hya) a také hustoty hyperexprimovaných receptorů CD 44 na povrchu rakovinných buněk. Střední velikost konjugátů se pohybovala od 120 do 180 nm, přičemž rostla s rostoucí molekulovou hmotností (M_W) Hya. Zjistili, že vychytávání konjugátů je silně závislé na všech jmenovaných faktorech a že roste s M_W. Zároveň je účinnost konjugátů vyšší, než samotných liposomů bez Hya. Uvnitř buňky se pak konjugáty primárně hromadili v endozomech a lysozomech.

2.2 NOSIČE NA BÁZI HYALURONANU

Yim H. a spol. [14] připravili agregát polyetyleniminu a *trans*-retinové kyseliny pokrytého hyaluronanem. Průměrná velikost těchto částic byla 143 nm a v prostředí fosfátového pufru byly částice mnohem stabilnější v porovnání s částicemi bez obsahu kyseliny *trans*-retinové. Výsledky ukázaly, že v případě pokrytí konjugátu hyaluronanem došlo k výraznému snížení cytotoxity, která byla opět obnovena po enzymatické degradaci hyaluronanového obalu. S přihlédnutím k faktu, že enzym degradující hyaluronan, je v hojné míře zastoupen v nádorové tkáni, je pak tento systém uplatnitelní při léčbě nádorů hyperexprimujících CD44 receptor pro hyaluronan.

Kyselinu retinovou využili také ***Yao J. a spol.*** [15]**,** když jejím navázáním na kyselinu hyaluronovou vytvořili amfifilní molekulu (HRA). Na této bázi připravovali nanonosiče pro potenciální synergistickou chemoterapii kyselinou retinovou a paklitaxelem. HRA konjugát vykazoval vysokou solubilizační kapacitu, odpovídající „nano“ rozměry a dobrou biokompatibilitu. Testy viability buněk vykazovaly koncentrační a časovou závislost cytotoxicity. Tyto částice byly úspěšně pohlcovány endocytózou a poté transportovány do jádra buňky. Navíc *in vivo* zobrazování prokázalo jejich akumulaci v tumoru.

Surace C. a spol. [16] připravili lipoplexy obsahující konjugát kyseliny hyaluronové s dioleoylfosfatidyletanolaminem (Hya-DOPE) pro léčení rakoviny plic. K jejich přípravě byly použity kationtové liposomy složené ze směsi [2-(2,3-didodecyloxypropyl)hydroxyetyl] amonium bromidu (DE) a DOPE. Velikost lipoplexů se pohybovala v rozmezí od 250 do 300 nm. Prokázali, že pokud je na povrchu buňky přítomen CD44 objevuje se výrazný nárůst transfekce, demonstrující možnosti cílení pro genovou terapii. ***Platt V. a spol.*** [17] ve svém přehledovém článku uvádí případy, ve kterých byl hyaluronan použit jako nosič léčiva a jako ligand na liposomech. Léčiva „doručená“ Hya modifikovanými liposomy vykazovaly výbornou účinnost jak *in vitro*, tak na modelových nádorech u myší.

Datir R. S. a spol. [18] se zabývali přípravou, charakterizací a biologickým hodnocením konjugátů multilamelárních karbonových nanotrubiček s hyaluronanem nesoucích doxorubicin. Molekula aktivní látky byla na tyto konjugáty vázána π-π vrstvením. Konjugát

byl poté naznačen fluorescenčními barvivy s emisí v blízké infračervené oblasti. Tyto konjugáty vykazovaly více než třikrát větší toxicitu a zvýšenou apoptotickou aktivitu u zkoumaných buněk než volný doxorubicin v odpovídající koncentraci. Testy na myších prokázaly pětkrát větší inhibiční efekt na tumor plic než pro volný doxorubicin.

Dakdouki M. a spol. [19] se zabývali Hya povrstvenými super-paramagnetickými částicemi oxidu železa. Tento systém spojuje výhody zobrazování a cíleného nosiče. Pokud je inkubován s rakovinnými buňkami, jsou tyto částice velmi rychle pohlceny a jejich internalizace proběhne ve větší míře než u částic, které povrstveny hyaluronanem nebyly. Vysoká magnetická relaxivita povrstvených částic spojená s podporou jejich pohlcení pak dovoluje zobrazení nádorových buněk magnetickou rezonancí. Na takové částice byl poté navázán doxorubicin přes linker reagující na kyselé prostředí. Zatímco samotné povrstvené částice byly netoxické, částice s navázaným doxorubicinem prokazovaly toxicitu, která byla navíc větší, než u volného doxorubicinu. Na takto připravený konjugát doxorubicinu reagovali nejen nádorové buňky citlivé na léčivo, ale také nádorové buňky, u nichž byla prokázána rezistence vůči aktivním látkám, což bylo způsobeno rozdílným mechanismem vychytávání a buněčné distribuce doxorubicinu volného a vázaného na částice s Hya.

2.3 NOSIČE NA HYDROGELOVÉ BÁZI

Jak ukazuje přehledový článek ***Vermonden T. a spol.*** [20] jako nosiče lze s úspěchem využít také hydrogely. V tomto smyslu se ***Xin W. a spol.*** [21] zabývali syntézou konjugátů nanogel-léčivo založených na cholesteryl-Hya. Tyto konjugáty výrazně zvyšovaly biodostupnost ve vodě slabě rozpustných aktivních látek. Nanočástice gelu (20-40 nm) s hydrofobním jádrem a poměrně velkou dávkou solubilizovaného léčiva (20 %) se tvoří po sonifikaci a vykazují uvolňování léčiva během hydrolýzy biodegradabilních esterových vazeb. Tyto nanogely vykazují dva až sedmkrát vyšší cytotoxicitu než samotné léčivo a to na rakovinných buňkách rezistentních vůči aktivní látce, které zasahují plíce a slinivku. Tyto nanogely byly úspěšně internalizovány díky endocytóze spuštěné receptorem CD44 a zároveň interakci buněčné membrány s cholesterolovými částmi nosiče.

Chen Y. a spol. [22] pracovali na termoresponzivním hydrogelovém systému vhodném pro injekční podání, který podléhá sol-gel fázovému přechodu po stimulaci tělesnou teplotou a zároveň má vylepšenou mechanickou odolnost a biokompatibilitu. Hexametylen-1,6-diisokyanát (HDI) byl navázán na řetězec Pluronic F127 (PF 127). Tento kopolymer byl poté inkorporován do kyseliny hyaluronové a byl tak vytvořen termoresponzibilní nanokompozitní hydrogel. *In vitro* a *in vivo* byl zjišťován profil uvolňování aktivní látky a efekt inhibice růstu nádorových buněk. Výsledky ukázaly, že tento systém podléhá sol-gel fázovému přechodu jakmile teplota překročí hranici 37 °C. Nanokompozitní polymer samovolně agreguje a tvoří micelární struktury o velikosti 100-200 nm. Uvolňování doxorubicinu z tohoto hydrogelu vykazovalo kinetiku nultého řádu a probíhalo plynule po 28 dní. Viabilita nádorových buněk a velikost tumoru výrazně klesaly s inkubační dobou.

Minaberry Y. a spol. [23] vytvářeli nanoporézní hydrogely kyseliny hyaluronové za pomocí lyofilizace. Zkoumali jejich vlastnosti ve smyslu jejich rozpustnosti a agregace ve vodném prostředí. Vytvořili hydrogelové matrice s gentamicinem disponující prodlouženým uvolňováním aktivní látky.

2.4 INTERAKCE POLYELEKTROLYT - TENZID

Jak ukazují výše uvedené práce, interakce hyaluronanu a amfifilních látek je jednou z potenciálních metod, jak připravovat cílené nosiče léčiv. Proto je zkoumat vlastnosti těchto konjugátů.

Nizri G. a spol. [24] studovali tvorbu nanočástic díky interakci aniontového polyelektrolytu (polyakrylátu sodného NaPA) s řadou opačně nabitých tenzidů s různou délkou řetězce (alkyltrimethylamonium bromidy C_nTAB). Vnitřní struktura nanočástic byla sledována přímým zobrazováním cryo-TEM, což ukazovalo agregáty hexagonálního tvaru s velikostí v řádu nanometrů. Pro interakci C_nTAB-NaPA bylo zjištěno, že nanočástice se formují v širokém koncentračním rozmezí tenzidu. Molární poměr náboje mezi tenzidem a polymerem ovlivňuje velikost a zeta potenciál vznikajících částic, avšak nemá výrazný efekt na vnitřní strukturu částic. Ta je ovlivněna délkou řetězce tenzidu, která předurčuje průměr částice stejně jako její vnitřní strukturu. Zdá se, že čím delší uhlíkový řetězec tenzidu je, tím větší je schopnost polymeru indukovat formaci agregátů.

Liu Z. a spol. [25] zkoumali efekt povahy elektrolytu (hydrofilní x hydrofobní) na interakci s opačně nabitým tenzidem. Dynamiku těchto interakcí simulovali za pomoci molekulárního modelování. Bylo zjištěno, že agregace tenzidů na hydrofilním polymeru je odlišná od agregace na polymeru hydrofobním. V prvním případě se komplexy tenzidu s polyelektrolytem mění od struktury podobné kartáčku, přes strukturu perlového náhrdelníku až k micelám. Tyto tyčinkovité micely, u nichž se polyelektrolyt obaluje kolem jejich povrchu, jsou strukturou objevující se pouze při použití hydrofilního polymeru. Pokud půjde o polyelektrolyt hydrofobní povahy, tvoří se kulovité micely a polymer penetruje do hydrofobního jádra komplexů.

Dongcui L. a spol. [26] použili k výzkumu koacervace ve směsích opačně nabitých polyelektrolytů a tenzidů systém kationtového polymeru JR 400 a anionaktivního tenzidu dodecylsulfátu sodného (SDS) ve vodě. Byly provedeny studie isotermální titrační kalorimetrií a na základě výsledků bylo zjištěno, že počátek fázové separace a tvorba koacervátů probíhá přibližně na hranici nábojové ekvivalence. Tento přechod je evidentní jako minimum na závislosti entalpie a také se projevuje objevením minoritní gelové fáze ve vzorku. Při vyšších koncentracích tenzidu se pak systém dostává do metastabilního režimu, ve kterém je jeho stabilita závislá na čase a také způsobu přípravy.

Práce ***Wang W. a spol.*** [27] se zaměřuje na systém kationicky modifikované hydroxyetyl celulózy (catHEC) a dodecylsulfátu sodného (SDS) ve formě hydrogelu vzniklého interakcí těchto látek. Bylo zjištěno, že právě hustota náboje má kritický vliv na solubilizační kapacitu a že difuzivita modelové látky je porovnatelná s volnými micelami, a to v širokém koncentračním rozmezí tenzidu.

2.5 INTERAKCE HYALURONAN – TENZID

Thalberg, K. a spol. [28-32] zkoumali podrobněji interakce mezi hyaluronanem a alkyltrimethylamonium bromidy s různě dlouhými alkylovými řetězci (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků). Využili k tomu metody fázové separace, vodivosti, NMR a solubilizace barviv. Výsledky ukazují, že na hyaluronan se váží tenzidy, které mají v uhlíkovém řetězci více než deset atomů a že jejich vázání začíná již při velmi malé koncentraci tenzidu. U tenzidů s kratším řetězcem je tvorba volných micel energeticky upřednostněna před vázáním tenzidu na hyaluronan. Získané výsledky vedou k domněnce, že díky interakci hyaluronanu a

kationtových tenzidů tohoto typu dojde ke tvorbě agregátů podobných micelám, které jsou vázány na kostře polyelektrolytu. Tyto agregáty jsou menší než volné micely tenzidu v roztoku bez přítomnosti polyelektrolytu. Tuto strukturu vystihuje model perlového náhrdelníku [33].

Při dosažení jistého stupně navázání tenzidu na hyaluronan však komplexy už nejsou dále rozpustné ve vodě a dochází k fázové separaci a vzniku precipitátů. Precipitát lze znovu rozpustit buď přídavkem velkého nadbytku tenzidu, nebo nízkomolekulárního elektrolytu. Z výsledků vodivostních měření plyne, že kromě molekul tenzidu je k řetězci hyaluronanu vázána také část bromidových protiontů. Z tohoto důvodu se mluví o agregátech s protionty dvojího druhu, a to bromidovými a karboxylátovými, náležícími polymeru. Disociované karboxylové skupiny totiž pravděpodobně snižují elektrostatickou repulzi mezi kladnými náboji tenzidu a následkem toho je micela vázaná na hyaluronanu stabilnější, než příslušná volná micela. Solubilizační testy potvrzují tento názor, protože komplexy tenzidu s hyaluronanem rozpouští hydrofobní barvivo i přesto, že přídavek barviva do systému může znamenat částečné rušení interakcí.

Dále byl zkoumán vliv délky alkylového řetězce tenzidu a molekulové hmotnosti polyelektrolytu na fázové chování systému alkyltrimetylamonium bromid a hyaluronan. Delší alkylový řetězec tenzidu má za následek rozsáhlejší dvoufázový region, zatímco snižování molekulové hmotnosti polyelektrolytu vede pouze k nepatrným změnám v jeho poloze. Celkově vzato nemá změna molekulové hmotnosti polymeru na fázový diagram výrazný vliv.

2.6 FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

2.6.1 Fluorescenční sondy

Stejný tým vedený ***Thalbergem K.*** [34] využil k výzkumu interakcí hyaluronanu a alkyltrimetylamonium bromidů také fluorescenční spektroskopii. Emisní spektra pyrenu v roztoku tenzidu s i bez obsahu hyaluronanu se ukázala být téměř shodná, což indikuje podobnou strukturu micel za nepřítomnosti i v přítomnosti hyaluronanu. Fluorescenční spektroskopie je obecně vhodnou metodou ke zkoumání interakcí tenzidů s jinými molekulami [35].

Yin D. a spol. [36] zkoumali pomocí fluorescenční spektroskopie interakce mezi hyaluronanem a tenzidy různé povahy, aniontový (SDS) a neionogenní (Tween 80, Cremophor EL). Z výsledků plyne, že Tween 80 a hyaluronan interagují vzájemně jen velmi slabě a Cremophor EL neinteraguje s hyaluronanem vůbec. Dále bylo zjištěno, že sodná sůl hyaluronanu ovlivňuje agregaci SDS stejně jako přídavek elektrolytu, CMC se snižuje.

Wang Y. a spol. [37] zkoumali pomocí pyrenu mikropolaritu hydrofobních domén v systémech tenzidů s dvěma hydrofobními řetězci ($C_{12}C_6C_{12}Br_2$) a s jedním hydrofobním řetězcem (dodecyltrimetylamonium bromid, DoTAB). Jako interagující polyelektrolyty použili polystyrensulfonát sodný (NaPSS) a polyakrylát sodný (NaPA) o různých molekulových hmotnostech. Při měření využívali koncentraci pyrenu 10^{-6} mol.dm^{-3}. Stejný autor pak tuto metodu využil také ke zmapování efektu přídavku soli na tvorbu komplexů mezi kationtovými tenzidy a aniontovými polyelektrolyty [38].

Časově rozlišené měření fluorescence pyrenu bylo pak využito pro výzkum tvorby polyelektrolytem indukovaných micel v článku ***Hanssona P. a Almgrena M.*** [39]. Jako polyelektrolyt použili polyakrylát sodný (NaPA) a na něj vázali dodecylpyridiniové ionty a dodecyltriemtylamoniové ionty.

Nizri G. a spol. [40] použili fluorescenční spektroskopii ke zkoumání interakcí mezi SDS a polydiallyldimetylamonium chloridu, která vede k vytvoření nanočástic dispergovaných ve vodě. Byla hodnocena struktura výsledných nanočástic a jejich schopnost solubilizovat hydrofobní molekuly. K testům solubilizace byl použit pyren. Nilská červeň byla použita jako solvatochromní sonda.

Kombinaci stejných sond využili také ***Dong Z. a spol.*** [41]. Používali je k charakterizaci fotoreverzibilních micel tvořených alginátem sodným, tetradecyltrimetylamonium bromidem (TTAB), α-cyklodextrinem a 4-fenylazobenzoovou kyselinou.

Nilskou červeň jako hydrofobní sondu využili také ***Liao X. a Higgins D.*** [42], kteří s její pomocí mapovali lokální složení filmů tvořených alkyltrimetylamoniovými bromidy s různou délkou uhlíkového řetězce (12, 14, 16 a 18) a polyvinylsulfátem draselným.

2.6.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Poslední dvě dekády znamenaly pro fluorescenční korelační spektroskopii období velkého růstu, zvláště pak v oborech koloidní chemie. Tato spektroskopická metoda se stala běžnou v mnoha odvětvích jako například chemie, molekulární biologie a medicínské obory. Využití této metodiky v biologicky orientovaném výzkumu bylo diskutováno v mnoha rozsáhlých rešerších [43-46]. Použití a podrobný popis této metody pro studium difúze lipidů a proteinů v modelových membránách publikovali ***Chiantia S. a spol.*** [47] a ***Sankaran J. a spol.*** [48]. Jedna z nejdůležitějších rešerší, zaměřená na koloidní a povrchovou chemii, byla vydána v roce 2012 [49]. Její autoři ***Koynov K. a Butt H. J.*** velice jasně a výstižně popsali současný stav využití FCS ve výše zmíněných oborech

Z prací zaměřených na využití modifikované fluorescenční korelační spektroskopie ve výzkumu hyaluronanu stojí za zmínku práce ***Masudy A. a spol.*** [50]. Autoři studovali difúzi fluorescenčních molekul ve vodném roztoku hyaluronanu pomocí FCS s kontrolovanou změnou objemu. Jako fluorescenční sondy zvolili alexa 488, rhodamin 123 a protein cytochrom C. Z jejich prací vyplývá, že molekuly v tomto prostředí vykazují prvky „anomální lokální difúze“, tzn., že difúzní koeficient je funkcí difúzní dráhy a difúzního času.

V literatuře jsou zmíněny i práce zabývající se chováním fluorescenčně značených polymerů v různých prostředích. Jedním z velmi důležitých článků je publikace ***Zettla U. a spol.*** z roku 2009 [51], která popisuje chování značeného polystyrenu rhodaminem B v polozředěném režimu. Difúze v tomto systému je studována z hlediska vlastní (termální pohyb jedné molekuly vůči okolí) a kooperativní difúze (pohyb velkého množství molekul v hustotním gradientu), které jsou získané pomocí fluorescenční korelační spektroskopie resp. dynamického rozptylu světla. V tomto článku je zmíněno využití kroskorelace mezi dvěma shodnými detektory z důvodu výhodného potlačení afterpulsingu (zpětná vazba fotonu na detektoru zkreslující signál). Zároveň zmiňuje nutnost korigovat experimentální data s přihlédnutím k fotokinetickým procesům kratším než 5 μs. Autoři své výsledky porovnávali s teoretickými modely (Lengevinova a Zobecněná Ornstein-Zernikeho rovnice) a dospěli k praktické aplikaci, kterou bylo nalezení minimální koncentrace nutné pro tvorbu nanovláken.

V literatuře hojně zmiňovaným značeným polymerem studovaným pomocí FCS je Schizofylan. Značení Schizofylanu rhodaminem 6G zmiňuje ***Leng X. a spol.*** [52]. Autoři v tomto článku studovali chování nativního a denaturovaného schizofylanu, ale při vyhodnocování autokorelačních funkcí se nezmiňují o kompenzaci tripletního stavu. ***Meunier F. a Wilkinson K. J.*** [53] ve své práci používali kromě schizofylanu i další polysacharidy (polygalaktouronovou kyselinu, sukcinoglykan a různé dextrany), které značili

rhodaminovouu zelení R6113. Cílem jejich práce bylo ukázat, že navrhovaný způsob modifikace neovlivňuje výsledky pro charakterizaci polymerů. Výsledky z FCS byly porovnávány z měření na AFM. Ani tito autoři nezmiňují korekci tripletního stavu na rhodaminu založené značky, ale pro proložení experimentálních dat použili model pro dvě nezávisle difundující komponenty a bez dalšího vysvětlení brali, dle zápisu rovnice, druhý difúzní čas, jako ten, který přísluší pohybu řetězce.

Pro FCS experimenty je možno použít množství rozmanitých fluoroforů. Mezi takové systémy patří polymerní částice (s kovalentně vázaným fluoroforem) [54-56], a částice bez nutnosti další modifikace jako kvantové tečky [57-60] a nanodiamanty [61,62].

2.7 REOLOGIE

Reologie se ukázala být také použitelnou při výzkumu interakcí polyelektrolyt-tenzid [63-66]. Např. práce ***Maestra A. a spol.*** [67] prezentuje detailní studii dilatačního viskoelastického modulu adsorbovaných vrstev tvořených β-kaseinem (BCS) a tenzidem na mezifázovém rozhraní voda-vzduch. Byly použity dva druhy tenzidů, a to neionický dodecyldimetylfosfin (C_{12}DMPO) a kationtový dodecyltrimetylamonium bromid (DoTAB). Povrchová dilatační viskozita a elasticita jsou velmi citlivé na složení adsorbovaných vrstev na mezifázovém povrchu. Pro dva studované systémy byly objeveny dva různé dynamické povrchové procesy, jejichž charakteristické frekvence jsou blízké 0,01 Hz a 100 Hz. Interakce mezi BCS a tenzidem modifikují strukturu náhodně svinuté struktury, kterou vykazuje kasein a to díky elektrostatickým a hydrofobním interakcím. To vede ke kompetitivní adsorbci komplexů BCS-tenzid s volnými molekulami tenzidu na povrchové rozhraní. S rostoucí koncentrací volného tenzidu klesá adsorbce proteinu.

Rinaudo M. a spol. [68] zkoumali interakce hyaluronanu a fibrinogenu také za pomocí reologie. Tento systém měl sloužit jako modelový pro interakce v systému polyelektrolyt-protein. Z výsledků plyne, že v tomto systému vzniká trojrozměrná síť a to na základě fyzikálního vázání. Po smíchání komponent totiž dochází k elektrostatickým interakcím. Celkově zkoumaný systém vykazoval nenewtonské viskoelastické chování.

Reologii ke zkoumání interakcí v systému Hya-CTAB využil také ***Fukada K. a spol.*** [69]. Výsledky ukázaly, že v tomto systému vznikají kompaktní komplexy obou složek, jejichž vnitřní viskozita je nízká. Velikost komplexů roste s rostoucí koncentrací tenzidu. Vlastnostmi hydrogelu z hlediska reologie se zabývali také ***Mourtas S. a spol.*** [70], kteří zkoumali vliv přídavku liposomů na vlastnosti hydrogelu založeného na hydroxymetylcelulóze. Přídavek liposomů výrazně zvýšil relaxační čas systémů, což znamená, že došlo k posílení elastického charakteru vzorků.

Jak je vidět u roztoků polymerů a gelových systémů jsou velmi důležité jejich tokové vlastnosti [71]. Pro hodnocení tokových vlastností takových viskoelastických kapalin pak existuje několik hlavních modelů. Srovnání mezi nimi provedl ***Garakani A. H. a spol***. [72] a to na systému aktivovaného kalu. Výsledky ukázaly, že čtyřparametrické modely jako je např. Cross a Carreu model jsou pro tyto nenewtonské systémy nejvhodnější i přesto, že hodnocení jejich konstant je poměrně obtížné. Cross model k hodnocení tokových vlastností matric tvořených polysacharidem a tenzidem využil také ***Bais D. a spol.*** [73].

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 MATERIÁLY

Použitý nativní i modifikovaný hyaluronan je produktem firmy Contipro Group. Jednalo se o následující molekulové hmotnosti nativního hyaluroanu:75 kDa, 106 kDa, 310 kDa, 650 kDa, 1,4 MDa, 90 kDa, 300 kDa, 700 kDa, 750 kDa, 806 kDa, 2 MDa.

Během práce byly také použity modifikované verze Hya. Jednu z nich představoval hydrofobné modifikovaný hyaluronan na jehož kostře byly navázány šestičlenné uhlíkové řetězce a to přes OH skupinu na pátém uhlíku *N*-acetyl-D-glukosmainu *AcylHex* (75 kDa, stupeň substituce 10%). V druhém případě se jednalo o rhodaminilaminohyaluronát sodný, kdy byla na kostru navázána fluorescenční značka v podobě rhodaminu 110 *rhHya* (50 kDa).

Jako amfifilní látky různých druhů byly použity: cetyltrimetylamonium bromid (CTAB), Tetradecyltrimetylamonium bromid (TTAB), cetyltrimetylamonium p-toluensulfonát (CTAT), TWEEN® 20, dodecylsulfát sodný (SDS), *n*-dodecyl-β-D-maltosid, Cetylbetain, BETADET® THC-2 .

Jako vývojové produkty dodané firmou Contipro Group k testování jejich agregačních vlastností a interakcí s hyaluronanem byly použity také hydrofobné modifikované aminokyseliny. Jednalo se o dodecylserin (Ser-C_{12}), dodecylglycin (Gly-C_{12}), didecylglutamovou kyselinu (Glu-C_{10}) a dioktylasparagovou kyselinu (Asp-C_8).

Jako fluorescenční sondy byly použity: pyren, 1,3-bis(1-pyrenyl)propan (P3P), *N,N*-diemtyl-6-propionyl-2-naftylamin (prodan), nilská červeň.

Jako ostatní hydrofobní i hydrofilní modelové látky byly použity: súdánová červeň G, merocyanin 540, metyloranž, thymolová modř, rhodamin B, D-mannitol, diklofenak sodná sůl, 2-metyl-1,4-naftochinon (Menadion), glycerol, paclitaxel, (±)-α-tokoferol, (−)-riboflavin.

Všechny zásobní roztoky a vzorky ve vodném prostředí byly připravovány za použití čisté vody (Miliphore: Mili-Q; Purelab: ELGA).

3.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ

3.2.1 Metoda fluorescenční sondy

Při práci s **fluorescenčními sondami** byl použit standardní způsob přípravy vzorků spočívající v použití zásobního roztoku sondy v těkavém rozpouštědle. Tyto zásobní roztoky fluorescenčních sond byly připraveny v acetonu a do čistých skleněných vialek byl pipetován daný objem roztoku, tak aby v konečném vzorku bylo dosaženo požadované koncentrace fluorescenční sondy. Pokud ve výsledcích není uvedeno jinak, je tato koncentrace sondy 10^{-6} mol.dm^{-3}. U některých vzorků byla použita i koncentrace sondy 10^{-7} mol.dm^{-3}.

Za sníženého tlaku bylo pak odpařeno těkavé rozpouštědlo a do takto připravených vialek se sondou byly připravovány vzorky o požadované koncentraci jednotlivých komponent a v požadovaném prostředí. Všechny vzorky byly poté ponechány na třepačce minimálně 24 hodin při laboratorní teplotě.

3.2.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Pro prvotní experimenty provedené pomocí **FCS** byl zvolen systém obsahující velmi nízkou koncentraci fluorescenčně značeného Hya. Jako fluorescenční značka zde sloužil kovalentně vázaný rhodamin 110 (rhHya, Contipro Group). Ve vzorcích byla použita konstantní koncentrace rhHya (86 μg.dm^{-3}) a proměnná koncentrace CTAB (15 μmol.dm^{-3} až

3 mmol.dm^{-3}) ve vodném prostředí. Koncentrace Hya byla volena tak, aby v detekčním objemu byly přítomny jednotky molekul fluorescenční značky.

Pro uvedené vzorky byly provedeny dvě série experimentů mapující chování systémů v neustáleném a ustáleném stavu. Jak vyplývá z rešerše, při vázání tenzidu na opačně nabitý polyelektrolyt existují při určitých koncentracích tenzidu v systému metastabilní stavy, jejichž struktura je závislá na teplotě, času a způsobu přípravy (*Dongcui L. a spol.* [26]). Jako pokus zmapovat odlišnosti v interakcích v těchto metastabilních stavech, byla jedna sada vzorků změřena ihned po smíchání obou komponent, a druhá sada vzorků byla ponechána ustálit minimálně 72 hod na třepačce. Vzhledem k velkému vlivu teploty na difúzní koeficienty byly všechny vzorky uchovávány a měřeny za laboratorní teploty (20,0 ± 0,5 °C).

3.2.3 Termogravimetrie a reologie

Vzorky gelových fází byly připravovány s Hya o M_W (300, 700 a 2000 kDa). Při těchto testech měl být jedním z parametrů poměr P/T, který k sobě vztahuje počet vazných míst na polyelektrolytu při jeho úplné disociaci (P) a počet jednolivých molekul tenzidu (T). Pro přípravu byly použity roztoky hyaluronanu a CTAB o různých koncentracích, tak aby se měnil poměr P/T (1, 4, 16) a zároveň aby vznikly dva vzorky se stejným poměrem P/T 4, ale při použití odlišných koncentrací výchozích roztoků. Zásobní roztoky příslušných koncentrací (Hya 0,5 a 2% hm. a CTAB 50 a 200 mmol.dm^{-3}) byly směšovány v poměru 1:1.

3.3 METODY A STANDARDNÍ VYHODNOCENÍ

3.3.1 Fluorescenční sonda pyren

Fluorescenční spektra pyrenu byla měřena na přístroji FLUOROLOG. Při měření emisních spekter byl excitační monochromátor nastaven na 336 nm. Ve spektru byly sledovány intenzity prvního (373 nm) a třetího (384 nm) maxima. Jejich poměr je jedním z vyhodnocovaných parametrů reagujících na polaritu a bude nadále označován jako EmPI (emisní polaritní index). Dalším parametrem je poměr fluorescence monomeru (první maximum při 373 nm) a excimeru, jehož maximum se ve spektru nachází při 470 nm. Tento poměr je označován jako Ex:Mo (excimer ku monomeru). Vypovídá jak o rozložení pyrenu v hydrofobních jádrech, tak o mikroviskozitě příslušného jádra [74].

U vzorků s pyrenem byly také měřeny excitační skeny s emisním monochromátorem nastaveným na 392 nm. Z těchto skenů byl vyhodnocován další parametr reagující polaritu a to poměr intenzit při 333 nm a 338 nm. Tento parametr bude nadále značen jako ExPI (excitační polaritní index). Závislosti EmPI a ExPI na koncentraci tenzidu vykazují u běžných tenzidů ve vodě sigmoidní charakter [75] a jsou proloženy Boltzmannovým modelm:

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

Parametry, které získáme pro daný model, jsou inflexní bod x_0, jehož souřadnice na ose x se bere jako hodnota CMC, I. a II. zlom charakterizující počátek a konec agregace a hodnoty A_1 a A_2 vyjadřujících horní a spodní limitu daného modelu. Posledním parametrem je Δx, které je přímo spojeno s rozsahem nezávislé proměnné (koncentrace tenzidu), ve kterém probíhá náhlá změna závislé proměnné (EmPI nebo ExPI). Tato hodnota charakterizuje jak strmý je pokles v klesající části křivky a vypovídá tak o průběhu samotné agregace.

3.3.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Pro experimenty byla použita následující konfigurace měřícího systému: excitační zdroj 512 nm s frekvencí 20 MHz, superapochromatický objektiv UPLSAPO 60XW s vodným imerzním prostředím, dichroický element odrážející excitační vlnovou délku a propouštějící emisní vlnové délky, emisní filtr (HQ520/35), detektory τ-SPAD1 a τ-SPAD2.

Z důvodů komplikovanosti zkoumaného systému rhHya – CTAB, byla data analyzována pomocí různých přístupů. Data byla měřena simultánně na dvou detektorech, a proto zde byla možnost jejich kroskorelace s potlačením pozadí pomocí FLCS filtru. Pro vyhodnocování byly zvoleny dva parametry - počet molekul ve sledovaném konfokálním objemu a difúzní čas. Oba tyto parametry lze získat na základě autokorelační funkce, kterou lze získat na základě proložení dat pomocí modelů integrovaných ve vyhodnocovacím programu.

3.3.3 Termogravimetrie

Gelovité fáze byly testovány na přístroji TGA Q50 (TA Intruments). Byly provedeny teplotní rampy 5 °C za minutu až do teploty 300 °C a to za vzduchové atmosféry o průtoku 60 dm^{-3} za minutu. Testy byly provedeny pro gely vzniklé smícháním různě koncentrovaných roztoků hyaluronanu (300, 700 a 2000 kDa) a tenzidu.

Vyhodnocovány byly následující parametry: jednalo se o teplotu příslušející inflexu prvního zlomu pro závislost hmotnosti na teplotě a tudíž o první maximum na derivované křivce. Tato teplota byla označena jako t_{inf1} a vyjadřuje teplotu při které je ze vzorku odpařena většina vody. Dalším parametrem je pak teplota $t_{poč1}$ udávající hodnotu teploty při které se voda ze vzorku začíná uvolňovat. Z konstantních oblastí na křivkách následujících po prvním maximu byla vyhodnocena hodnota sušiny v hmotnostních procentech označena jako $m_{suš}$. Analogicky byly vyhodnoceny i druhé zlomy a maxima, z nichž byly stanoveny parametry t_{inf2}, $t_{poč2}$ a m_{pop}. Zde se jedná o teploty charakterizující počátek degradace, spálení většiny vzorku a ustálenou hmotnost popela.

3.3.4 Reologie

Reologická měření byla provedena na reometru AR-G2. Využívána byla geometrie kužel-deska. V našem případě byl použit kužel s poloměrem 40 mm a zkosením 1 °. Všechny testy byly měřeny při teplotě vzorku 25 °C. Výchylka senzoru byla zvolena na 2 %.

Dále byly měřeny oscilační testy tzv. „frequency sweep“, které spočívaly v mapování závislosti paměťového a ztrátového modulu na měnící se frekvenci oscilace senzoru. Tyto byly provedeny v rozsahu frekvencí 20 až 0,01 Hz. U všech vzorků byly také zkoumány tokové vlastnosti, kdy byla sledována závislost viskozity na smykové rychlosti. Tato měření byla v závislosti na charakteru vzorku prováděna v rozmezí smykových rychlostí řádově od 10^{-5} do 10^{2} s^{-1}, což odpovídá rozmezí smykového napětí od jednotek do stovek Pa.

Pro vyhodnocení oscilačních testů byl použit generalizovaný Maxwellův model s pěti elementy. Díky tomu byly vyhodnoceny parametry pro jednotlivé články modelu. Jednalo se o relaxační časy $\lambda_{1\text{-}5}$ a složky jednotlivých modulů $G'_{1\text{-}5}$ a $G''_{1\text{-}5}$. Dále byla z naměřených závislostí vyhodnocena poloha tzv. překřížení, tj. bodu kde došlo k protnutí paměťového a ztrátového modulu. Pro vyhodnocení tokových závislostí, byl zvolen Cross model, který má čtyři parametry - limitní viskozitu při nekonečně malé smykové rychlosti η_0, limitní viskozitu při smykové rychlosti blížící se k nekonečnu η_∞, konstantu *K*, označovanou jako konzistence a uvedenou v sekundách a bezrozměrnou konstantu *m* označovanou jako rychlostní index.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 SYSTÉMY HYALURONAN – TENZID V ROZTOKU

4.1.1 Mapování interakce Hya s různými tenzidy

V první fázi výzkumu interakcí hyaluronanu a amfifilních molekul bylo provedeno mapování širší škály tenzidů. Výsledky těchto testů již byly publikovány [76]. Jednalo se o kationtový tetradecyltrimetylamonium bromid (TTAB), cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) a cetyltrimetylamonium *p*-toluensulfonát (CTAT), neionogenní monolaurát sacharózy, octyl-β-D-glukopyranosid, Tween 20, *n*-dodecyl-β-D-maltosid a aniontový dodecylsulfát sodný (SDS). Byly použity také tenzidy ze třídy zwitterionických betainů a to BETADET THC 2 a cetylbetain. Tyto testy byly provedeny pomocí dvou fluorescenčních sond (pyren a nilská červeň) a to ve fyziologickém roztoku (0,15 mol.dm^{-3}).

Výsledky ukázaly, že i v přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu dochází ve vybraných systémech k interakci, což se projevilo změnami ve zkoumaných parametrech, tj. na EmPI pyrenu a dále na intenzitě nilské červeně a také poloze jejího fluorescenčního maxima. Všechny zkoumané parametry však shodně poukazují na fakt, že tvorba agregátů probíhá spíše v jistém koncentračním rozmezí tenzidu, než při jediné diskrétní koncentraci. Bylo by tedy přesnější mluvit o agregačním regionu a to zvláště v případě, že systém obsahuje hyaluronan, jehož hlavním efektem bylo totiž rozšíření tohoto agregačního regionu.

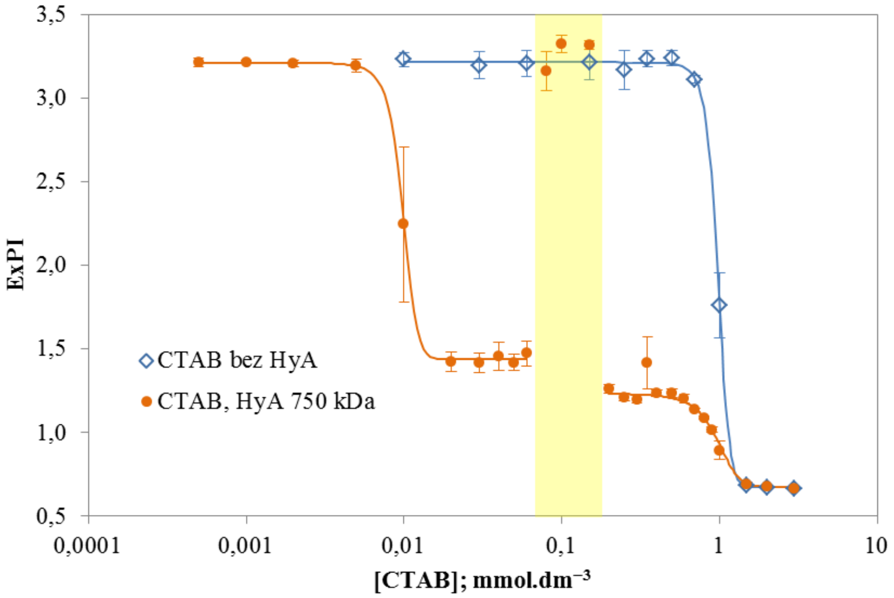
Z výše uvedeného výčtu použitých tenzidů byly největší rozdíly mezi systémem samotného tenzidu a systémem obsahujícím hyaluronan zaznamenány pro neionogenní Tween 20 a kationtový CTAB.

4.2 CTAB

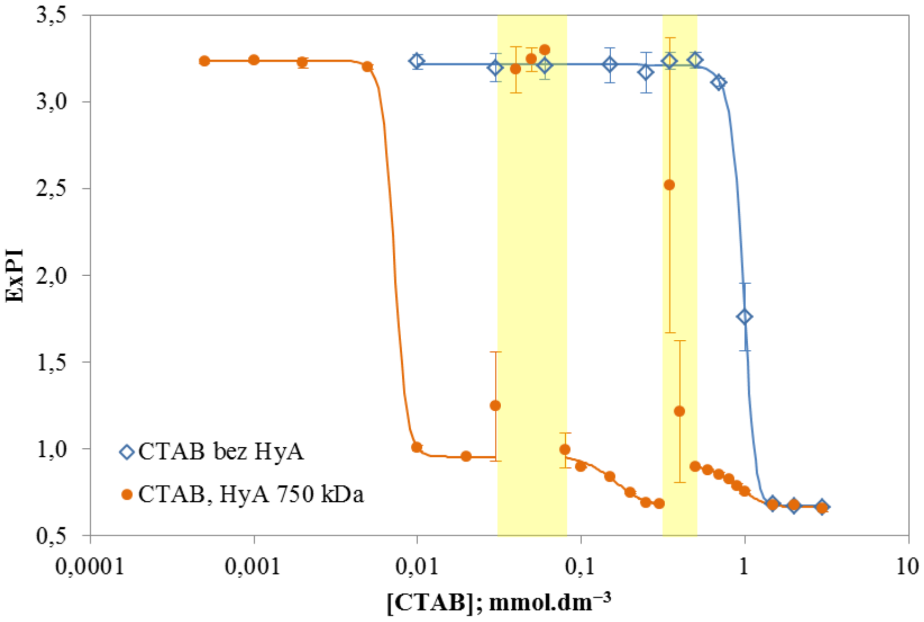
4.2.1 Vliv hyaluronanu na agregaci CTAB ve vodě

Na **obr. 1** je zobrazen vliv přídavku Hya 750 kDa o konstantní koncentraci 5 mg. dm^{-3} na agregační chování CTAB ve vodě. V tomto případě byl použit pyren o koncentraci 10^{-7} mol.dm^{-3}, aby ovlivnění systému bylo co nejmenší. Koncentrace hyaluronanu je v tomto případě velice nízká, ale i tak je vidět značné ovlivnění agregačního procesu. Pro srovnání je v grafu uvedena také závislost ExPI na koncentraci samotného tenzidu ve vodě. Jak můžeme vidět, obě křivky mají horní limitu při stejné hodnotě ExPI, což v podstatě znamená, že v obou případech nejsou v počátečních vzorcích vytvořeny žádné agregáty schopné ve svém hydrofobním jádře solubilizovat pyren.

Vlivem přídavku hyaluronanu pak dochází na závislosti ke zlomu, který je o dva řády posunut k nižším hodnotám koncentrace tenzidu oproti závislosti ve vodě. Tento zlom charakterizuje tzv. indukovanou agregaci tenzidu. Díky elektrostatickému vázání kladně nabité hlavy tenzidu na záporně nabitou disociovanou karboxylovou skupinu hyaluronanu dochází ke zvýšení lokální koncentrace tenzidických molekul právě kolem řetězce polyionu. Tím se dostávají do kontaktu také hydrofobní řetězce a dochází zde k vytvoření indukovaných micel vázaných na řetězci. Při dalším postupném zvyšování koncentrace tenzidu dochází postupně k vysycování dalších vazných míst na řetězci a ve chvíli, kdy je překročena mezní hranice, dojde k fázové separaci. Ta je v grafu vyznačena žlutou oblastí, ve které se hodnoty ExPI vrací k hodnotám charakteristickým pro vodné prostředí.



Obr. 1: Vliv přídavku hyaluronanu (750 kDa, 5 mg. dm^{-3}) na agregační chování CTAB ve vodě. Žlutě je vyznačena oblast fázové separace.



Obr. 2: Vliv přídavku hyaluronanu (750 kDa, 15 mg. dm^{-3}) na agregační chování CTAB ve vodě. Žlutě jsou vyznačeny oblasti fázové separace.

V této oblasti totiž vzniká tzv. koncentrovaná fáze v podobě gelu usazujícího se na stěnách vialky. Fluorescenční sonda pak zůstává zachycena právě v agregátech vázaných v této gelové fázi a signál, který získáme je pouze signálem zbytkového pyrenu ve vodném prostředí supernatantu. Při dalším zvýšení koncentrace tenzidu dochází k narušení rovnováhy a gelová fáze se opět rozpouští. V roztoku se pak začínají tvořit volné micely. To potvrzuje i fakt, že křivka s přídavkem hyaluronanu klesá ke stejným hodnotám jako křivka odpovídající

tvorbě volných micel CTAB ve vodném roztoku. Podobné výsledky pro systém obsahující hyaluronan a opačně nabitý tenzid nebyly dosud prezentovány.

Obrázek 2 ilustruje situaci s použitím vyšší koncentrace (15 mg.dm^{-3}) Hya o stejné molekulové hmotnosti 750 kDa. Jak je vidět na první pohled, v grafu jsou dvě oblasti fázové separace, což je hlavním rozdílem oproti předchozím vzorkům s nižší koncentrací Hya. Oblast fázové separace je v grafu vyznačena žlutě. Jedná se o rozmezí koncentrací CTAB od 0,04 do 0,06 mmol.dm^{-3} a je vidět, že k první fázové separaci při použití vyšší koncentrace Hya, dochází při nižších koncentracích tenzidu.

Tento jev naznačuje, že systému dochází k nasycení hraničního množství vazných míst na hyaluronanu způsobujícímu fázovou separaci dříve, než při použití nižší koncentrace hyaluronanu. To by odpovídalo spíše kombinaci výše uvedených faktorů, tedy tvorbě většího počtu micel vázaných na řetězec, které kompenzují větší počet disociovaných karboxylových skupin na řetězci a zároveň mají nižší polaritu.

Pro ostatní použité koncentrace Hya 750 kDa 30 mg. dm^{-3}, 50 mg. dm^{-3} a 100 mg. dm^{-3} tvar všech naměřených závislostí odpovídá průběhu křivek pro koncentraci 15 mg. dm^{-3}. U všech těchto závislostí se také vyskytují dvě oblasti fázové separace. Data naměřená pro různé koncentrace Hya se liší jen v koncentračních oblastech fázové separace.

Tab. 1: Shrnutí CAC a CMC

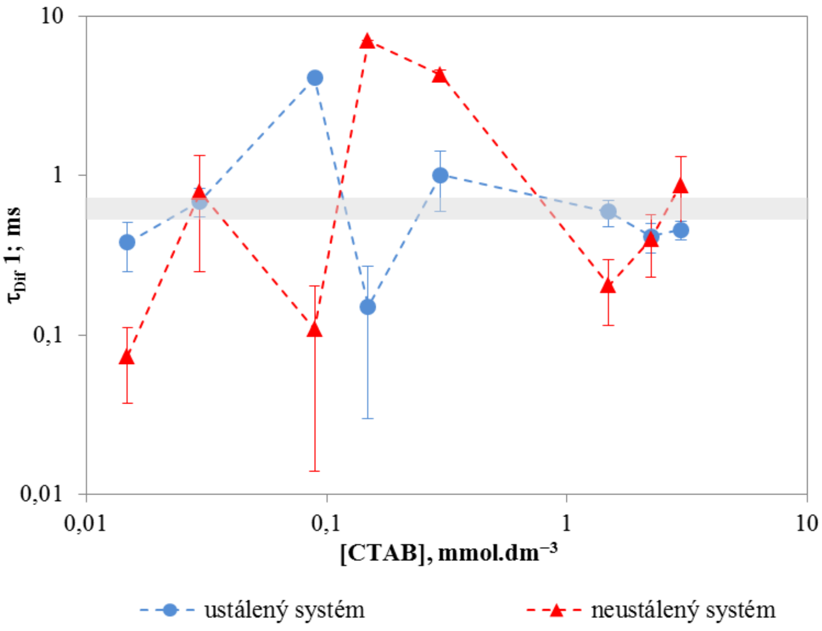
M_w Hya; kDa	[Hya]; mg. dm^{-3}	CAC; mmol.dm^{-3}	CMC; mmol.dm^{-3}
750	5	0,009 ± 0,001	0,92 ± 0,7
90	15	0,007 ± 0,001	0,79 ± 0,02
750	15	0,007 ± 0,001	0,77 ± 0,16
2000	15	0,008 ± 0,001	0,74 ± 0,13
750	30	0,014 ± 0,001	0,74 ± 0,08
750	50	0,014 ± 0,001	0,81 ± 0,15
750	100	0,009 ± 0,001	0,97 ± 0,01
voda		–	0,98 ± 0,01

Závěrem této kapitoly je uvedena přehledová **tab. 1** shrnující hodnoty CAC a CMC naměřené při použití jak různých koncentrací, tak různých molekulových hmotností hyaluronanu. Hodnoty jsou průměrem hodnot získaných z parametrů Boltzmannových modelů pro závislosti EmPI a ExPI. Jak je vidět hodnota CAC je o dva řády posunutá oproti hodnotě CMC. Hodnota CAC ani CMC se pak pro různé použité M_W hyaluronanu v rámci chyby nemění. Molekulová hmotnost tedy na chování systému nemá vliv. Pokud budeme sledovat změny CAC s rostoucí koncentrací Hya, zjistíme, že dochází k mírnému zvýšení CAC pouze u koncentrací Hya 30 mg.dm^{-3} a 50 mg.dm^{-3}. Jinak se hodnota kritické agregační koncentrace téměř nemění. K velkým změnám nedochází ani v hodnotě CMC. U takto složitého systému je podobnost hodnot zarážející a vede k domněnce, že řídícím faktorem v agregaci CTAB je právě koncentrace samotného tenzidu a že přídavek Hya sice způsobuje indukovanou tvorbu vázaných micel, ale kdy se tyto micely vytvoří, záleží čistě na koncentraci tenzidu.

Fluorescenční korelační spektroskopie

Pomocí FCS byly sledovány charakteristiky difundujících molekul a částic v systému obsahujícím rhodaminem značený hyaluronan (rhHya) ve vodě. Jeho koncentrace byla ve vzorcích konstantní (86 μg.dm^{-3}), a byla vybrána tak, aby se v detekčním objemu nacházely jednotky molekul vázané fluorescenční značky. Koncentrace tenzidu se naopak lišila a to v rozmezí od 15 μmol.dm^{-3} až 3 mmol.dm^{-3} které postihuje oblast CAC a fázových separací. Tyto systémy byly prozkoumány v neustáleném stavu ihned po smíchání komponent a ustáleném stavu, kdy byly vzorky ponechány 72 hod na míchačce.

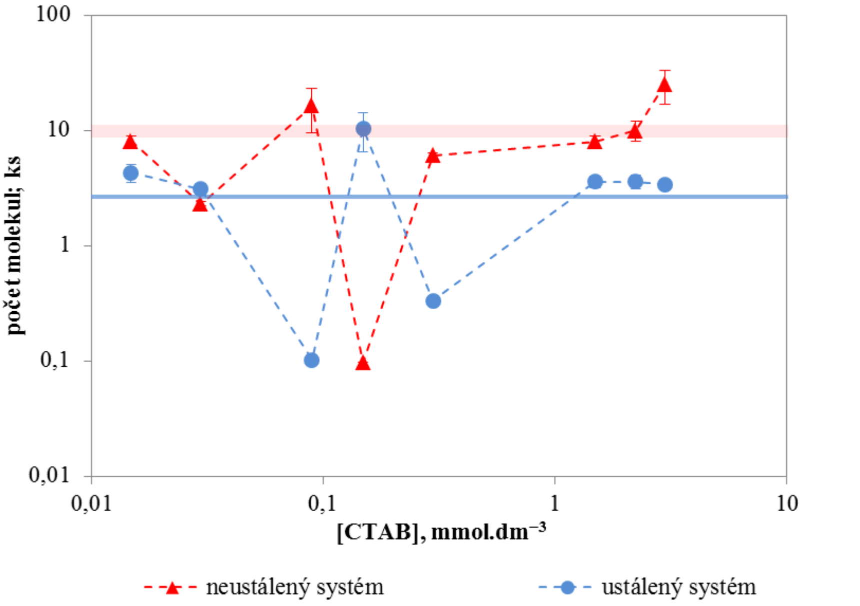
Při srovnávání systémů v obou stavech poslouží **obr. 3** a **4**. První jmenovaný porovnává závislosti difúzního času pro oba stavy. Šedou oblastí je zde vyznačeno rozmezí hodnot, kterých může v rámci chyby nabývat difúzní čas pro rhHya bez přídavku CTAB. Jak je vidět pokles hodnoty v neustáleném systému po prvním přídavku CTAB je prudší, ale jeho hodnota se pak po dalším navýšení koncentrace CTAB vrací k hraniční hodnotě bez tenzidu. V tomto bodě se chování ustáleného a neustáleného systému shoduje.



Obr. 3: Srovnání hodnot majoritních difúzních časů v ustáleném a neustáleném systému. Šedá oblast znázorňuje rozmezí hodnot, ve kterém se pohybuje difúzní čas rhHya bez přídavku CTAB a platí pro obě závislosti.

Analogické změny pak můžeme vidět i na závislosti počtu molekul zobrazeném na druhém z obrázků. V neustáleném systému tedy pravděpodobně po prvním přídavku dochází k překotné interakci hyaluronanu s tenzidy, ta pravděpodobně pozmění konformaci hyaluronanu natolik, že agregáty takto vzniklé difundují pomaleji než volně natažený řetězec. S časem však dojde k rovnoměrnějšímu rozdělení jednotlivých molekul tenzidu podél řetězce a ten tak částečně zaujme původní nataženou konformaci.

V dalším regionu koncentrací jde chování v ustáleném i neustáleném systému v podstatě proti sobě. Tato rozkolísanost je pravděpodobně důsledkem metastabilního stavu agregátů. V oblasti koncentrací nad CMC se pak u neustáleného systému objevuje na závislostech difúzního času a počtu molekul trend, který v ustáleném systému vymizí. Z toho lze usuzovat, že i agregáty ve stabilní oblasti procházejí během času změnami. Ihned po smíchání tedy nedochází k vytvoření agregátů, které by byly v energeticky nejvýhodnějším stavu.



Obr. 4: Srovnání hodnot počtu molekul v konfokálním objemu v ustáleném a neustáleném systému. Příslušná ke křivce barevně odpovídající oblast pak vyjadřuje rozmezí, ve kterém se pohybuje hodnota N pro rhHya bez obsahu CTAB.

4.3 HYDROFOBNĚ MODIFIKOVANÉ AMINOKYSELINY

Jako alternativa prostých tenzidů byly použity **hAMK**. Jednalo se o dodecylserin (Ser-C_{12}), dodecylglycin (Gly-C_{12}), didecylglutamovou kyselinu (Glu-C_{10}) a dioktylasparagovou kyselinu (Asp-C_8). Výsleky těchto testů již byly publikovány [77]. Při těchto experimentech byl použit nativní Hya (1,4 MDa a 106 kDa) o konstantní koncentraci (1 g.dm^{-3}). Interakce byly sledovány ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 mol.dm^{-3} roztoku NaCl.

Všechny naměřené závislosti EmPI na koncentraci hAMK mají tvar jednoduché sigmoidní křivky. V žádných vzorcích nedocházelo ke změně základního tvaru průběhu křivky.

Shrnutí výsledků ilustruje **tab. 2** obsahující CMC stanovené pomocí změn dvou polaritních paramterů. Jak je z této tabulky vidět, k nejvýraznějším změnám po přídavku Hya dochází ve vodě u aminokyselin, které mají pouze jeden hydrofobní řetězec. Zde dochází k posunu CMC o více než jeden koncentrační řád a mírně se také liší vliv Hya s různou M_W. Vysokomolekulární Hya snižuje CMC nepatrně více než nízkomolekulární. Pokud jde o hAMK s jedním řetězcem v 0,15 M NaCl, zde se pak vliv přídavku Hya stírá. U Gly-C_{12} ještě můžeme pozorovat mírný pokles CMC, který však u Ser-C_{12} vymizí, zde jsou pak interakce už potlačeny vyšší iontovou silou. Tento fakt potvrzuje, že jde o poměrně slabé interakce.

U aminokyselin se dvěma hydrofobními řetězci byla situace složitější. Hodnoty CMC pro Glu-C_{10} nebyly vůbec změřeny, protože tato hAMK se velmi špatně rozpouštěla ve vodě, pravděpodobně kvůli příliš velké hydrofobicitě dvou desetiuhlíkatých řetězců. V rozmezí koncentrací, ve kterých byl Glu-C_{10} rozpuštěn nedošlo vůbec k poklesu polaritního indexu, což znamená, že v systému nebyly vytvořeny hydrofobní domény. Data pro Asp-C_8 získána

byla, zde dochází ve vodě vlivem přídavku Hya k mírnému zvýšení CMC, což je opačný trend než u jednořetězcových hAMK. Nízkomolekulární Hya pak způsobuje vyšší nárůst CMC. v prostředí NaCl, pak dochází opět k potlačení většiny interakcí a hodnoty CMC se v rámci chyby téměř nemění.

Tab. 2: Hodnoty CMC pro systém hAMK s přídavkem a bez přídavku Hya ve vodě a v 0,15 M NaCl. Koncentrace Hya byla 0,1% hm.

hAMK		**stanovená CMC (mmol.dm^{-3})**					
		voda	**106 kDa, voda**	**1,36 MDa, voda**	**0,15 M NaCl**	**106 kDa, 0,15 M NaCl**	**1,36 MDa, 0,15 M NaCl**
Gly-C_{12}	CMC	3,19	0,18	0,13	0,32	0,19	0,19
	±	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
Ser-C_{12}	CMC	2,24	0,13	0,07	0,27	0,29	0,22
	±	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,05
Asp-C_8	CMC	0,09	0,18	0,13	0,17	0,11	0,20
	±	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02

Jak je tedy vidět z výsledků, hydrofobně hAMK jsou v rozmezí svojí rozpustnosti (s výjimkou Glu-C_{10}) schopny samovolně agregovat a tvořit hydrofobní domény. Avšak jejich interakce s Hya je mnohem slabší než u CTAB. Navíc lze tyto interakce lehce potlačit zvýšením iontové síly roztoku. Z hlediska nezměněného tvaru průběhu polaritní závislosti nelze také prokázat vazbu agregátů hAMK na řetězec Hya.

4.3.1 Gelové systémy hyaluronan – tenzid

Termogravimetrie

V TG spektrech se u všech gelových vzorků objevuje dvouzlomová křivka, což znamená, že na křivce derivované podle teploty mají všechny naměřené závislosti dva píky. První, jehož maximum se nachází okolo 100 °C, odpovídá vysušení vody. Druhé maximum nacházející se obvykle okolo 225 °C přísluší tepelné degradaci komponent a jejich spálení.

Pro charakterizaci gelu jsou nejdůležitější následující parametry. Jedním z nich je hodnota sušiny udávaná v hmotnostních a procentech. Jak je vidět z **tab. 3**, pro všechny vzorky se sušiny pohybují v rozmezí od 29 % hm. do 2 % hm., což znamená, že v krajních případech je gel schopen pojmout od 71 % hm. až do 98 % hm. vody. V druhém případě je sušina (vzorek s 2 % hm. Hya 2000 kDa a 50 mmol.dm^{-3} CTAB) schopna pojmout množství vody rovnající se téměř padesáti násobku svojí hmotnosti. S ohledem na to, že vysušené systémy jsou schopny opět nabotnat, jsou aplikačně zajímavé. Lze je totiž skladovat a přepravovat ve vysušeném stavu a po přidání vody opět získáme hydrogel použitelný např. v medicíně pro speciální krytí ran zajišťující vlhké hojení, nebo v kosmetice jako substance zajišťující hydrataci.

Tab. 3: Shrnutí výsledků termogravimetrických měření

složení			první maximum			druhé maximum		
			$t_{poč1}$; °C	**t_{inf1}; °C**	**$m_{suš}$, % hm.**	**$t_{poč2}$; °C**	**t_{inf2}; °C**	**m_{pop}, % hm.**
300 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	30,3 ± 0,8	94,1 ± 1,9	21,4 ± 2,3	181,5 ± 0,2	223,4 ± 0,4	4,2 ± 0,5
	0,5 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	30,6 ± 0,1	93,5 ± 2,3	25,4 ± 0,6	185,9 ± 3,1	228,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1
	2 % Hya,	200 mmol.dm^{-3} CTAB	33,3 ± 0,1	89,0 ± 0,5	27,9 ± 0,1	184,6 ± 0,4	238,1 ± 0,4	4,2 ± 0,1
	0,5 % Hya	200 mmol.dm^{-3} CTAB	31,5 ± 0,1	88,7 ± 13,1	29,0 ± 7,7	190,8 ± 0,6	243,1 ± 0,1	3,9 ± 1,0
700 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	26,0 ± 1,3	100,0 ± 1,4	13,7 ± 1,2	176,3 ± 0,2	222,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2
	0,5 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	29,6 ± 0,9	93,2 ± 5,0	24,4 ± 0,4	179,2 ± 3,6	221,4 ± 0,7	3,6 ± 0,7
	2 % Hya,	200 mmol.dm^{-3} CTAB	29,7 ± 0,5	94,3 ± 2,0	18,9 ± 0,4	182,4 ± 0,5	232,2 ± 0,4	3,2 ± 0,2
	0,5 % Hya	200 mmol.dm^{-3} CTAB	26,1 ± 1,7	92,5 ± 0,6	23,8 ± 0,1	182,7 ± 0,3	234,1 ± 0,0	3,2 ± 0,1
2000 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	30,9 ± 1,5	106,3 ± 1,7	2,2 ± 0,1	176,9 ± 2,8	226,8 ± 1,2	1,4 ± 0,1
	0,5 % Hya	50 mmol.dm^{-3} CTAB	30,4 ± 0,3	95,2 ± 7,6	13,0 ± 0,5	182,3 ± 3,3	224,9 ± 2,6	2,8 ± 0,3
	2 % Hya,	200 mmol.dm^{-3} CTAB	33,0 ± 2,0	82,1 ± 3,5	19,7 ± 0,2	183,8 ± 3,4	226,3 ± 1,8	3,4 ± 0,1
	0,5 % Hya	200 mmol.dm^{-3} CTAB	34,2 ± 3,1	92,2 ± 0,2	20,0 ± 0,7	183,5 ± 3,4	232,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1

Relogie

Elastické a ztrátové moduly naměřený pro všechny vzorky vykazují stejné trendy v rámci jednotlivých použitých molekulových hmotností. Při 300 kDa jejich hodnota roste s klesající hodnotou koncentrace Hya, při použití Hya 700 kDa a 2000 kDa, pak tento trend platí pouze při použití 50 mmol.dm−3 CTAB, při 200 mmol.dm−3 CTAB je trend opačný. Z hlediska změn hodnot modulů v závislosti na koncentraci tenzidu pak pro téměř všechny dílčí moduly platí, že jejich hodnota roste s klesající hodnotou koncentrace CTAB, tomu odpovídají i výsledky tokových testů, kdy se s měnící koncentrací CTAB mění i parametr η_0.

Obecně lze tedy říci, že pro jednu a tutéž molekulovou hmotnost je charakter vzorku závislý hlavně na koncentraci výchozího roztoku CTAB, což je způsobeno pravděpodobně rozdílným uspořádáním agregátů ve výchozím roztoku tenzidu, které pak potažmo interagují s hyaluronanem za vzniku gelových fází s odlišnými vlastnostmi. Vliv M_W Hya roste s rostoucí hodnotou tohoto parametru. Delší řetězce Hya s vyšší molekulovou hmotností totiž při jejich různé koncentraci zaujmou v roztoku také různé konformace. Lze předpokládat, že právě vysokomolekulární řetězce ve vyšší koncentraci budou vytvářet polymerní síť samy o sobě a pro vazbu agregátů CTAB tedy nebude přístupných tolik vazných disociovaných skupin na polymerním řetězci, což bude mít neodmyslitelně vliv na vnitřní strukturu vznikajících gelových fází a to tím větší, čím méně poddajné řetězce budou. Při vyšších molekulových hmotnostech tedy převládá elastický charakter vzorku a tyto gely hůře tečou, zatímco při nižší molekulové hmotnosti dominuje spíše viskózní složka chování, gely tedy lépe tečou, ale jejich mechanická odolnost je nízká.

Z hlediska reologie se všechny „gely“ chovají spíše jako viskoelastická kapalina. Gely je tedy lze nazývat pouze z hlediska jejich struktury, kdy jsou řetězce Hya pospojovány fyzikálně vázanými agregáty CTAB a to na základě elektrostatické interakce. Tyto vazné prostředníky lze považovat za dodatečné uzly polymerní sítě, které vyztužují její strukturu. Pak lze na systémy vzniklé interakcí Hya a CTAB možné pohlížet jako na gel i v případě, že reologická měření ukazují, že podle vlastností by měly být hodnoceny spíše jako viskoelastické kapaliny.

5 ZÁVĚR

Souhrným cílem této práce bylo pomocí fyzikálně chemických metod dostupných na školicím pracovišti prostudovat interakce mezi různými typy amfifilních látek a hyaluronanem s ohledem na možnou formulaci nových nosičových systémů na bázi koloidních roztoků nebo měkkých kondenzovaných systémů.

Na základě provedené rešerše byly provedeny testy interakce Hya s tenzidy různé povahy. Z výsledků plyne, že ve vybraných systémech dochází vlivem přídavku Hya ke změnám zkoumaných parametrů. Jednalo se o systémy obsahující neionogenní Tween 20 a kationaktivní tenzidy, z nichž nejvýraznější změny byly zaznamenány u tenzidu CTAB.

Pro bližší zkoumání byl vybrán CTAB u něhož byla v prostředí vody i 0,15 mol.dm^{-3} roztoku NaCl zaznamenána také tvorba kondenzované fáze podobné gelu, která svědčila o nezanedbatelných interakcích v systému. Pro tento systém bylo provedeno podrobné zkoumání interakcí hyaluronan-CTAB při koncentracích blízkých CMC tenzidu. Při těchto testech provedených pomocí metody fluorescenční sondy (pyren) byl použit Hya o různých koncentracích a s různou molekulovou hmotností.

Ve vzorcích byly objeveny závislosti EmPI a ExPI vykazující dva zlomy. CAC byla oproti CMC posunuta zhruba o dva řády k nižším hodnotám koncentrace tenzidu Při nejnižší použité koncentraci Hya 700 kDa (5 mg.dm^{-3}) byla objevena jedna oblast fázové separace, zatímco při vyšších koncentracích Hya se oblasti fázové separace objevily dvě.

Výsledky značí, že přítomnost Hya díky elektrostatické interakci způsobí změny v agregačním chování tenzidu (tvorba indukovaných vázaných micel, fázová separace), ale příliš neovlivní koncentraci tenzidu, při které tyto děje proběhnou. To vede k domněnce, že řídícím faktorem je v tomto případě spíše koncentrace tenzidu. Poměr P/T, tak často používaný k charakterizaci systémů obsahujících polyelektrolyt-tenzid a považovaný za jeden z parametrů determinující jejich chování, v tomto systému nemá avízovaný rozhodující vliv.

Další metodou použitou pro výzkum interakcí v systému Hya-tenzid byla fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). V tomto případě byl použit fluorescenčně značený hyaluronan a byly sledovány jeho difúzní charakteristiky. Tato metoda, na rozdíl od metody fluorescenční sondy, která získává informace z hydrofobních jader agregátu, naopak sleduje přímo řetězec polyelektrolytu. Zkoumány byly vzorky s konstantní koncentrací rhodminovaného hyaluronanu bez přídavku a s přídavkem CTAB o různé koncentraci. Dané systémy byly měřeny v ustáleném a v neustáleném stavu.

Souhrně výsledky těchto měření poukazují na fakt, že po přídavku hyaluronanu do roztoku tenzidu dojde k překotné interakci mezi oběma komponentami a tvorbě větších agregátů, jež difundují pomaleji než volně natažený samotný řetězec. S časem ale zřejmě dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení tenzidových molekul podél řetězce a k částečnému návratu do původní roztažené konformace. Ve vzorcích se také nachází oblast koncentrací tenzidu, ve které je chování ustáleného a neustáleného systému zcela odlišné. V této oblasti jsou pravděpodobně agregáty v metastabilním stavu [26] nebo v ní probíhá fázová separace. Za CMC tenzidu rozkolísanost systému vymizí, ale chování v obou stavech přesto není úplně shodné, s časem se tedy mění uspořádání systému i v koncentracích přesahujících CMC.

S ohledem na sporné použití CTAB v aplikovaných nosičích léčiv byly provedeny experimenty s hydrofobně modifikovanými aminokyselinami, které měly sloužit jako náhrada CTAB. Výsledky ukázaly, že tyto hAMK se do jisté míry chovají stejně jako tenzidy, myšleno z hlediska samovolné agregace v roztoku a schopnosti solubilizovat hydrofobní látky, ale jejich interakce s Hya je mnohem slabší než u CTAB a lze ji snadno potlačit zvýšením iontové síly roztoku. V podobných systémech by tedy bylo nutné uvažovat o podpoření interakce např. změnou fyzikálně chemických podmínek.

Samostatným poměrně rozsáhlým celkem se pak stala část mapující vlastnosti kondenzovaných systémů vznikajících interakcí Hya-CTAB v prostředí 0,15 mol.dm^{-3}. Jako první byly provedeny experimenty charakterizující podmínky jejich vzniku a některé jejich vlastnosti důležité z hlediska cílených nosičů léčiv. S tím bylo spojeno hlavně provedení solubilizačních testů. Díky nim bylo zjištěno, že kondenzované gelové systémy vzniklé interakcí hyaluronan-CTAB jsou schopny do svojí struktury inkorporovat širokou škálu látek různých vlastností. Nejdůležitějším v tomto ohledu však zůstává, že obsahují hydrofobní domény a jsou schopny solubilizovat hydrofobní látky a to i rozměrnější molekuly jako je například paklitaxel. Další, spíše pro praktické využití, přínosnou vlastností je fakt, že gely jsou po vyschnutí schopny rehydratace a zpětného obnovení původní vnitřní struktury s hydrofobními doménami.

Kromě těchto vlastností byly zkoumány také makroskopické vlastnosti jednotlivých gelů vzniklých ve vzorcích s různým složením. Jednalo se o termogravimetrické a reologické testování. Díky termogravimetrii bylo zjištěno, že v rámci zkoumaných vzorků jsou gelové systémy Hya-

CTAB schopny pojmout od 71% hm. do 98% hm. vody. V takovém případě se jedná o hydrogely, které jsou aplikačně zajímavé nejen z hlediska farmacie (cílená distribuce léčiv, hojení ran), ale i kosmetiky (hydratační a vyživující přípravky).

Díky reologickým testům pak byly zjišťovány také mechanické a tokové vlastnosti gelů. Bylo zjištěno, že kondenzované systémy Hya-CTAB lze gely nazývat pouze z hlediska jejich fyzikální struktury, kdy hyaluronan tvoří polymerní základ sesíťovaný pomocí micel CTAB. Z hlediska reologických vlasntostí se však jedná o viskoelastické kapaliny. Vlastnosti těchto viskoelastických kapalin jsou pak do jisté míry laditelné a lze je ovlivnit hlavně použitou molekulovou hmotností hyaluronanu. Čím vyšší totiž bude, tím bude ve výsledné kondenzované fázi posílen její elastický charakter na úkor viskozity. To znamená, že při použití delšího řetězce Hya vzniklé „gely" hůře tečou, ale jejich mechanická odolnost je vyšší.

Pokud jde o zhodnocení zkoumaných systémů z hlediska jejich použitelnosti pro cílenou distribuci léčiv, pak lze konstatovat, že základní podmínku splňují jak systémy v roztoku tak systémy gelové. Obsahují totiž hydrofobní domény a jsou schopny solubilizovat hydrofobní látky. Systémy v roztoku jsou pak ale velmi náchylné k oslabení nebo dokonce odstínění elektrosatické interakce vlivem zvýšení iontové síly. V tomto případě by bylo nutno uvažovat o podpoře interakce například dodatečným síťováním, ztrácí se tak ale výhody čistě nekovalentního vázání. Bilancování a nalezení kompromisu mezi těmito možnostmi je pak otázkou dalších experimentů.

Gelové systémy jsou oproti systémům v roztoku méně náchylné ke změnám struktury vlivem změn v jejich okolním prostředí. Jejich vlastnosti alespoň z hlediska makroskopického jsou do jisté míry laditelné a lze je tedy tzv. „ušít na míru". Z tohoto pohledu pak před nimi stojí mnohem širší uplatnitelnost. Lze je totiž využít jako potenciální nosiče i pro kosmetické substance. Čistě z hlediska cílených nosičů léčiv by bylo potřeba dořešit jejich aplikační formu, tedy ověřit zda a jak z nich připravit částice požadovaných nanometrických rozměrů.

Úplným závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny a splněním těchto cílů se otevřely opět nové cíle, jejichž dosažení je otázkou navazující práce.

6 LITERATURA

[1] Pillai, O., Dhanikula A. B., Panchagnula, R.: Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Current opinion in chemical biology*, 2001, č. 5, s. 439-446

[2] Petrak, K.: Essential properties of drug-targeting delivery system. *Drug discovery today*, 2005, č. 10, s. 1667-1673

[3] Fox, M., Szoka, F., Frechet, J.: Soluble polymer carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Accounts of chemical research*, 2009, č. 42, s. 1141-1151

[4] Prestwich, G. D.: Biomaterials from chemically-modified Hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2001, [cit. 26. 8. 20013], http://www.glycoforum.gr.jp/

[5] Culty, M., Nguyen, A., Underhill, Ch. B.: The Hyaluronan Receptor (CD44) Participates in the Uptake and Degradation of Hyaluronan. *Journal of cell biology*, 1992, č. 116, s. 1055-1062

[6] Pure, E., Cuff, A. C.: A crucial role of CD 44 in inflammation. *Trends in molecular medicine,* 2001, č. 7, s. 213-221

[7] Rousseau, V. O.: CD 44, a therapeutic target for matastasising tumors. *European journal of cancer,* 2010, č. 46, s. 1271-1277

[8] Cichy, J., Kulig, P., Pure, E.: Regulation of the release and function of tumor cell-derived soluble CD 44. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular cell research*, 2005, č. 1745, s. 59-64

[9] Isacke, M. C., Yarwood, H.: The hyaluronan receptor CD 44. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, č. 34, s. 718-721

[10] Pozza, D. E., Lerda, Ch., Costanzo Ch., Donadelli, M., Dando, I., Zoratti, E., Scupoli, M. T., Beghelli, S., Scarpa, A., Fattal, E., Arpicco, S., Palmieri, M.: Targeting gemcitabine containing liposomes to CD44 expressing pancreatic adenocarcinoma cells causes an increase in the antitumoral activity. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes,* 2013, č. 1828, s. 1369-1404

[11] Knudson, W., Chow, G., Knudson, Ch. B.: CD-44 mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*, 2002, č. 21, s. 15-23

[12] Naor, D., Wallach-Dayan, S. B., Zahalka, M. A., Sionov, R. V.: Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Seminars in cancer biology*, 2008, č. 18, s. 260-267

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

[14] Yim, H., Na, K.: Polycationic Nanodrug Cowered with Hyaluronic Acid for Treatment of P-Glycoprotein Overexpressing Cancer Cells. *Biomacromolecules*, 2010, č. 11, s. 2387-2393

[15] Yao, J., Zhang, L., Zhou, J., Liu, H., Zhang, Q.: Efficient simultaneous tumor targeting delivery of all-trans Retinoid acid and Paclitaxel based on Hyaluronic acid-based multifunctional nanocarrier. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, č. 10, s. 1080-1091

[16] Surace, C., Arpicco, S., Wojcicki, A., Marsaud, V., Bouclier, C., Clay, D., Cattel, L., Renoir, J., Fattal, E.: Lipoplexes targeting the CD44 Hyaluronic acid receptor for efficient transfection of breast cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, č. 6, s. 1062-1073

[17] Platt, V., Szoka, F.: Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan receptor. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, č. 5, s. 474-486

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

[19] El-Dakdouki, M. H., Zhu, D. C., El-Boubbou, K., Kamat, M., Chen, J., Li, W., Huang, X.: Development of multifunctional Hyaluronan-coated nanoparticles for imaging and drug delivery to cancer cells. *Biomacromolecules*, 2012, č. 13, s. 1144-1151

[20] Vermonden, T., Censi, R., Hennik, W. E.: Hydrogels for protein delivery. *Chemical Reviews*, 2012, č. 112, s. 2853-2888

[21] Wei, X., Senanayake, T. H., Warren, G., Vinogradov, S. V.: Hyaluronic acid-based nanogel–drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for the targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors. *Bioconjugate chemistry,* 2013, č. 24, s. 658-668

[22] Chen, Y., Wu, H., Sun, J., Dong, G., Wang, T.: Injectable and thermoresponsive self-assembled nanocomposite hydrogel for long-term anticancer drug delivery. *Langmuir*, 2013, č. 29, s. 3721-3729

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

[24] Nizri, G., Makarsky, A., Magdassi, S., Talmon, Y.: Nanostructures formed by self-assembly of negatively charged polymer and cationic surfactants. *Langmuir*, 2009, č. 25, s. 1980-1985

[25] Liu, Z., Shang, Y., Feng, J., Peng, Ch., Liu, H., Hu, Y.: Effect of hydrophilicity or hydrophobicity of polyelectrolyte on the interaction between polyelectrolyte and surfactants: Molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B,* 2012, č. 116, s. 5516-5526

[26] Dongcui, L., Kelkar, M. S., Wagner N. J.: Phase behavior and molecular thermodynamics of coacervation in oppositely charged polyelectrolyte/surfactant systems: a cationic polymer JR 400 and anionic surfactant SDS mixture. *Langmuir*, 2012, č. 28, s. 10348-10362

[27] Wang, W., Sande, A.: Kinetics of re-equilibrium of oppositely charged hydrogel–surfactant system and its application in controlled release. *Langmuir*, 2013, č. 29, s. 6697-6705

[28] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between Hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478 1483

[29] Thalberg, K., Lindman, B.: Gel formation in aqueous system of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*, 1991, č. 7, s. 277 283

[30] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 6004 6011

[31] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyeletrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide Hyaluronan water. *Journal of Physical Chemistry*, 1990, č. 94, s. 4289 4295

[32] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyeletrolyte molecular weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370 3376

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

[34] Thalberg, K., Stam, J. V., Lindblad, C., Almgren, M., Lindman, B.: Time resolved fluorescence and self diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 8975 8982

[35] De, S., Girigoswami, A., Das, S.: Fluorescence probing of albimun-surfactant interaction. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 285, s. 562-573

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

[37] Wang, Y., Wang, H.: Studies on interaction of poly(sodium acrylate) and poly(sodium styrenesulfonate) with cationic surfactants: Effects of polyelectrolyte molar mass, chain flexibility, and surfactant architecture. *Journal of Physical Chemistry B,* 2010, č. 114, s. 10409-10416

[38] Wang, X., Wang, J., Wang, Y., Yan, H.: Salt effect on the complex formation between cationic gemini surfactant and anionic polyelectrolyte in aqueous solution. *Langmuir*, 2004, č. 20, s. 9014-9018

[39] Hansson, P., Almgren, M.: Polyelectrolyte-induced micelle formation of ionic surfactants and binary surfactant mixtures studied by time-resolved fluorescence quenching. *Journal of Physical Chemistry,* 1995, č. 99, s. 16684-16693

[40] Nizri, Q., Magdassi, S.: Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer-surfactant interactions. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 291, s. 169-174

[41] Dong, Z., Cao, Y., Han, X., Fan, M., Yuan, Q., Wang, Y., Li, B., Zhang, S.: Photoreversible polymer–surfactant micelles using the molecular recognition of α-yyclodextrin. *Langmuir*, 2013, č. 29, s. 3188-3194

[42] Liao, X., Higgins, D. A.: Scanning probe microscopy studies of mesostructured nonstoichiometric polyelectrolyte–surfactant complexes. *Langmuir*, 2002, č. 18, s. 6259-6265

[43] Hess, S. T., Huang, S. H., Heikal, A. A., Webb, W. W.: Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry*, 2002, č. 41, s. 697-705

[44] Haustein, E., Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annual Reviews, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2007, č. 36, s. 151-169

[45] Kim, S. A., Schwille, P.: Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience. *Current opinion in neurobiology*, 2003, č. 13, s. 583-590

[46] Riegler, R.: Fluorescence and single molecule analysis in cell biology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, č. 396, s. 170-175

[47] Chiantia, S.,Ries, J., Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes,* 2009, č. 1788, s. 225-233

[48] Sankaran, J., Manna, M., Guo, L., Kraut, R., Wohland, T.: Diffusion, transport, and cell membrane organization investigated by imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 2009, č. 97, s. 2630-2639

[49] Koynov, K., Butt, H. J.: Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2012, č. 17, s. 377-387

[50] Masuda, A., Ushida, K., Okamoto, T.: New fluorescence correlation spectroscopy (FCS) suitable for the observation of anomalous diffusion in polymer solution: Time and space dependences of diffusion coefficients. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,* 2006, č. 183, s. 304-308

[51] Zettl, U., Hoffmann, S. T., Koberling, F., Krausch, G., Enderlein, J., Harnau, L., Ballauff, M.: Self-diffusion and cooperative diffusion in semidilute polymer solutions as measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Macromolecules*, 2009, č. 42, s. 9537-9547

[52] Leng, X., Starchev, K., Buffle, J.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy: measurement of size–mass relationship of native and denatured schizophyllan, *Biopolymers*, 2001, č. 59, s. 290-299

[53] Meunier, F., Wilkinson, J. K.: Nonperturbing fluorescent labeling of polysaccharides. *Biomacromolecules*, 2002, č. 3, s. 857-864

[54] Starchev, K., Zhang, J. W., Buffle, J.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy - particle size effect. *Journal of colloid and interface science, 1998, č. 203, s. 189-196*

[55] Starchev, K., Buffle, J., Perez, E.: Applications of fluorescence correlation spectroscopy: polydispersity measurements. *Journal of colloid and interface science, 1999, č. 213, s. 479-487*

[56] Kuyper, C. L., Budzinski, K. L., Lorenz, K. M., Chiu, D. T.: Real-time sizing of nanoparticles in microfluidic channels using confocal correlation spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, č. 128, s. 730-731

[57] Pellegrino, T., Manna, L., Kudera, S., Liedl, T., Koktysh, D., Rogach, A. L., Keller, S., Rädler, J., Natile, G., Parak, W. J.: Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals. *Nano letters*, 2004, č. 4, s. 703-707

[58] Liedl, T., Keller, S., Simmel, F. C., Radler, J. O., Parak, W. J.: Fluorescent nanocrystals as colloidal probes in complex fluids measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Small*, 2005, č. 10, s. 997-1003

[59] Stavis, S. M., Edel, J. B., Samiee, K. T., Craighead, H. G.: Single molecule studies of quantum dot conjugates in a submicrometer fluidic channel. *Lab on a chip*, 2005, č. 5, s. 337-343

[60] Tagit, O., Tomczak, N., Jafarpour, A., Janczewski, D., Han, M. Y., Vancso, G. J., Herek, J. L.: Influence of the length and grafting density of PNIPAM chains on the colloidal and optical properties of quantum dot/PNIPAM assemblies. *Nanotechnology*, 2011, č. 22, s. 265-701

[61] Neugart, F., Zappe, A., Jelezko, F., Tietz, C., Boudou, J. P., Krueger A., Wrachtrup, J.: Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells. *Nano letters*, 2007, č. 7, s. 3588-3591

[62] Mohan, N., Tzeng, Y. K., Yang, L., Chen, Y. Y., Hui, Y. Y., Fang, C. Y., Chang, H. Ch.: Sub-20-nm fluorescent nanodiamonds as photostable biolabels and fluorescence resonance energy transfer donors. *Advanced materials*, 2010, č. 22, s. 843-847

[63] Dickinson, E., Goller, M. I., Wedlock, D. J.: Creaming and rheology of emulsioíns containing polysaccharide and non-ionic or anionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1993, č. 75, s. 195-201

[64] Panmai, S., Prudhomme, R. K., Peiffer, D. G.: Rheology of hydrophobically modified polymers with spherical and rod-like surfactant micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, č. 147, s. 3-15

[65] Gouveia, M. L., Paillet, S., Khoukh, A., Grassl, B., Müller, A. J.: The effect of the ionic strength on the rheological behavior of hydrophobically modified polyacrylamide aqueous solutions mixed with sodium dodecyl sulfate (SDS) or cetyltrimethylammonium p-toluenesulfonate (CTAT). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, č. 322, s. 211-218

[66] Penott-Chank, E. K., Gouveia, L., Fernandez, I. J., Müller, A. J., Diaz-Barrios, A., Saez, E. A.: Rheology of aqueous solutions of hydrophobically modified polyacrylamides and surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, č. 295, s. 99-106

[67] Maestro, A., Kotsmar, C., Javadi, A., Miller, R., Ortega, F., Rubio, R. G.: Adsorption of β-casein–surfactant mixed layers at the air–water interface evaluated by interfacial rheology. *Journal of Physical Chemistry B,*2012, č. 116, s. 4898-4907

[68] Rinaudo M.: Rheological investigation on hyaluronan–fibrinogen interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, č. 43, s. 444-450

[69] Fukada, K., Suzuki, E., Seimiya, T.: Rheological properties of sodium hyaluronate in decyltrimethylammonium bromide aqueous solutions. *Langmuir*, 1999, č. 15, s. 4217-4221

[70] Mourtas, S., Haikou, M., Theodoropoulou, M., Tsakiroglou, Ch., Antimisiaris, S. G.: The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, č. 317, s. 611-619

[71] Harding, S., Wik, O., Helander, A., Ahnfelt, N. O., Kenne, L.: NMR velocity imaging of the flow behaviour of hyaluronan solutions. *Carbohydrate polymers*, 2002, č. 47, s. 109-119

[72] Khalili Garakani, A. H., Mostoufi, N., Sadeghi, F., Hosseinzadeh, M., Fatourechi, H., Sarrafzadeh, M. H., Mehrnia, M. R.: Comparison between different models for rheological characterization of activated sludge. *Iranian journal of environmental health science* & *engineering*, 2011, č. 8, s. 255-264

[73] Bais, D., Trevisan, A., Lapasin, R., Partal, P., Gallenos, C.: Rheological characterization of polysaccharide–surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, č. 290, s. 546-556

[74] Klán, K. P.: *Organická fotochemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-2102526-3.

[75] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Ruiz, C.C.: On the determination of the critical micelle concentration by the pyren 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, č. 258, s. 116–122

[76] Halasová, T., Krouská, J., Mravec, F., Pekař, M.: Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, č. 391, s. 25-31

[77] Halasová, T., Mravec, F., Pekař, M.: The effect of hyaluronan on the aggregation of hydrophobized amino acids-A fluorescence study. *Carbohydrate polymers*, 2013, č. 97, s. 34-37

[78] Zhang, J., Ju, Z., Wu, Y., Liu, T., Du, T., Xie, Y., Zhang, Z. L.: Structural Characteristics of Cerium Oxide Nanocrystals Prepared by the Microemulsion Method. *Chemistry of materilas*, 2001, č. 13, s. 4192-4197

[79] Tolentino, A., Alla, A., Martinez de Ilarduya, A., Munos-Guerra, S.: Comb-like ionic complexes of hyaluronic acid with alkyltrimethylammonium surfactants. *Carbohydrate polymers*, 2013, č. 92, s. 691-696

7 ŽIVOTOPIS

Životopis

Osobní informace

Jméno a příjmení:	**Tereza Halasová**
Datum a místo narození:	14. ledna 1985, Boskovice
Adresa:	Hynka Bíma 826, Tišnov 666 01
Telefoní číslo:	+420 603 564 910
E-mail:	xchalasova@fch.vutbr.cz; xchalasova@centrum.cz

Vzdělání

2009 – současnost	**VUT Brno, chemická fakulta**, Doktorský program: Fyzikální chemie, obor: Fyzikální chemie Dizertační práce : Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul
2007 – 2009	**VUT Brno, chemická fakulta**, Magisterský program: Spotřební chemie, obor: Spotřební chemie Diplomová práce: Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid
2004 – 2007	**VUT Brno, chemická fakulta**, Bakalářský program: Chemie a chemické technologie obor: Spotřební chemie Bakalářská práce: Vliv fyzikálních vlastností roztoku na agregaci polysacharidů

Impaktované publikace

HALASOVÁ, T.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. The effect of hyaluronan on the aggregation of hydrophobized amino acids - a fluorescence study. CARBOHYDRATE POLYMERS, 2013, roč. 97, č. 1, s. 34-37. ISSN: 0144- 8617.

DRBOHLAVOVÁ, J.; CHOMOUCKÁ, J.; HRDÝ, R.; PRÁŠEK, J.; JANŮ, L.; RYVOLOVÁ, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HALASOVÁ, T.; HUBÁLEK, J. Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO2 Quantum Dots.INTERNATIONAL JOURNAL OF ELECTROCHEMICAL SCIENCE, 2012, roč. 7, č. 2, s. 1424-1432. ISSN: 1452-3981.

HALASOVÁ, T.; KROUSKÁ, J.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, 2011, roč. 391, č. 1- 3, s. 25-31. ISSN: 0927- 7757.

HEJNÁ, J.; MRAVEC, F.; HALASOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Influence of pH on system containing anionic polyelectrolyte and cationic or nonionic surfactant. CHEMICKÉ LISTY. Brno: 2011. s. 903-903. ISSN: 0009- 2770.

MRAVEC, F.; HALASOVÁ, T.; PEKAŘ, M.; VELEBNÝ, V. Fluorescence study of polysaccharide in dilute aqueous solution. CHEMICKÉ LISTY, 2008, roč. 102, č. 15, s. s1096 (s1098 s.)ISSN: 1213- 7103.

Účast na konferencích

2010	ECIS 2010, Praha, CZ
2011	12th MAF, Strasbourg, FR
2011	5th Chemistry & Life, Brno, CZ (Nejlepší poster studentské sekce)
2012	ECIS 2012, Malmö, SE
2013	13th MAF, Genova, IT

Účast na evropských projektech

CZ.1.07/2.2.00/28.0144	Škola molekulárních biotechnologií-lékařské nanotechnologie, zahájení: 1.2.2012, ukončení 31.01.2015, (autor modulu)
CZ.1.07/2.3.00/35.0004	Popularizace výsledků VaV VUT v Brně a podpora systematické práce se studenty, zahájení: 1.6.2012, ukončení: 31.5.2014, (autor odborného článku)
CZ.1.07/2.2.00/15.0272	Inovace PhD. studia pro biotechnologické aplikace, zahájení: 1.1.2011, ukončení 31.12.2013, (autor odborného článku)

Účast na projektech MŠMT

OC08004	Asociativní koloidy hyaluronan-tenzid, hyaluronan-aminokyselina pro nanomedicínské aplikace, zahájení: 01.01.2008, ukončení: 30.11.2011, (člen týmu)
LD 12068	Příprava koloidů hyaluronanu s micelárními agregáty pro nanomedicínské aplikace a charakterizace jejich vlastností, zahájení: 01.05.2012, ukončení: 31.5.2015, (člen týmu)
2464/2011	Mikroreologie koloidních systémů, zahájení: 01.01.2011, ukončení: 31.12.2011, (řešitel)

Účast na projektech VUT v Brně

FCH-S-13-1878	Výzkum fyzikálně chemických procesů s ohledem na jejich aplikační potenciál, zahájení: 01.01.2013, ukončení: 31.12.2013, (řešitel)
FCH-S-12-2	Studium fyzikálně chemických procesů pro budoucí aplikace, zahájení: 01.01.2012, ukončení: 31.12.2012, (řešitel)

Vedení bakalářských prací

2010/2011	Kohutová Lenka, Příprava a aplikace fyzikálních hyaluronových gelů
2011/2012	Bjalončíková Petra, Mikrorheologie v systémech polymerních koloidů

8 ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na interakce hyaluronanu (Hya) a amfifilních molekul. Pomocí metody fluorescenční sondy bylo provedeno mapování interakcí různých tenzidů s hyaluronanem. Pro bližší zkoumání byl vybrán cetyltrimetylamonium bromid (CTAB). Interakce v tomto systému byly zkoumány také pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a doplňkově byly provedeny prvotní testy cytotoxicity tohoto systému. Jako alternativa CTAB byly použity také hydrofobně modifikované aminokyseliny. Výsledky ukázaly, že samovolně agregují, ale jejich interakce s hylauronanem není tak silná jako u CTAB. Dále byly prozkoumány gelové systémy vzniklé interakcí Hya-CTAB a bylo zjištěno, že obsahují hydrofobní domény schopné solubilizovat hydrofobní látky. Termogravimetricky bylo stanoveno, že jsou schopny pojmout až 98% hm. vody a reologicky byly charakterizovány jejich mechanické vlastnosti. Ty jsou laditelné hlavně díky molekulové hmotnosti (M_W) použitého hyaluronanu. S rostoucí hodnodotu M_W roste mechanická odolnost gelu a klesá jeho tekutost.

ABSTRACT

This work is focused on interaction between hyaluronan (Hya) and amphiphilic molecules. Using fluorescent probes method were carried out screening of the interaction of various surfactants with Hya. For further examination was chosen cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Interactions in this system have also been studied using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and additionally were performed initial tests of the cytotoxicity of the system. As an alternative CTAB were also used hydrophobically modified amino acids. Results showed their self-aggregation, but their interactions with hylauronanem was not as strong as with CTAB. The interaction of gel systems Hya-CTAB have also been studied, and was found to contain a hydrophobic domain capable solubilize hydrophobic substance. Thermogravimetric have been established that are able to contain up to 98% wt. water and rheologically were characterized their mechanical properties. These are tunable due to molecular weight (M_W) of the hyaluronate. With increasing value of M_W increases mechanical strength of the gel and decreases its fluidity.