

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

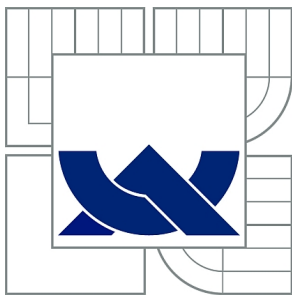
INTERAKCE HYALURONANU A AMFIFILNÍCH MOLEKUL

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

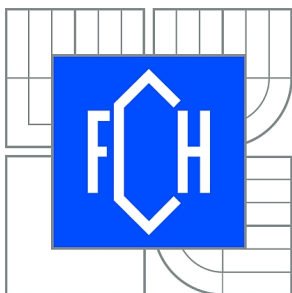
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. TEREZA HALASOVÁ

BRNO 2013



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

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. TEREZA HALASOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2013



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:

Akademický rok: **2012/2013**

Ústav:

Centrum materiálového výzkumu

Student(ka):

Ing. Tereza Halasová

Studijní program:

Fyzikální chemie (P1404)

Studijní obor:

Fyzikální chemie (1404V001)

Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

Konzultanti:

Název dizertační práce:

Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul

Zadání dizertační práce:

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.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.9.2013

Dizertační práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Tereza Halasová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

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 hyaluronanem 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 hodnotou 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 hyaluronanem 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.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

KEYWORDS

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

HALASOVÁ, T. Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 160 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tato práce byla podpořena projektem **COST** č. LD12068 akcí CM1101, a COST č. OC08004 akcí D43. Dále byla tato práce podpořena z projektu „**Centra materiálového výzkumu na FCH VUT**“ č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012.

Moje osobní poděkování patří prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., mému školiteli, za jeho životní nadhled a také smysl pro humor, který jsem si zamilovala. Dál bych ráda vřele poděkovala Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., který se mi za roky spolupráce stal ze školitele specialisty přítelem, jakých člověk v životě moc nemá. Děkuju mu za pomoc, trpělivost a také za to, že mi říkal i věci, které jsem nechtěla slyšet. Děkuju taky všem svým studentům, když jsem je učila, učila jsem zároveň sama sebe. Velký dík patří také mým přátelům a kolegům, v jejichž společnosti mi vždy bylo a je dobře.

Moje srdečné poděkování patří mému partnerovi: „Jari, děkuji ti za to, že když se mi pod nohama rozhoupal celý svět a všechno v něm na mě začalo padat, že jsi tu pro mě byl a stál při mě. Na to nikdy nezapomenu“. Zároveň děkuji také celé rodině, která mě přijala jako vlastní a vždy podporovala.

Speciální poděkování pak patří mojí rodině, bez které bych nebyla ta, která jsem. Svým rodičům děkuji za vše a hlavně za to, že bych pro ně byla ta nejlepší, i kdybych nedosáhla žádného vzdělání a titulu. „Líbám Vás a jsem hrdá, že jsem vaše dcera.“

Nakonec nechci také zapomenout poděkovat všem svým čtyřnohým průvodcům životem hlavně za to, že mi vždy dokázali dobít baterie.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Nosičové systémy léčiv	9
2.1.1	Cytostatika.....	9
2.1.2	Cílení	11
2.1.3	Druhy nosičových systémů	12
2.1.3.1	<i>Liposomy</i>	13
2.1.3.2	<i>Polymerní micely</i>	13
2.1.3.3	<i>Dendrimery</i>	14
2.2	Polyelektrolyty	15
2.2.1	Interakce polyelektrolyt-amfifilní látka	17
2.2.2	Hyaluronan	20
2.2.2.1	<i>Sekundární a terciární struktura</i>	21
2.2.2.2	<i>Interakce řetězců, síťování</i>	23
2.2.2.3	<i>Biosyntéza</i>	24
2.3	Fluorescence	24
2.3.1	Fluorescenční sondy	26
2.3.1.1	<i>Pyren</i>	26
2.3.1.2	<i>1,3-bis(pyren-1-yl)propan</i>	28
2.3.1.3	<i>Prodan</i>	28
2.3.1.4	<i>Nilská červeň</i>	29
2.3.1.5	<i>Rhodamin</i>	29
2.3.2	Fluorescenční korelační spektroskopie	30
2.3.2.1	<i>Autokorelační funkce</i>	31
2.4	Reologie.....	32
2.4.1	Hookův zákon	33
2.4.2	Newtonův zákon.....	33
2.4.3	Viskoelasticita	34
2.4.3.1	<i>Maxwellův model</i>	35
2.4.3.2	<i>Generalizovaný Maxwellův model</i>	37
2.4.4	Pseudoplasticita.....	38
2.4.4.1	<i>Cross model</i>	39
2.4.4.2	<i>Carreau model</i>	40
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	41
3.1	Cílené nosiče léčiv.....	41
3.1.1	Nosiče na bázi hyaluronanu	42
3.1.1.1	<i>Kovalentně vázané konjugáty hyaluronanu a aktivní látky</i>	42
3.1.1.2	<i>Nosiče na bázi agregátů obsahujících hyaluronan</i>	43
3.1.1.3	<i>Nosiče na hydrogelové bázi</i>	44
3.2	Interakce polyelektrolyt - tenzid.....	45
3.3	Interakce hyaluronan – tenzid	47
3.3.1	Fosfolipidy	47
3.3.2	Alkyltrimetylamonium bromidy	48
3.4	Fluorescenční spektroskopie	49

3.4.1	Fluorescenční sondy	49
3.4.2	Fluorescenční korelační spektroskopie	49
3.5	Reologie.....	50
4	CÍLE PRÁCE	52
5	MATERIÁLY A METODY	53
5.1	Materiály	53
5.2	Příprava vzorků	54
5.2.1	Metoda fluorescenční sondy	54
5.2.2	Fluorescenční korelační spektroskopie	54
5.2.3	Cytotoxicita	55
5.2.4	Základní charakterizace gelových systémů.....	55
5.2.5	Termogravimetrie a reologie.....	56
5.3	Metody a standardní vyhodnocení	57
5.3.1	Fluorescenční sondy.....	57
5.3.1.1	Pyren	57
5.3.1.2	Nílská červeň	60
5.3.2	Fluorescenční korelační spektroskopie	61
5.3.2.1	Přístrojové vybavení.....	61
5.3.2.2	Měření a úprava dat	62
5.3.2.3	Vyhodnocení dat	64
5.3.3	Cytotoxicita	66
5.3.4	Termogravimetrie.....	67
5.3.5	Reologie	68
5.3.5.1	Vyhodnocení oscilačních testů	69
5.3.5.2	Vyhodnocení tokových testů	71
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	73
6.1	Systémy hyaluronan – tenzid v roztoku	73
6.1.1	Mapování interakce Hya s různými tenzidy.....	73
6.1.2	CTAB	74
6.1.3	Interakce při koncentracích blízkých CMC	75
6.1.3.1	Fosfátový pufr	75
6.1.3.2	Voda	76
6.1.3.3	Fluorescenční korelační spektroskopie	86
6.1.3.4	Testy na buňkách	92
6.1.4	Hydrofobně modifikované aminokyseliny.....	93
6.2	Gelové systémy hyaluronan – tenzid.....	96
6.2.1	Prvotní charakterizace	96
6.2.2	Solubilizační testy	97
6.2.3	Fluorescenční sondy.....	100
6.2.3.1	Vysychání	102
6.2.3.2	Zmrazení.....	103
6.2.4	Difúzní procesy	104
6.2.5	Vliv pH.....	105
6.2.6	Termogravimetrie.....	105
6.2.7	Relogie	109

6.2.7.1	<i>Oscilační testy</i>	109
6.2.7.2	<i>Tokové testy</i>	115
7	ZÁVĚR	119
8	LITERATURA	122
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	131
9.1	Seznam zkratek	131
9.2	Seznam symbolů	132
10	PŘÍLOHY	134
10.1	Příloha 1: Zpráva shrnující výsledky testů cytotoxicity	134
10.2	Příloha 2: Článek kapitola 6.1.1	139
10.3	Příloha 3: Článek kapitola 6.1.4	146
10.4	Příloha 4: Článek kapitola 6.2.7	150
10.5	Příloha 5: Životopis	158

1 ÚVOD

Interakce hyaluronanu 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 spektroskopie (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 vlastností těchto gelů a jejich termogravimetrické a reologické charakterizaci je pak věnována nezanedbatelná část práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nosičové systémy léčiv

Ve druhém století před naším letopočtem začal Claudius Galénos, osobní lékař císaře Marca Aurelia, dlouhou cestu vývoje lékových forem. Zdůrazňoval nutnost úpravy léčiva tak, aby je organismus mohl využít a navíc kladl důraz na kvalitu léčiv, zachování vždy stejného složení a dávkování [1]. Na prozatímním konci této cesty nyní stojí moderní nosičové systémy léčiv. Tyto mají za úkol umožnit dosažení optimální koncentrace léčiva přímo v postiženém místě a udržení této koncentrace po co nejdelší dobu. Tak by mělo dojít k výraznému omezení nebo i úplnému odstranění nežádoucích účinků způsobených hlavně nespecifickou distribucí léčiva. Cílená distribuce je obzvláště důležitá u léčiv s nízkými terapeutickými indexy, jako jsou cytostatika, imunosupresiva, více toxická antimikrobiální a antifungální léčiva apod. [2]. Největší pozornost se však zaměřuje na vývoj nosičů cytostatik z důvodu vysoké závažnosti nádorových onemocnění. Jejich častý výskyt v kombinaci s mnohdy velmi málo účinnou léčbou vede nevyhnutelně k vysoké úmrtnosti. Podle světové zdravotnické organizace zemřelo v České republice na rakovinné onemocnění v roce 2008 celkem 318 lidí na 100 000 obyvatel, což je v průměru zhruba každý 315tý člověk [3].

2.1.1 Cytostatika

V současnosti používaná léčba nádorového bujení v podobě chemoterapie užívá několik strategií, jak potlačit nekontrolovatelné dělení zhoubných buněk. Podle mechanismu účinku se aktivní látky používané v protinádorové léčbě tzv. cytostatika dělí na léčiva poškozující DNA, látky ovlivňující syntézu DNA a látky působící jinými mechanismy.

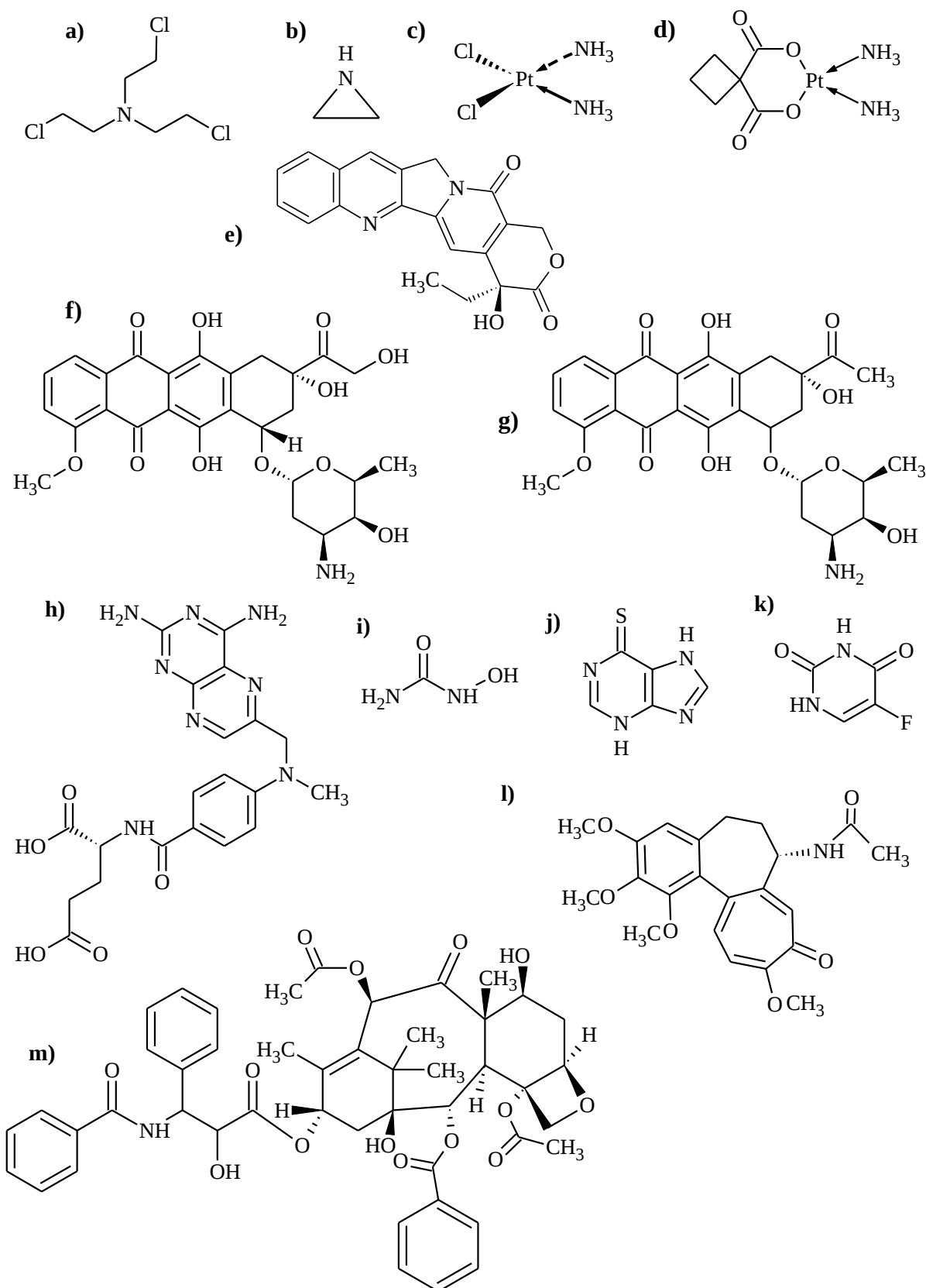
Mezi látky poškozující DNA patří například alkylující látky, které navázáním alkylového radikálu na DNA způsobují inhibici procesu buněčného dělení. Do této podskupiny látek patří například dusíkaté yperity nebo aziridiny (**obr. 1 a), b)**).

Další skupinou látek poškozujících DNA jsou platinová cytostatika. Účinky těchto látek byly náhodně objeveny při studiu vlivu elektrolýzy na růst buněčného kmene *E. Coli*. Při experimentech byla použita platinová elektroda a chlorid amonný jako elektrolyt, následně vznikl biologicky aktivní komplex cis-platina. Cisplatina je nejpoužívanější z této skupiny látek, svou vazbou na DNA poškozují její strukturu, protinádorové účinky tedy závisí na geometrii molekuly. Do skupiny těchto látek patří mimo cisplatiny (**obr. 1 c)**) také karboplatina (**obr. 1 d)**) a oxaliplatina.

Látky poškozující strukturu DNA jsou také inhibitory topoisomeraz, což jsou molekuly umožňující linearizaci vzájemně propojených či svinutých struktur DNA. Mezi tyto aktivní látky patří například deriváty alkaloidu camptotecinu (**obr. 1 e)**).

Jednou ze skupin jsou také látky vyvolávající interkalaci. Mechanismus účinku těchto látek je založen na jejich zabudování do struktury DNA, což ve šroubovici vyvolává zlomy. Hlavními zástupci těchto látek jsou antracykliny – doxorubicin, daunorubicin (**obr. 1 f), g)**), které jsou v dnešní době nepostradatelnou součástí léčby nádorů.

Dalšími skupinami látek jsou látky, jejichž účinek je založený na inhibici syntézy stavebních jednotek DNA (methotrexát, hydroxykarbamid viz **obr. 1 h), i)**), zabudování falešných stavebních jednotek DNA (6-merkaptopurin, 5-fluorouracil viz **obr. 1 j), k)**), látky působící interakci s mikrotubuly, které jsou nutné k tvorbě mitotického vřeténka, což má za následek inhibici růstu nových buněk (kolchicin, paclitaxel viz **obr. 1 l), m)**)



Obr. 1: Příklady cytostatik: a) dusíkatý yperit HN3; b) základní struktura aziridinu; c) cisplatina; d) karboplatina; e) camptotecin; f) doxorubicin; g) daunorubicin; h) metotrexát; i) hydroxykarbamid; j) 6-merkaptopurin; k) 5-fluorouracil; l) kolchinin; m) paclitaxel

Hlavní nevýhodou cytostatik je jejich nespecifický účinek a i když tyto látky zasahují hlavně rychle se proliferující tkáň, nelze jejich působení omezit pouze na postižené místo organismu. Dochází tak k mnoha nežádoucím účinkům a to od lehčích potíží až ke komplikacím ohrožující samotný život. Mezi jejich nežádoucí účinky patří poškození krevetvorby, postižení kostní dřeně, pokles množství bílých krvinek až naprostá devastace imunitního systému, který je ale ke konečné likvidaci nádorového onemocnění nutný, poruchy srážlivosti krve kvůli nedostatku trombocytů, anemie, kardiovaskulární poruchy, nevolnost a zvracení, poškození sliznice dutiny ústní a krku, dočasná ztráta vlasů, poškození nervové soustavy, trvalé poškození některých orgánů jako jsou ledviny nebo játra ukládáním neodbouratelných aktivních látek a navíc možný vznik rezistence nádorové tkáně vůči cytostatiku [4].

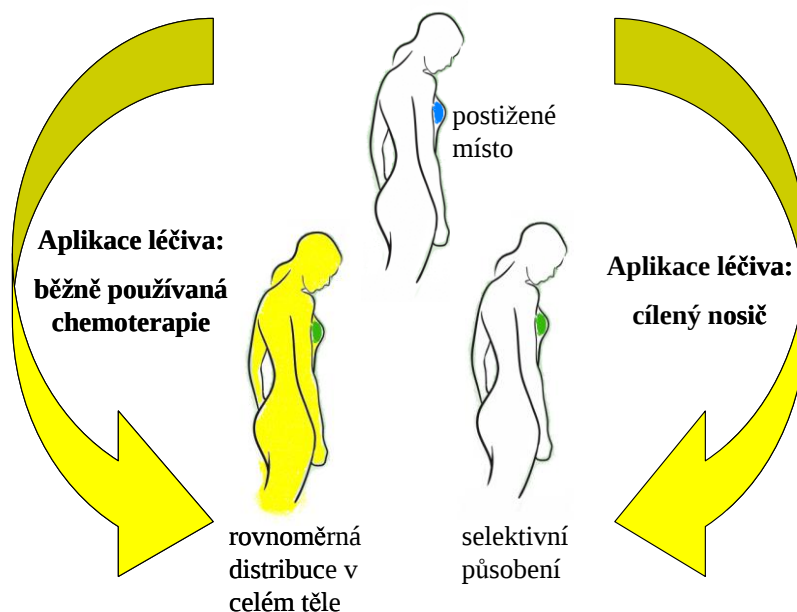
Právě kvůli tomuto dlouhému a stále neúplnému seznamu komplikací je zřejmá potřeba nových účinnějších a šetrnějších prostředků pro léčbu nádorových onemocnění, které budou schopny potlačit resistenci nádorových tkání, prodloužit uvolňování a tím také působení aktivní látky a doručit léčivo přímo a jen na požadované místo účinku tzv. **cílení**.

2.1.2 Cílení

Díky cílení nosičů léčiv dochází k transportu aktivní látky, ať už je to cytostatikum nebo zástupce jiné skupiny léčiv, především do postižené tkáně. Lze tak omezit a v ideálním případě eliminovat výše uvedené nežádoucí účinky a s tím je nerozlučitelně spojeno zvýšení komfortu pacienta, protože dochází k efektivnějšímu působení na nádorové buňky. Cílení se dělí podle strategie doručení léčiva na požadované místo. Nejjednodušší formou cílení je aplikace přímo do/na postižené místo např. injekčně. Dalšími dvěma typy cílení nejvíce spojenými s polymerními nosiči jsou cílení pasivní a aktivní.

Pasivní cílení je přímo spojeno s polymerní povahou nosiče léčiv. V tomto případě je důležitá velikost polymerního nosiče, která musí být v rozsahu od 6 nm, tak aby systém nebyl vyloučen renální exkrecí, do 200 nm [5], tak aby nedocházelo k pohlcování částic fagocyty a jejich vyloučení játry. Pokud nosič léčiva spadá svou velikostí do výše uvedeného rozmezí, pak dochází ke dvěma efektům. K prodloužení doby jeho cirkulace v krvi a k jeho ukládání v nádorových tkáních ve zvýšené míře. Nádorová tkáň má totiž řadu specifíků, především jde o mnohem větší propustnost cévního systému nádorové tkáně pro velké molekuly, což spolu s nedostatečným nebo často i úplně chybějícím odtokem lymfy způsobuje hromadění velkých molekul v nádorové tkáni (tzv. Enhanced Permeability and Retention efekt neboli EPR efekt) [6]. Proto se makromolekuly a částice o velké relativní molekulové hmotnosti hromadí v nádorové tkáni, často s více než dvacetinásobnou selektivitou oproti normální tkáni [7].

Cílení aktivní spočívá ve vazbě specifického ligandu na nosič. Mnoho typů nádorových buněk má totiž oproti normálním buňkám na svém povrchu ve zvýšené míře receptory pro určité ligandy. Jestliže je takový ligand navázán na polymerní nosič léčiv, pak může dojít ke specifické interakci s postiženou buňkou. Je-li navíc receptor po vazbě s ligandem schopen endocytózy, může se tak celý nosičový systém dostat přímo do buňky, kde se z něj uvolní aktivní látka a je tak dosaženo požadovaného účinku bez postižení jiných zdravých buněk. Zjednodušeně vyjadřuje strategii aktivního cílení **obr. 2**.



Obr. 2: Rozdíl mezi nespecificky působící aktivní látkou a cíleným nosičem léčiva.

2.1.3 Druhy nosičových systémů

Většina nano- a mikročástic pro cílenou distribuci léčiv je založena na organických polymerech, jako jsou například alifatické polyestery (polylaktid, polyglykolid a jejich kopolymery) a polysacharidy (alginát) nebo fosfolipidech (fosfatidylcholin). Popsány jsou však i nosiče založené na prázdných buňkách získaných dialýzou erytrocytů. Jednou z nejdůležitějších vlastností nosičového systému je jeho velikost a podle tohoto parametru lze také částice pro lékové formy rozdělit viz **tab. 1** [8].

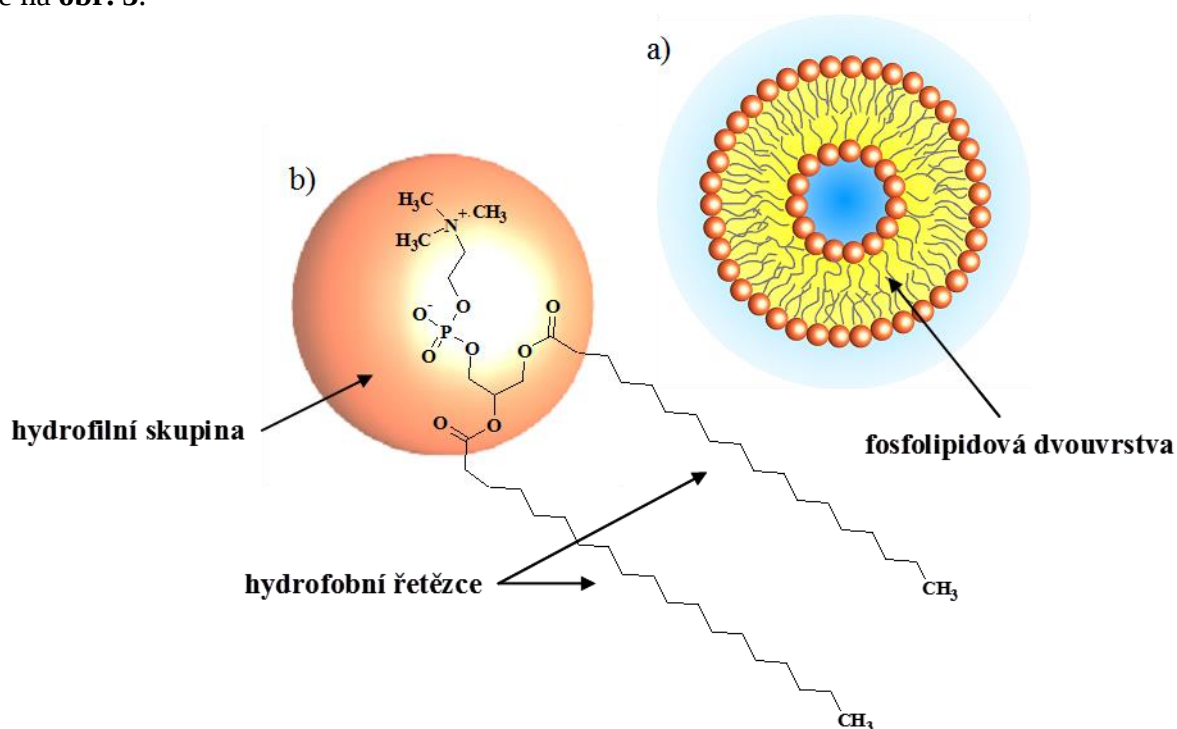
Tab. 1: Přehled druhů částic použitelných pro nosičové systémy a jejich velikosti

Druh částice	Velikost
Dendrimery	1,5 – 10 nm
Micely	10 – 30 nm
Polymerní micely	10 – 100 nm
Liposomy	20 – 300 nm
Koloidní polymerové částice	50 nm – 10 μ m
Organické polykondenzáty z přírodních a syntetických polymerů	20 nm – 1000 μ m

Vybrané částice jsou blíže popsány v následujících odstavcích. Mezi nejrozšířenější systémy patří liposomální nosičové systémy, polymerní micely a dendrimery.

2.1.3.1 Liposomy

Liposomy jsou vezikulární sférické útvary, jejichž stěna je tvořena jednou nebo více vrstvami lipidových membrán. Tyto membrány jsou nejčastěji tvořeny fosfolipidy (hlavně fosfatidylcholin ale i jiné fosfolipidy jako jsou fosfatidylglycerol nebo sfingomyelin), případně jinými amfifilními látkami [9]. Jejich plášť odděluje vnitřní prostor většinou s vodným prostředím od vnějšího kontinuálního média, kterým je v tomto případě také voda. Tato morfologie dovoluje liposomům sloužit jako nosiče pro léčiva s různými fyzikálními vlastnostmi, hydrofilní aktivní látky jsou uzavřeny ve vnitřním prostoru liposomu a hydrofobní léčiva mohou být solubilizována v lipidové dvojvrstvě. Výhodou liposomů je fakt, že jsou schopny pojmout poměrně velké množství léčiva oproti jiným druhům nosičových systémů, což je činí perspektivní lékovou formou například pro lokální aplikaci, navíc díky svému složení vykazují vysokou snášenlivost. Základní stavební jednotku a schéma liposomu je na **obr. 3**.



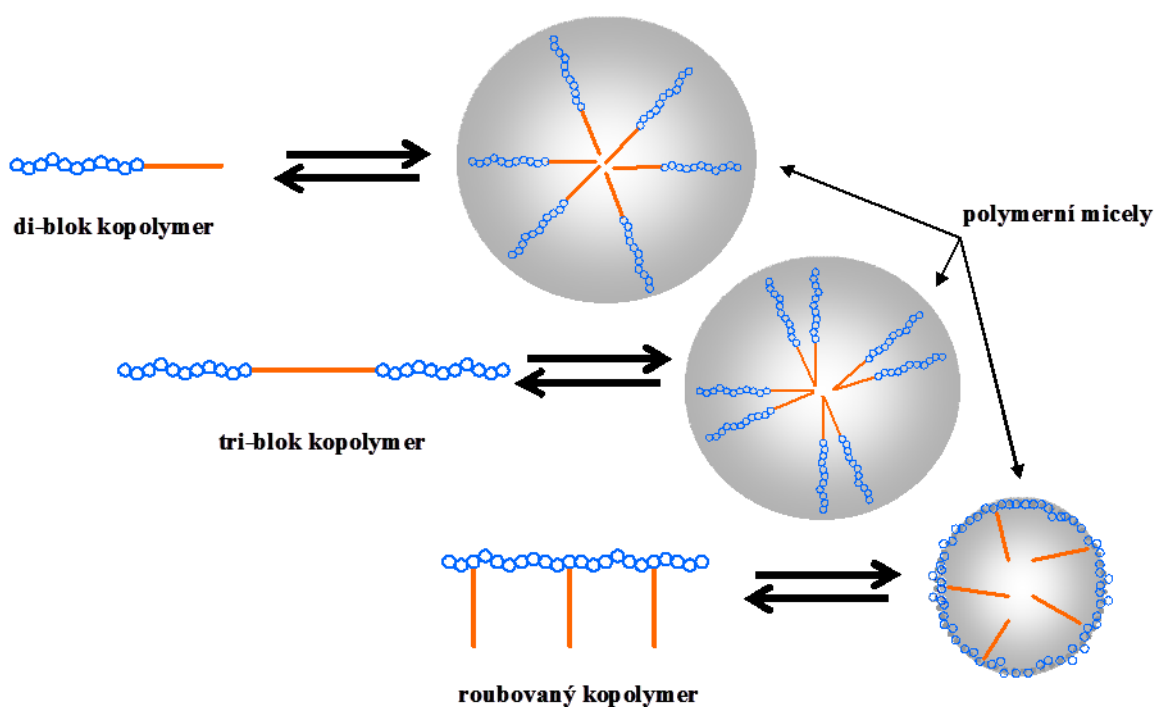
Obr. 3: a) schéma liposomu, b) struktura fosfatidylcholinu

2.1.3.2 Polymerní micely

Dalšími systémy vhodnými pro nosiče léčiv jsou **polymerní micely**. Základem je polymer, který pro účely distribuce léčiv musí být biokompatibilní a biodegradovatelný. Polymerní micely vznikají samovolnou agregací na základě hydrofobních interakcí, což znamená, že polymer tvořící micelu musí mít amfifilní charakter, neboli musí obsahovat část hydrofilní a část hydrofobní. Tato podmínka je splněna u kopolymerů obsahující monomerní jednotky požadovaných vlastností. V úvahu přicházejí blokové a roubované kopolymery.

Výhodou polymerních micel je jejich vysoká molekulová hmotnost, která díky EPR efektu zajišťuje pasivní cílení nosičového systému. Díky svým vlastnostem slouží polymerní micely jako nosiče pro hydrofobnější aktivní látky, čemuž odpovídá většina používaných kancerostatik. Léčivo může být v tomto druhu nosiče vázáno jak hydrofobně tj.

solubilizováno v jádře micely, tak kovalentně tj. biodegradovatelnou vazbou nebo vazbou citlivou např. na pH. Hydrofobní vázání je výrazně jednodušší a univerzálnější, avšak nelze přesně řídit rychlost uvolňování aktivní látky, což systém s kovalentně vázaným léčivem umožňuje [10]. Oba principy vázání se také dají kombinovat, kdy v případě systému kopolymeru polyethylenglykol-polyasparagová kyselina a kancerostatika doxorubicin je léčivo vázáno na hydrofilní polymerní kostru kovalentně a tvoří tak přímo hydrofobní část polymeru potřebnou k agregaci a zároveň je další podíl léčiva v systému vázán hydrofobně, tedy rozpuštěn v jádře micely. Navíc není vyloučena další modifikace tohoto systému v podobě navázání konkrétní látky zajišťující díky specifické interakci aktivní cílení. Z těchto důvodů tvoří polymerní micely velmi variabilní systém pro cílenou distribuci léčiv.

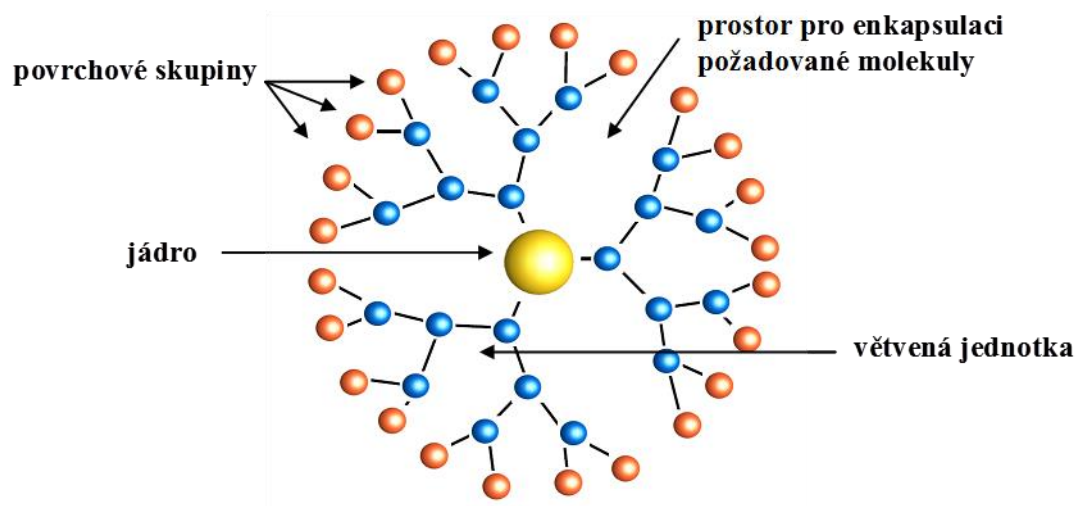


Obr. 4: Schéma polymerních micel vznikajících z různých druhů kopolymerů.

2.1.3.3 Dendrimery

Dendritové polymery tzv. **dendrimery** jsou potenciálními nosiči léčiv s několika výhodami. Mají dobře definovanou trojrozměrnou strukturu s jasně patrným jádrem a stěnou. Na rozdíl od ostatních asociátů mají jednotnou molekulovou strukturu a lze je syntetizovat postupně a dosáhnout tak různých velikostí. Oproti běžným polymerům, jejichž použití v technologických aplikacích s přesnými požadavky na velikost molekul je limitováno jejich polydisperzitou, představují dendrimery první syntetické makromolekuly s přesně definovanou velikostí. Další výhodou, která dělá z dendrimera velmi flexibilního nosiče, je možnost speciální úpravy dendrimerové molekuly na míru molekuly aktivní látky. Základním stavebním prvkem dendrimera je větvičí se jednotka. Struktura konkrétních dendrimerů je pak závislá na tvaru jeho jádra, které může být tvořeno malými vícevaznými molekulami, polymerem nebo dokonce jiným dendrimerem. Na jádro jsou připojeny jednotlivé rozvětvené jednotky, jejichž struktura je pevně kovalentně vázána a na jejichž fyzikálních vlastnostech závisí vlastnosti vnitřní části dendrimera. Mezi těmito jednotkami je pak prostor pro

enkapsulování požadovaných molekul. Poslední vrstva dendrimera může být tvořena odlišnými skupinami udávajícími charakter, který bude částice vykazovat vůči svému okolí. Lze tak připravit částici s kationtovým, aniontovým, neutrálním, hydrofobním nebo hydrofilním povrchem nebo také na povrch připojit přímo skupiny zajišťující specifické cílení. Schématické znázornění dendrimera je zobrazeno na **obr. 5**.

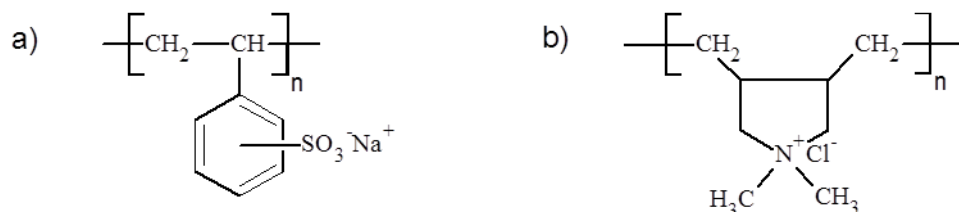


Obr. 5: Zjednodušené schéma dendrimera.

2.2 Polyelektrolyty

S ohledem na výše uvedené druhy nosičových systémů a na fakt, že strategie jejich přípravy lze do jisté míry kombinovat, jsou také agregáty polymerů s tenzidy potenciální nosičové systémy. Vázání obou komponent může být totiž zajištěno elektrostaticky, což znamená, že do systému nejsou zaváděna nové chemické vazby. Tento fakt s sebou s pohledu nosičových systémů nese výhodu nepozměněné struktury komponent a tudíž zachované biokompatibility a biodegradability výchozích látek tvořících systém.

Polyelektrolyty jsou polymery nesoucí na polymerní kostře ionizovatelné skupiny, které jsou v polárních rozpouštědlech schopny disociovat. Roztok polyelektrolytu se poté sestává z polymerního makroiontu, jehož povaha závisí na povaze ionizovatelných skupin (makroanion nebo makrokation), a malých disociovaných iontů (tzv. protionty). Vlastnosti těchto polymerů v roztoku nebo na nabitěm povrchu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi něž patří hlavně koncentrace polyelektrolytu, frakce disociovaných iontových skupin, hustota náboje na řetězci, kvalita rozpouštědla pro polymerní kostru, dielektrická konstanta roztoku, přítomnost dalších látek zejména nízkomolekulárních solí a jejich koncentrace.



Obr. 6: a) příklad aniontového polyelektrolytu – polystyrensulfoát sodný, b) příklad kationtového polyelektrolytu – poly(diallyldimethylamonium) chlorid

Příklady polyelektrolytů jsou uvedeny na **obr. 6** [11]. Například polystyrensulfonát sodný je ve vodném roztoku disociovaný na makroion a protionty v celém rozsahu stupnice pH. Také polymery jako je polyakrylová kyselina a polyetylenimin jsou obvykle označovány jako polyelektrolyty navzdory tomu, že tvoří disociovaný systém polyion-protionty pouze v omezeném rozsahu pH a zůstávají jako nedisociovaná polykyselina v kyselém prostředí respektive nedisociovaná polyzásada v alkalickém prostředí, což je chování typické pro slabé polyelektrolyty. Na druhé straně polymery jako celulóza schopné částečné disociace při extrémně alkalických podmínkách nejsou za polyelektrolyty označovány, protože v konvenčním rozsahu pH zředěného vodného systému nejsou OH skupiny ionizovány.

Existuje také speciální skupina polyelektrolytů, tzv. polyamfolyty, které nesou na makromolekule kovalentně vázané aniontové i kationtové skupiny. V přírodě jsou reprezentovány početnou skupinou proteinů, ale mohou být vytvořeny také synteticky vhodnou kopolymerací. Důležitou charakteristikou této skupiny polyelektrolytů je tzv. **izoelektrický bod**, což je hodnota pH, při které jsou kladné a záporné náboje vyrovnány a makromolekula navenek nevykazuje žádný náboj.

Následující příklady polyelektrolytů ilustrují jejich obrovskou variabilitu z hlediska chemické struktury. Vybrané skupiny polyelektrolytů jsou např.: aniontové a kationtové polysacharidy a jejich deriváty, nukleové kyseliny, polyakrylová a polymetakrylová kyselina a její kopolymery, kopolymery anhydridu kyseliny maleinové, polystyrensulfonová kyselina a její kopolymery, polyetylen imin a jeho kopolymery, polyaminy a polyamidaminy nebo homopolymery a kopolymery kationtových esterů akrylové kyseliny. V kontrastu s touto variabilitou vyplývající ze široké škály polymerních koster, počet možných ionizovatelných skupin zodpovědných za typické chování polyelektrolytu v roztoku je poměrně malý viz **tab. 2** [11]. U těchto skupin rozhoduje o chování polyelektrolytu nejen jejich povaha (aniontové a kationtové), ale také jejich ochota disociovat (slabě a silně kyselé nebo zásadité).

Tab. 2: Přehled ionizovatelných skupin zodpovědných za náboj polyelektrolytu

aniontové	kationtové
$-\text{COO}^-$	$-\text{NH}_3^+$
$-\text{CSS}^-$	$=\text{NH}_2^+$
$-\text{OSO}_3^-$	$\equiv\text{NH}_3^+$
$-\text{SO}_3^-$	$-\text{NR}_3^+$
$-\text{OPO}_3^{2-}$	

Dalším rozhodujícím parametrem determinujícím chování polyelektrolytu je průměrná vzdálenost mezi sousedními náboji podél polymerního řetězce. Tato hustota nosičů náboje nebo také **hustota náboje** je definována jako průměrná vzdálenost mezi ionizovanými skupinami, nebo jako průměrný počet ionizovaných skupin na monomerní jednotku. Kromě této průměrné hustoty náboje ovlivňuje vlastnosti polyelektrolytu také pravidelnost rozložení ionizovaných skupin podél řetězce. Typické chování polyelektrolytu vykazují makromolekuly, pokud je na kostře přítomna více než jedna ionizovaná skupina na deset monomerních jednotek.

Mimo aciditu respektive bazicitu a hustotu náboje na řetězci existuje ještě třetí důležitý parametr ovlivňující chování polyelektrolytu a tím je lokace nabitých skupin z hlediska

molekulární geometrie makroiontu. Z tohoto pohledu rozlišujeme mezi dvěma typy polyelektrolytů, z nichž jeden je tzv. integrální, kdy jsou ionizované skupiny částí polymerní kostry a druhý je typ, kdy jsou ionizovatelné skupiny zavěšeny na kostře jako boční řetězce, pomocí tzv. spacerů, se širokou variabilitou délky spaceru. Geometrická pozice nabitých skupin je důležitá hlavně při tvorbě elektrostaticky vázaných komplexů.

Kromě těchto tří parametrů charakterizujících makroion, mají také velký vliv na vlastnosti celého systému v roztoku nízkomolekulární protionty, zvláště pak s ohledem na rozpustnost. Volba protiontu může rozhodnout o rozpustnosti, respektive nerozpustnosti celého systému, což dokazuje že protionty nejsou pouze částice zajišťující elektroneutralitu.

Chování polyelektrolytů je také v mnoha směrech odlišné od chování nenabitých polymerů. Přechod ze zředěného do polozředěného režimu probíhá při mnohem nižších koncentracích polymeru než v roztocích neutrálních polymerů. Osmotický tlak polyelektrolytu v roztocích bez přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu převyšuje osmotický tlak neutrálního polymeru při stejné koncentraci polymeru až o několik řádů. Vzrůstá téměř lineárně s koncentrací polymeru a je nezávislý na molekulové hmotnosti řetězce v širokém rozsahu koncentrací polymeru. Tato téměř lineární závislost osmotického tlaku společně s jeho silnou závislostí na přidavku nízkomolekulárního elektrolytu naznačuje, že hlavní příspěvek k celkovému osmotickému tlaku mají disociované protionty [12].

2.2.1 Interakce polyelektrolyt-amfifilní látka

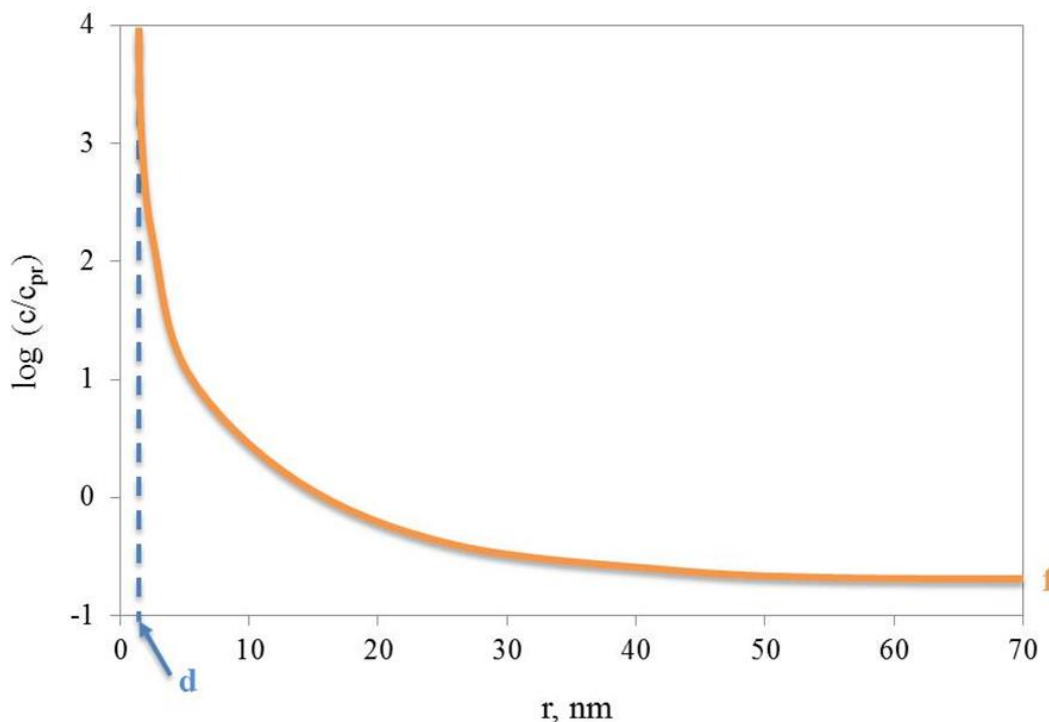
Každý polyion je v roztoku obklopen ekvivalentním množstvím nízkomolekulárních opačně nabitých protiontů. Je dobře známo, že z důvodu vysokého elektrického náboje na polymerním řetězci zůstává velké množství protiontů blízko řetězce polyionu. Naneštěstí, žádná experimentální metoda neumí rozlišit mezi několika způsoby, kterými mohou protionty s polyiontem interagovat. Mohou být kovalentně navázány na nabitých skupinách, mohou být zapojeny v interakcích krátkého dosahu u těchto nabitých skupin ve formě iontových párů („site binding“), nebo drženy Coulombickými silami v iontové atmosféře blízko polyionu („ionic atmosphere binding“).

Podobnou představu o vázání protiontů lze přijmout také pro systémy obsahující tenzidové protionty, avšak v tomto případě může přistupovat do úvahy několik dodatečných efektů. Hlavními faktory, které ovlivňují vázání iontového tenzidu na polyelektrolyt s opačným nábojem, jsou hustota náboje na polyionu, hydrofobní charakter tenzidu (délka jeho uhlíkového řetězce) a přídatné přitažlivé síly mezi polyelektrolytem a micelami tenzidu v případě hydrofobních funkčních skupin přítomných na řetězci polyelektrolytu.

Iontovou atmosféru popisuje Poisson-Boltzmannův vztah a tzv. „cylindrical cell model“. Obr. 7 [13] je příkladem takové modelace a ukazuje změnu lokální koncentrace monovalentních protiontů s radiální vzdáleností od osy cylindrického polyionu.

Obr. 7 ukazuje, že lokální koncentrace protiontů (poloměr protiontu zhruba odpovídá vzdálenosti do které je ve směru osy polyionu schopen dosáhnout kladný náboj kationtu) přesahuje průměrnou koncentraci na povrchu polyionu a také v radiální vzdálenosti srovnatelné s délkou uhlíkového řetězce. Můžeme tedy soudit, že díky čistým elektrostatickým interakcím mezi anionem polyelektrolytu a tenzidovým protiontem dochází také ke značné akumulaci nepolárních částí amfifilních molekul v sousedství polymeru. Jako důsledek probíhá v těchto oblastech agregační proces při celkové koncentraci tenzidu, která je o několik řádů nižší než kritická micelární koncentrace amfifilní látky v čistém rozpouštědle bez přítomnosti polyelektrolytu. Výsledné malé agregáty se chovají jako multivalentní ionty -

„minimicely“ a jsou zachyceny v oblastech s vysokým elektrostatickým potenciálem blízko makroiontu. Agregáčnı́ čísla těchto agregátů jsou nižší než běžná agregáčnı́ čísla volných micel.



Obr. 7: Změna lokální koncentrace c monovalentního protiontu s radiální vzdáleností r od osy cylindrického polyionu. Průměrná koncentrace protiontu je označena c_{pr} , d je vyloučená vzdálenost od osy polyionu do středu protiontu a f je frakce volných protiontů [13].

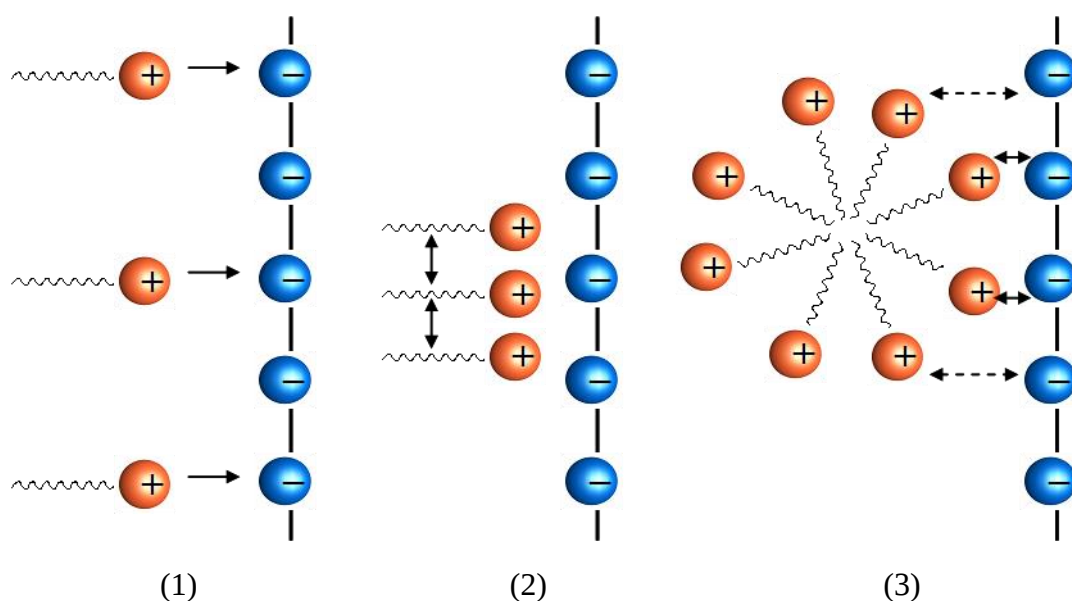
Velký vliv na vázání protiontů a potažmo iontovou atmosféru polyelektrolytu má mimo hustoty náboje makroiontu také náboj protiontů. Protionty vyššího náboje se shlukují mnohem intenzivněji kolem polyionu než ty které mají nižší náboj a mezi ionty stejného náboje převládají v populaci vázaných iontů ty, které mají menší rozměry.

Hlavnı́ rozdıl mezi vázáním jednoduchého anorganického protiontu a tenzidového protiontu plyne z částečně hydrofobního charakteru amfifilního protiontu. Zatímco jednoduché protionty se na polyelektrolyt vážou nekooperativně, amfifilní protionty jsou vázány kooperativně.

Jak bylo diskutováno výše, značná akumulace nepolárních částí tenzidového iontu v blízkosti polyionu vede k agregaci a vzniku „minimicel“ mnohem častěji nazývaných micely indukované polyelektrolytem. Proces je podobný běžné micelizaci v tom, že hlavní řídící silou agregace je tendence uhlíkového řetězce tenzidu minimalizovat kontakt s vodou. Jakmile jsou vytvořeny nabité micely tenzidu indukované polyelektrolytem, vážou se velmi silně na polyion tak jako multivalentní protionty. Distribuce iontů tenzidu podél řetězce není proto rovnoměrná jako je tomu u jednoduchých protiontů. Naopak jsou lokalizovány ve formě agregátů v oddělených částech řetězce polyelektrolytu. Při mnoha různých termodynamických měřeních a měřeních transportních vlastností ve směsném roztoku polyelektrolytu a tenzidu bylo zjištěno, že část polyionu na kterou jsou agregáty tenzidu vázány je termodynamicky inaktivní, zatímco volné části se chovají jako plně nabitě tyčinky s nezměněnou hustotou náboje až do zhruba 50% nasycení řetězce. Při vyšších stupních komplexace se stává stínění

polyionu agregáty tenzidu mnohem intenzivnější díky změně v konformaci řetězce a měřené vlastnosti vykazují změnu v jejich chování. Toto pozorování je potvrzením kooperativní povahy vázání tenzidu popsané výše. Schematické znázornění prvních dvou kroků v procesu vázání je uvedena na **obr. 8** [13, 14].

Protože hlavní řídicí silou pro samovolnou asociaci tenzidu ve směsných systémech polymer-tenzid je hydrofobní efekt, vázání tenzidu na polyelektrolyt vykazuje podobnou závislost na délce alkylového řetězce jako je známa pro běžnou micelizaci. Tenzidy s delším uhlíkovým řetězcem se vážou mnohem silněji na polyion, než ty s kratšími řetězci a vázání začíná při nižší koncentraci tenzidu. V této souvislosti je vhodným parametrem k charakterizaci systému polyelektrolyt-tenzid **kritická agregační koncentrace (CAC)**, která je analogická klasické **kritické micelární koncentraci (CMC)**, ale používá se pro roztoky tenzidů v přítomnosti polymeru. Je definována jako koncentrace tenzidu na počátku „kooperativního vázání“. Termín CAC vede k představě tenzidových agregátů podobných micelám, které se začínají formovat v relativně úzkém koncentračním rozmezí. CAC klesá se vzrůstající délkou uhlíkového řetězce tenzidu podobně jako CMC. Avšak důležitým rozdílem mezi oběma koncentračními parametry je fakt, že CAC může být až o několik řádů nižší než CMC, což závisí na povaze polyionu a tenzidového iontu. Snížení CAC vztaženo k CMC je vhodným měřením přitažlivé síly polyelektrolyt-tenzid.



Obr. 8: Schéma interakcí při vázání iontového tenzidu na opačně nabitý polyelektrolyt. Kroky v procesu vázání: (1) elektrostatické vázání; (2) kooperativní vázání; (3) přídavné hydrofobní síly mezi agregáty tenzidu a řetězcem polyelektrolytu. Přerušované šipky symbolizují Coulombické síly dlouhého dosahu mezi nabitými částmi, zatímco plné kratší šipky reprezentují hydrofobní síly mezi alkylovými řetězci tenzidu nebo mezi micelárním jádrem a řetězcem polyionu.

Dalším faktorem, který má důležitý vliv na vázání tenzidu na polyelektrolyt, jsou specifické přídavné přitažlivé síly, které napomáhají nebo dokonce způsobují vzájemnou agregaci (**obr. 8 (3)**). Zde je důležitý hydrofilní/hydrofobní charakter funkčních skupin na polymeru. Například některé ve vodě rozpustné polyelektrolyty, jako je polystyrensulfonát sodný, mohou být považovány částečně za hydrofobní díky přítomnosti aromatických

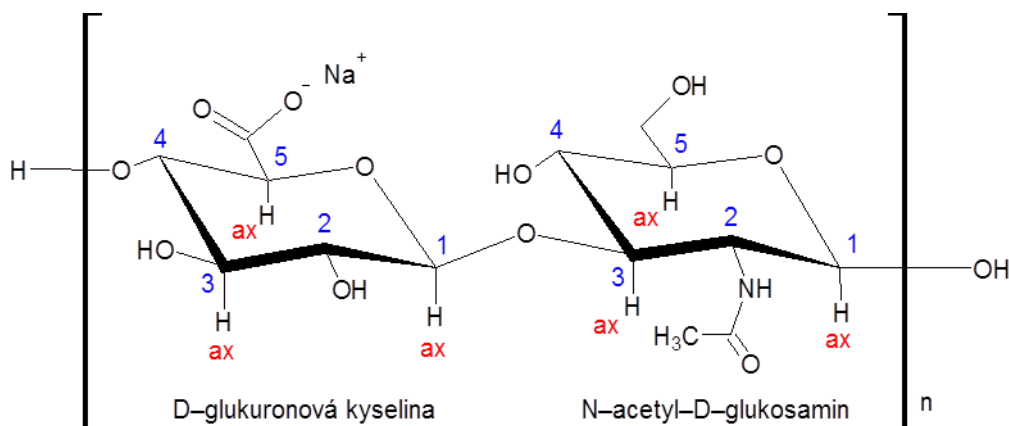
vedlejších skupin na řetězci. Tyto skupiny mají přirozenou tendenci minimalizovat svůj kontakt s vodou, proto mohou být solubilizovány v hydrofobních mikrodoménách, jako jsou micely tenzidu, pokud jsou tyto v systému přítomné. NMR měřením provedeným v roztoku polystyrensulfonátu sodného a dodecyltrimetylamonium bromidu (DoTAB) bylo prokázáno, že se aromatické skupiny polystyrensulfonátového aniontu nacházejí v blízkosti povrchu micely tenzidu (primárně na rozhraní nabitých micel blízko β -CH₂ skupiny uhlíkového řetězce tenzidu). V souladu s tím se hydrofobní část řetězce polyelektrolytu účastní na formaci komplexu. Někteří autoři proto používají pro tyto komplexy termíny jako směsné micely [16] (nebo agregáty agregátů) [17]. Na druhé straně hydrofilní polyelektrolyty, které obsahují například sulfátové nebo karboxylové vedlejší skupiny jako je polyvinylsulfonát nebo polyakrylát nemají potřebu omezovat kontakt s vodou v žádné části řetězce. Nemají žádnou tendenci účastnit se na formaci micel a v tomto případě je interakce polymer-tenzid čistě elektrostatická. V přítomnosti těchto polyelektrolytů je většina micel běžných tenzidů tvořena bez zapojení řetězce polyelektrolytu. Jsou na polyion vázány Coulombickými interakcemi jako multivalentní protionty a pokud je řetězec polyelektrolytu dostatečně flexibilní, potom se obaluje okolo agregátu tenzidu.

Kromě obou výše uvedených případů může být hydrofobní charakter polymeru podpořen nebo zcela vytvořen díky syntetické úpravě makromolekuly. Hydrofobní části mohou být reprezentovány hydrofobními skupinami jako alkylové řetězce nebo nepolární aromatická barviva. Tyto polymery jsou známy jako hydrofobně modifikované polyelektrolyty.

Závěrem můžeme rozlišit tři idealizované kategorie komplexů polyelektrolyt-tenzid s ohledem na roli řetězce polymeru v procesu komplexace. Seřazeny podle vzrůstajícího hydrofobního charakteru polyionu mohou být komplexy zařazeny skupin (1) komplexy s hydrofilními polyelektrolyty; (2) komplexy s hydrofobními polyelektrolyty a (3) komplexy s hydrofobně modifikovanými polyelektrolyty.

2.2.2 Hyaluronan

Tento biopolymer se v živém organismu vyskytuje převážně v disociované formě sodné a draselné soli. Ve vodném roztoku má charakter polyaniontu, díky disociaci karboxylových skupin. Molekula této biologicky multifunkční látky je přísně lineární polymer složený z disacharidových podjednotek skládajících se z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Tyto jednotky jsou střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou. Vazby jsou navíc stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky. Primární struktura hyaluronanu (Hya) má důležité následky pro sekundární strukturu v roztoku. Glukóza v β konfiguraci dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé atomy vodíku obsazují ve struktuře méně stericky výhodné axiální polohy. Hlavním důsledkem tohoto uspořádání je výskyt hydrofobních oblastí v molekule tzv. „hydrophobic patch“, které jsou tvořeny právě axiálními vodíky, viz **obr. 9** [17-19].



Obr. 9: Základní struktura molekuly hyaluronanu obsahujícího β 1 $\rightarrow$ 3-glykosidickou vazbu a β 1 $\rightarrow$ 4-glykosidickou vazbu.

Velké množství důležitých biologických rolí hyaluronanu závisí na jeho amfifilní struktuře, která mu dává schopnost interagovat s membránami. Díky hydrofobním oblastem je totiž schopen vázat se na fosfolipidy, které tvoří hlavní komponentu membrán. Hyaluronan tak zvyšuje flexibilitu membrány červených krvinek a aktivně se podílí na biologických procesech, jako jsou například buněčná adheze, migrace a proliferace [20].

Největší množství hyaluronanu se vyskytuje v tkáních obratlovců, protože tento biopolymer je hlavní částí extracelulárního matrix, ve kterém se diferencuje většina tkání. Navíc je také nenahraditelnou součástí tkání dospělých, kde slouží jako strukturální organizátor díky schopnosti vázat se na ostatní komponenty matrix, jako je například hyalektinová třída proteoglykanů [21]. V některých případech je hyaluronan dokonce hlavní komponentou, jako je tomu např.: ve sklivci lidského oka, synoviální tekutině nebo oocytech. Kromě toho je důležitou součástí chrupavek, protože jeho vodné roztoky jsou velice viskózní. Mechanické studie synoviální tekutiny ukazují, že vysokomolekulární hyaluronan snižuje tření a tlumí nárazy v kloubech [22].

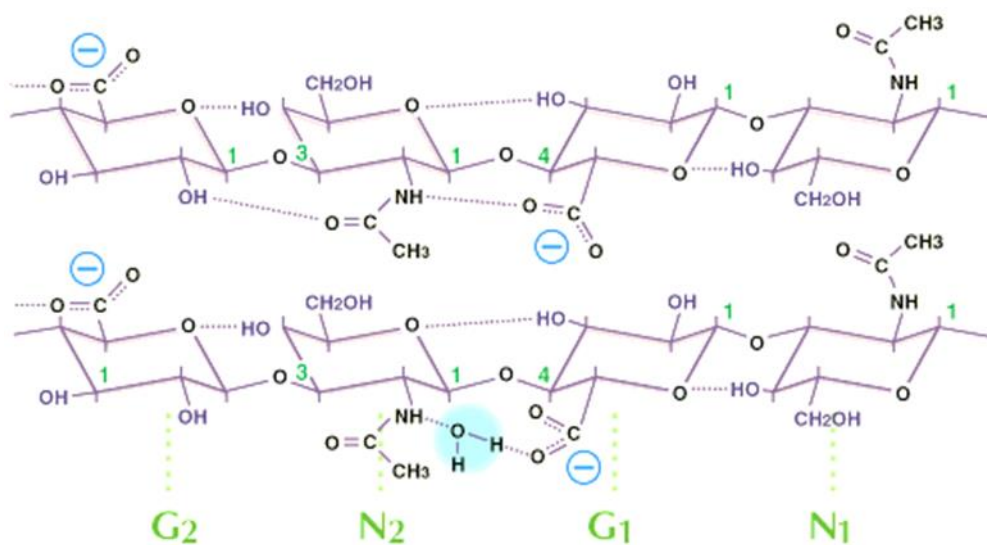
2.2.2.1 Sekundární a terciární struktura

S ohledem na primární a sekundární strukturu hyaluronanu předpokládal **Scott J. E. a spol.** [20], že jeho řetězce zaujímají v roztoku specifickou strukturu, kterou popisuje představa náhodně svinutého klubka tzv. „random coil“. Náhodnost struktury v roztoku je však v rozporu s podstatou evoluce živých organismů, protože čím více je systém náhodný, tím méně informací je takový systém schopen nést. Tento fakt se prakticky vylučuje se strategií vývoje živých organismů, která spočívá ve schopnosti snižovat entropii a tím předat co největší množství informací. Právě to vede k reprodukovatelnosti a schopnosti vývoje. Z toho důvodu je lepší pohlížet na molekulu hyaluronanu jako na systém zaujímající preferované tvary.

Řetězec hyaluronanu obsahuje dva druhy vazeb. Jedním z nich jsou vazby v uzavřených cukerných kruzích, které jsou poměrně fixní a do jisté míry udržují stálý tvar jednotlivých cukerných zbytků. Mezi těmito rigidními jednotkami je další druh vazeb tzv. **glykosidické vazby** skládající se z atomu kyslíku spojujícího jednotlivé cukry navzájem. Tyto vazby jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky, které jsou na **obr. 10** označeny tečkovanou čarou. Na obrázku lze také vidět, že i voda hraje důležitou roli ve stabilizaci

struktury. Z kyslíkového atomu v glykosidickém můstku vycházejí dvě vazby mající tvar písmene „V“. Cukerné kruhy připojené na koncích vazeb mohou rotovat o 360° . Přestože díky molekulárnímu modelování bylo prokázáno, že ze sterických důvodů nemají substituenty úplnou svobodu v tom, jakou konfiguraci kolem atomu kyslíku zaujmou, existuje několik možností uspořádání pro každý druh glykosidického můstku. Násobek těchto možných konfigurací počtem můstků v řetězci hyaluronanu dává obrovský počet možných tvarů jedné molekulové kostry. To je důvod proč se uspořádání řetězce může zdát náhodným, ale ve skutečnosti tomu tak není.

NMR techniky potvrdily přítomnost uspořádané struktury hyaluronanu v roztoku, kde je každá disacharidová jednotka pootočená o 180° vůči té předchozí a následující. Dvě otáčky činí tedy celkově 360° a návrat k původní orientaci, proto je struktura nazývána jako dvakrát stočená šroubovice „**two-fold helix**“ (ne dvoušroubovice, „double helix“ v níž jsou propleteny dva řetězce např. u DNA). Nejen hyaluronan, ale i jiné polysacharidy, jako jsou chondroitin, keratan nebo dermatan zaujímají ve vodném roztoku podobnou dvojité stočenou šroubovici. Důležitost sekundární struktury jako důsledku jednoduché sekvence cukrů se ukazuje v případě, vezmeme-li v úvahu, že u hyaluronanu se ve dvojité stočené šroubovici vyskytují v řetězci po zhruba stejně dlouhých úsecích **hydrofobní oblasti** tzv. „hydrophobic patch“ [20]. Přítomností hydrofilních a hydrofobních oblastí se tento polysacharid řadí do skupiny amfifilních látek. Z toho důvodu molekula hyaluronanu zaujímá v roztoku strukturu, která je dosti náročná na prostor a zaujímá rozlehlou doménu.



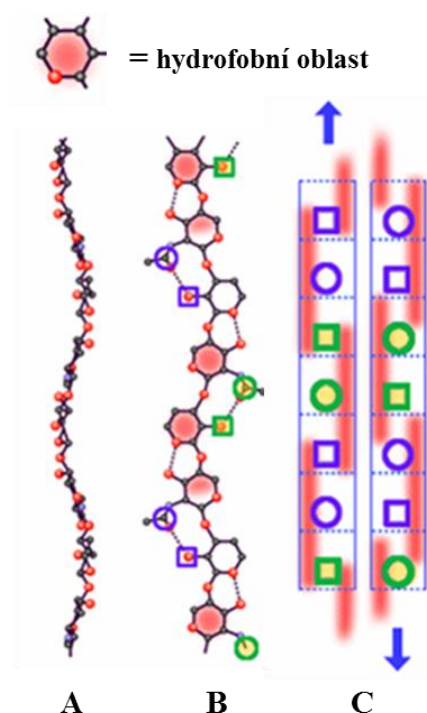
Obr. 10: Tetrasacharid obsažený v řetězci hyaluronanu skládající se ze dvou opakujících se disacharidových jednotek vykazujících v roztoku preferovanou konfiguraci. G je zbytek kyseliny glukuronové, N je N-acetylglukosamin. Tečkovaná čára znázorňuje vodíkové vazby, které jsou potenciálně přítomné v každém tetrasacharidu hyaluronanu. V nevodném rozpouštědle (dimetylsulfoxid) je vodný můstek mezi acetamidem (N_2) a karboxylem (G_1) nahrazen přímou vodíkovou vazbou [20].

Doménová struktura hyaluronanu má charakteristické vlastnosti. Malé molekuly jako je voda, nízkomolekulární elektrolyty a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem v doméně, zatímco větší molekuly jako například proteiny jsou z domény částečně vytlačovány díky jejich hydrodynamické velikosti. Čím větší jsou molekuly, tím méně prostoru pro ně v doméně hyaluronanu bude, což zpomaluje difúzi makromolekul skrz

doménu a způsobuje jejich vyšší zádrž uvnitř oproti okolnímu prostředí bez hyaluronanu. Efektivní velikost pórů v doméně se kontinuálně mění, statisticky tedy mohou existovat póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností. To znamená, že skrz síť hyaluronanu mohou projít molekuly všech velikostí, avšak s různým stupněm retardace závislejícím na jejich velikosti [23].

2.2.2.2 Interakce řetězců, síťování

Řetězce hyaluronanu mohou také interagovat mezi sebou, částečně tomu napomáhají přitažlivé síly mezi hydrofobními oblastmi. Plochá stuhovitá sekundární struktura má specifické vlastnosti, obě strany stuh jsou totiž identické, avšak jedna strana je v opačném směru k druhé, jsou tedy antiparalelní. To má za následek, že co je možné na jedné straně stuhy, je možné také na druhé. Agregáty mohou vznikat z obou stran. Elektrostatická repulze mezi zápornými náboji podporující disociaci agregátů, je v tomto případě překonána hydrofobními interakcemi a také vodíkovými můstky mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou. Přesto jsou síly, které drží síť pohromadě poměrně slabé, a proto se agregáty nepřetržitě tvoří a disociují v závislosti na okolních podmínkách. **Obr. 11** zobrazuje interakci mezi dvěma řetězci hyaluronanu.



Obr.11: Zobrazení interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu. A a B jsou zobrazení molekuly hyaluronanu, červené oblasti značí hydrofobní místa na střídajících se stranách polymerního řetězce, kruhy reprezentují acetamidovou skupinu a čtverce karboxylovou skupinu. C znázorňuje schéma možného duplexu mezi dvěma molekulami hyaluronanu v bočním náhledu. Dvě participující molekuly jsou navzájem antiparalelní. Tečkované čáry ohraničují každou cukernou jednotku. Červené pásy značí hydrofobní místa. Zakřivení v každé molekule viditelné na A a B přesně kopíruje zakřivení druhé molekuly v antiparalelním uspořádání, takže dvě molekuly zapadnou přesně do sebe. Hydrofobní místa potom přiléhají těsně k sobě a acetamidové a karboxylové skupiny jsou ve vzdálenostech vodíkových můstků [23].

2.2.2.3 Biosyntéza

Hyaluronan syntetizují specifické transmembránové proteiny s názvem hyaluronansyntázy. Jsou to jediné enzymy, které mají více funkcí. Syntéza řetězce hyaluronanu, který obsahuje deset tisíc disacharidových jednotek, představuje pro buňku nezanedbatelný energetický výdej. Není proto překvapující, že je ve většině buněk přísně regulována.

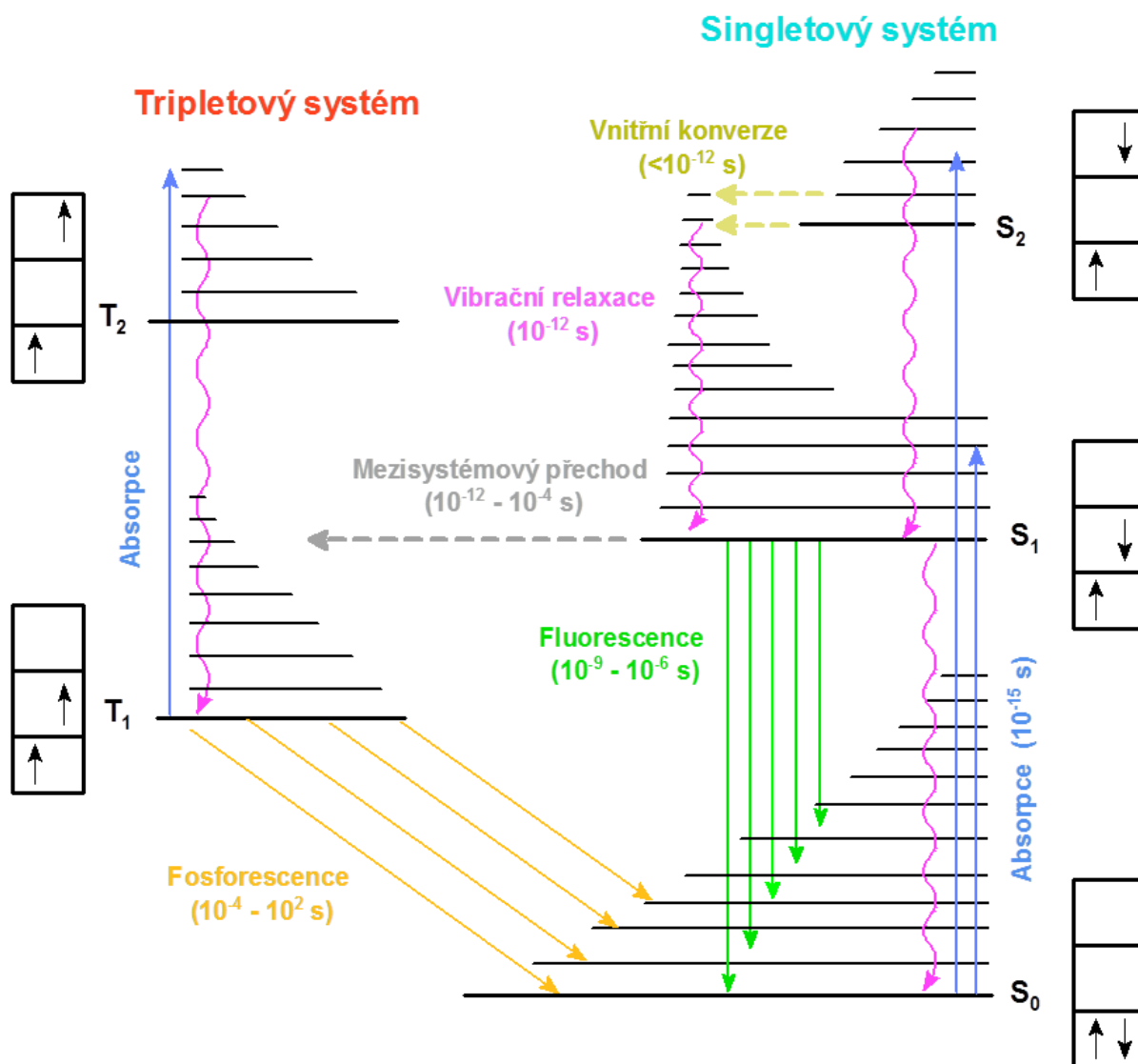
Většina glykosaminoglykanů, mezi které hyaluronan patří, je v živém organismu syntetizována v Golgiho aparátu uvnitř buňky a poté jsou připojeny k proteinům v jádře. Avšak hyaluronan je na rozdíl od nich syntetizován v plazmatické membráně a není propojen s žádným jaderným proteinem. Za jeho produkci v lidském organismu je odpovědná trojice hyaluronansyntáz, které jsou označovány jako HAS1, HAS2 a HAS3. Samotná syntéza probíhá na vnitřní straně buněčné membrány, kde příslušná hyaluronansyntáza střídavě váže k řetězci jednotlivé monosacharidové jednotky. Narůstající biopolymer je pak vytlačován skrz membránu do extracelulárního matrix, kde je hyaluronan schopen tvořit komplexy s proteiny a stává se tak součástí pericelulárního obalu. Společně s ostatními glykosamininy se také podílí na vzniku nadmolekulárních struktur zvaných proteoglykany a funguje tak jako organizátor extracelulární matrix.

Některé bakteriální kmeny jsou schopny syntetizovat hyaluronan stejně jako savci. Tato schopnost je součástí jejich jednoduché strategie, jak napadat hostitelský organismus. Takto jsou totiž lidské i zvířecí patogeny typu *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Pasteurella multocida*, schopny vytvořit si ochranný obal z hyaluronanu a skrýt se tak před imunitním systémem jejich hostitelů. Tato výhodná vlastnost jim dovoluje snadněji napadat hostitelské savčí organismy, protože jimi produkováný hyaluronan, tvořící ochrannou bariéru, má shodnou strukturu jako hyaluronan vyskytující se v savčích tkáních. Bakterie jsou proto těžko rozpoznatelné pro imunitní systém a hostitelský organismus se není schopen účinně bránit [24].

2.3 Fluorescence

Fluorescenční spektroskopie se ukázala být vhodnou metodikou právě k výzkumu systémů polyelektrolyt-tenzid. Zvláště pak metoda využívající fluorescenčních sond, které následně po inkorporaci do systému poskytují informace o jeho vlastnostech.

Obecně je fluorescence jev kdy díky absorpci světla molekulou v **základním stavu (S_0)** dojde k excitaci elektronu, který přechází z orbitalu s nejnižší energií reprezentujícího základní stav do nejbližšího neobsazeného orbitalu s energií vyšší. Tímto způsobem dochází k vytvoření jednoho ze dvou elektronově rozdílných excitovaných stavů. Prvním z nich je **singletový stav (S_1)**, ve kterém jsou spiny obou elektronů antiparalelní. Z kvantově-mechanického hlediska je vytvoření singletového excitovaného stavu nejpravděpodobnější. Druhým typem je **tripletový stav (T_1)**. V tomto případě jsou spiny obou elektronů paralelní. Fotofyziku organických molekul přehledně ilustruje Jablůňského diagram. Jeho základní schéma tvoří zobrazení relativních energií molekuly v základním stavu a stavech excitovaných. Nezářivé procesy jsou v diagramu označeny vlnovkami a uskutečňují se mezi vibračně-rotacími hladinami různých elektronových stavů. Při těchto procesech se nemění celková energie systému. Procesy, při kterých se mění celková energie systému, jsou označeny jako přímé šipky (**obr. 12**).



Obr. 12: Jablonského diagram

Molekula v excitovaném stavu ztrácí svoji přebytkovou energii různými deaktivacími procesy. Ze spektroskopického hlediska jsou nejdůležitější zářivé procesy vyznačující se emisí světelného kvanta. Tyto děje jsou označeny jako **luminiscence** a dělí se na fluorescenci a fosforescenci. **Fosforescence** je emise z tripletových excitovaných stavů, v nichž má elektron v excitovaném orbitalu shodně orientovaný spin jako elektron v orbitalu základního stavu, z toho důvodu je přechod spinově zakázán a emise fotonu je pomalá. To znamená, že doba života fosforescence se pohybuje v řádu milisekund až sekund. Naopak **fluorescence** je výsledkem spinově dovoleného přechodu obvykle z rovnovážné hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . V excitovaném singletovém stavu má elektron v excitovaném orbitalu opačný spin než elektron v orbitalu základního stavu. Návrat do základního stavu tedy probíhá rychlou emisí fotonu. Doba života fluorescence je přibližně 10 ns. Hlavní pravidla, jimiž se fluorescence řídí, shrnují následující odstavce.

Stokesův zákon, který říká, že vlnová délka (λ) emise při luminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). V důsledku to znamená, že světlo, které excituje elektrony, ztratí část své energie, což se projeví na prodloužení vlnové délky emitovaného světla.

Kashovo pravidlo, podle kterého dochází před emisí fluorescenčního kvanta k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, což má za následek, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . Je to z toho důvodu, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem S_1 je velmi malý a nezářivá přeměna z těchto stavů do základního stavu je velmi rychlá. Existují ale výjimky proti tomuto pravidlu v případě, že energetický rozdíl mezi S_2 a S_1 je srovnatelný s energií deaktivace do základního stavu.

Vavilovovo pravidlo, které tvrdí, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. To znamená, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace. Při hlubším zkoumání je však Vavilovovo pravidlo pouze důsledkem Kashova pravidla.

2.3.1 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy mohou nabídnout bohatství informací a jsou použitelné v široké škále odvětví. Obecně se tyto molekuly dělí na tři skupiny. První skupinou jsou tzv. **vnitřní sondy**, jsou to v podstatě fluoreskující části zkoumaných molekul, které jsou součástí jejich struktury. Takové molekuly mají tedy charakteristické fluorescenční vlastnosti i bez jakékoli další úpravy zavádějící fluorofor do systému. Jedná se například o proteiny, které samy o sobě vykazují fluorescenci v ultrafialové oblasti, za kterou jsou zodpovědné hlavně aromatické aminokyseliny jako např. tryptofan, tyrozin a fenylalanin.

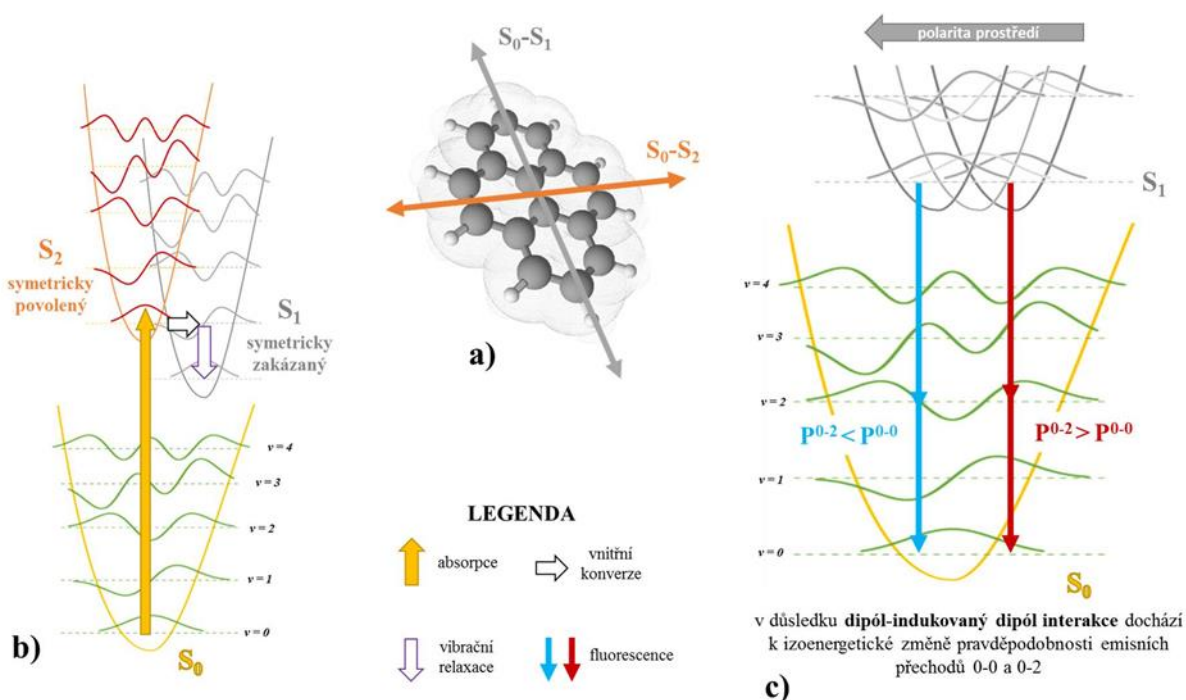
Další skupinou sond jsou fyzikálně vázané fluorescenční sondy. Většinou se jedná o malé organické molekuly, které jsou do zkoumaného systému přidány a jsou v něm inkorporovány na základě rozpustnosti nebo elektrostatické interakce. Tyto molekuly mají pak svoje specifické fotofyzikální chování, které bývá silně závislé na vlastnostech systému (polarita, pH, iontová síla, viskozita, tlak, teplota nebo přítomnost zhaščeče). Různé asociativně vázané fluorescenční sondy pracují na různém principu, nejčastěji se v závislosti na změnách okolního prostředí mění intenzita nebo doba života fluorescence, poloha maxima emisního pásu nebo kvantový výtěžek. Díky monitorování změn v jejich chování lze pak zjistit informace o zkoumaném systému.

Poslední skupinou sond jsou tzv. fluorescenční značky. Jsou to molekuly fluoroforů kovalentně vázané na danou zkoumanou látku. Mohou fungovat na stejném principu jako některé asociativně vázané sondy nebo slouží také ke značení molekuly, které dovoluje její následné zobrazování a sledování např. difúzních vlastností nebo lokace dané molekuly v buňce.

2.3.1.1 Pyren

Pyren je jednou z nejpoužívanějších fyzikálně vázaných fluorescenčních sond. Jde o polyaromatický uhlovodík s vysokou symetrií, díky níž vykazuje unikátní reakci na polaritu svého okolí. U některých polyaromátů je právě s vysokou symetrií spojen fakt, že absorpční přechod $S_0 \rightarrow S_1$ je zakázaný z hlediska symetrie. Jednotlivé vibrační přechody v tomto pásu jsou pak silně závislé na polaritě okolí molekuly. Tento jev se nazývá **Hamův efekt** [25]. U pyrenu dochází vlivem překryvu zakázaného prvního a povoleného druhého excitovaného stavu k dipól-indukovaný dipól interakci mezi pyrenem a prostředím, která způsobuje, že vibrační přechod 0-0 je silně závislý na polaritě rozpouštědla. Polární prostředí totiž zvyšuje pravděpodobnost zářivého přechodu 0-0, to znamená, že intenzita fluorescence tohoto

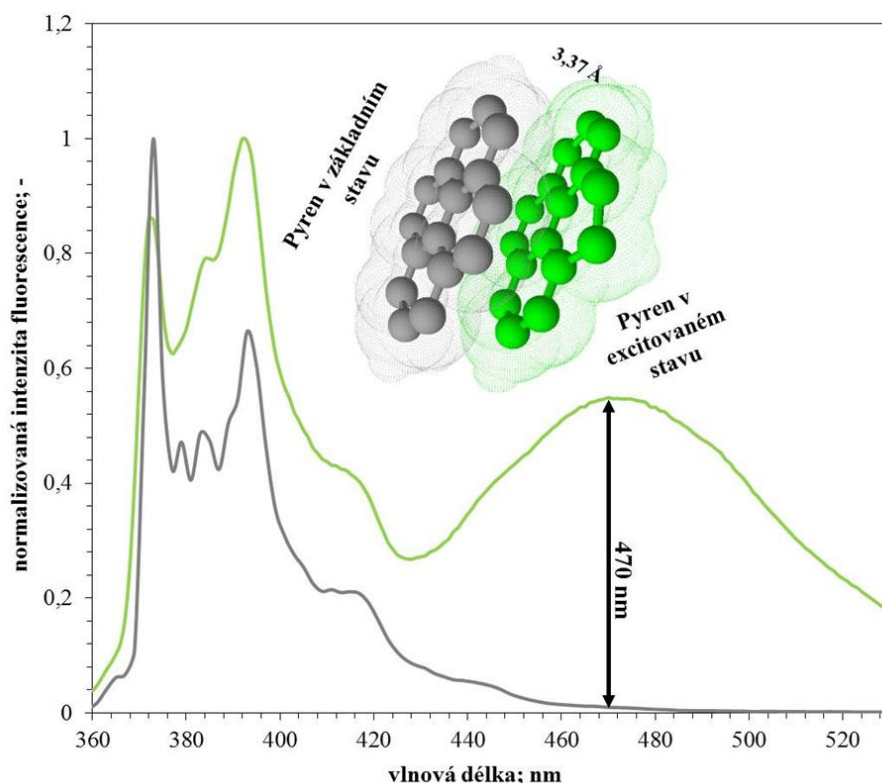
přechodu roste s polaritou rozpouštědla (**obr. 13**). Vibrační maximum (I_1) odpovídající tomuto přechodu je v emisním spektru pyrenu lokalizováno při vlnové délce 373 nm. Referenčním pásem je pak přechod 0-2, který je charakterizován maximem intenzity (I_3) při 383 nm. Výhodou pyrenu pak je, že i v koloidních roztocích má dobře rozlišenou vibrační strukturu a poloha vibračních pásů v emisním spektru se v závislosti na vlastnostech vzorku nemění.



Obr 13: Hamův efekt a) struktura pyrenu se znázorněnými jednotlivými přechody v molekule, b) překryv symetricky zakázaného S_0-S_1 a povoleného S_0-S_2 absorpčního pásu, c) změna pravděpodobnosti emisních přechodů v závislosti na polaritě prostředí

Zároveň je pyren schopen tvořit tzv. excitovaný dimer neboli excimer. Je to komplex tvořený jednou excitovanou molekulou pyrenu a druhou molekulou v základním stavu. Excitací pyrenu totiž dojde ke změně jeho struktury a díky vzniku indukovaného dipólu je tak v tomto stavu schopná interagovat s jinou neexcitovanou molekulou pyrenu.

Touto interakcí a tvorbou „sandwichového“ komplexu však excitovaná molekula ztrácí část svojí energie a maximum fluorescence excimeru je pak posunuto k vyšším vlnovým délkám (470 nm). Díky tomu, že tvorba excimeru je difúzně řízený proces, je jeho intenzita funkcí koncentrace pyrenu, mikroviskozity okolí a v koloidních roztocích micel, také rozdělení jednotlivých molekul pyrenu v hydrofobních jádrech.



Obr 14: Tvorba excitovaného dimeru, šedou čarou znázorněno emisní spektrum pyrenu bez pásu excimeru, zelenou čarou s pásem excimeru. Nahoře zobrazena schematická struktura excimeru.

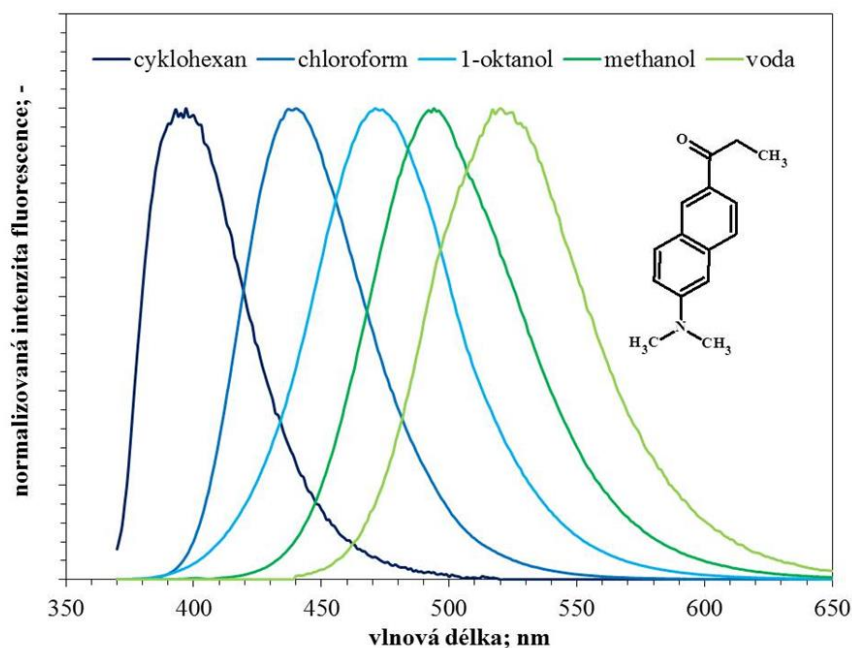
2.3.1.2 1,3-bis(pyren-1-yl)propan

Tato sonda zkráceně označovaná jako P3P je tvořena dvěma pyrenovými molekulami spojenými propanovým můstkem. Tento můstek mírně ovlivňuje fotofyzikální charakteristiky, sonda má excitační maximum při 345 nm a vibrační emisní maxima při 376 nm (I_1), 396 nm (I_3) a 417 nm (I_5). Důležitým důsledkem tohoto spojení je však fakt, že P3P „automaticky“ tvoří excimer, jehož emisní charakteristiky zůstávají nezměněny. Tento princip však mění P3P na především mikroviskozitní sondu. Rigidní tuhé prostředí je totiž schopno vzniku excimeru zabránit a fluorescence při 470 nm v takovém případě vymizí.

2.3.1.3 Prodan

Prodan patří do skupiny fyzikálně vázaných sond reagujících na polaritu. Tato sonda je nespecificky rozpustná, což znamená, že její lokaci v micelárním systému nevymezuje její rozpustnost. Na polaritu systému však reaguje díky tzv. **relaxaci rozpouštědla** jinak nazývanému fotoindukovanému přenosu náboje. Tento jev je založen na faktu, že energie emitujícího stavu se většinou liší od **Franc-Condonova** principu [26,27]. Systém totiž neztrácí absorbovanou energii jenom vibrační relaxací ale také dipól-indukovaný dipól interakcí fluoroforu s rozpouštědlem. Ve chvíli, kdy dojde k excitaci molekuly, se totiž vytváří indukovaný dipól, který je schopen orientovat kolem sebe molekuly rozpouštědla. Tato orientace molekul, a tím pádem ztráta energie způsobená interakcí bude o to výraznější, čím bude dipólový moment molekul rozpouštědla větší, a tedy čím bude vyšší polarita rozpouštědla. S její rostoucí hodnotou bude tedy docházet k posunu emisního maxima

k vyšším vlnovým délkám. Prodan má jako jedna z mála sond velké rozmezí tohoto batochromního posunu. Jeho maximum se posunuje od 530 nm ve vodném prostředí až po 405 nm v uhlovodících.



Obr. 15: Posun emisního maxima prodanu s měnící se polaritou, vpravo v oblasti grafu znázorněna struktura prodanu.

2.3.1.4 Nilská červeň

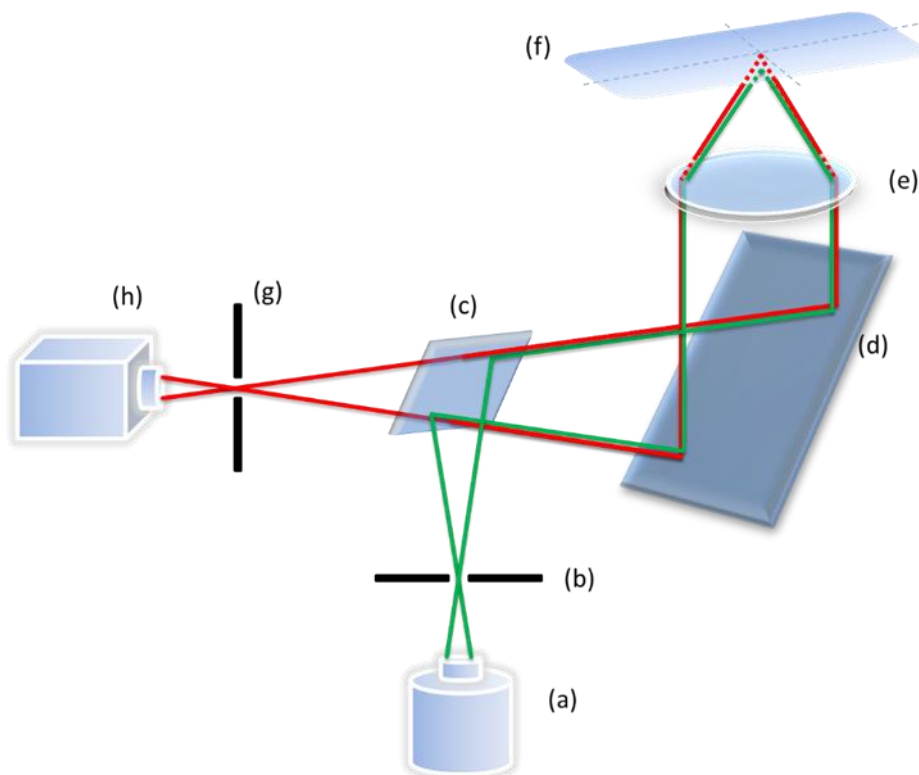
Nilská červeň je asociativně vázaná fluorescenční sonda, která reaguje na polaritu dvojím způsobem. Celkově její fluorescence silně zhasená vodou, to znamená, že tato sonda poskytuje nejsilnější signál z čistě hydrofobního prostředí a je tedy dobře použitelná k detekci uzavřených hydrofobních domén. Na polaritu však díky relaxaci rozpouštědla reaguje také posunem polohy maxima emise. V koloidních systémech je rozmezí, ve kterém se pohybuje její maximum od 610 nm ve vodném prostředí, kde její intenzita velmi nízká do 650 nm v hydrofobním prostředí, kde její intenzita také prudce roste. Na základě změn v obou parametrech je možno určit CMC tenzidu.

2.3.1.5 Rhodamin

Pod pojmem rhodamin se skrývá celá skupina molekul, založených na heterocyklické sloučenině fluoronu. Příkladem konkrétních barviv jsou pak rhodamin B, rhodamin 6G nebo rhodamin 110, které jsou také nejčastěji využívány. Jejich excitační maximum se pohybuje okolo 550 nm a maximum emise lze sledovat okolo 580 nm. Rhodaminy lze použít oběma výše uvedenými způsoby, a to jako asociativně či kovalentně vázané. Jako fluorescenční značka se rhodamin používá většinou při monitorování vstupu značených látek do buněk, kde má výhodu, že jeho charakteristiky jsou na rozdíl od fluoresceinu nezávislé na pH prostředí a je také stabilnější vůči fotovybělování.

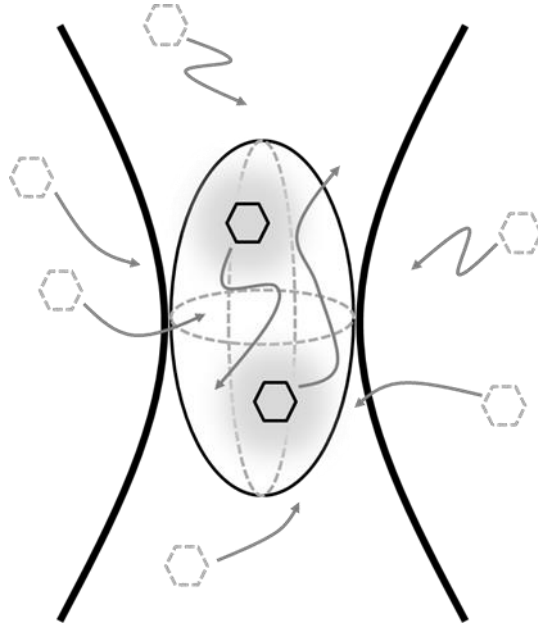
2.3.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je speciálním případem fluorescenční spektroskopie, která na rozdíl od konvenčních technik nesleduje rozdělení energií emise podle vlnových délek, dob života excitovaného stavu případně směru polarizace, ale sleduje proměnnou intenzitu fluorescence v čase a to z určitého diskrétního objemu vzorku, který obsahuje jednotkové množství molekul fluoroforu. Změny intenzity, fluktuace, mohou být způsobeny translační difúzí, změnou rychlost toku, chemickou reakcí, rotací molekuly, změnou molekulové hmotnosti, agregačním procesem nebo změnou geometrie molekuly (např. při procesu denaturace).



Obr. 16: Schéma konfokálního mikroskopu: a) pulzní laserový zdroj, b) clona, c) dichroické zrcadlo, d) zrcadlo optiky, e) objektiv, f) vzorek s naznačenou ohniskovou rovinou, g) pinhole, h) detektor; zeleně je značen excitační paprsek a červeně signál

Experimentální uspořádání je založeno na využití konfokálního mikroskopu (**obr. 16**). V tomto případě je využíván jako excitační zdroj vysoce fokusovaný laserový paprsek a v detekční části optické dráhy je umístěna konfokální štěrbina, která efektivně blokuje optické dráhy emisních paprsků pocházejících mimo ohniskovou rovinu, tzv. „**pinhole**“. Diskrétní objem v tomto experimentálním uspořádání nabývá hodnot desetin až jednotek femtolitrů (**obr. 17**). Další možností, kterou použitý experimentální systém umožňuje, je využití tzv. multifotonové excitace, kde není již zapotřebí konfokální štěrbiny a díky použité vlnové délce excitace je tato technika využitelná i v intracelulární prostředí.



Obr. 17: Detekční objem v ohnisku konfokálního mikroskopu s naznačeným translačním difúzním pohybem fluoroforů.

2.3.2.1 Autokorelační funkce

Vyhodnocením fluktuací intenzity fluorescence, odehrávajících se v malém objemu, může být statistická analýza. Jejím výsledkem je tzv. autokorelační funkce $G(\tau)$, která je definována jako:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (1)$$

kde $\langle \rangle$ značí průměrnou hodnotu v čase, $F(t)$ intenzitu fluorescence, T je celkový čas a δ okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int F(t) dt, \quad (2)$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle. \quad (3)$$

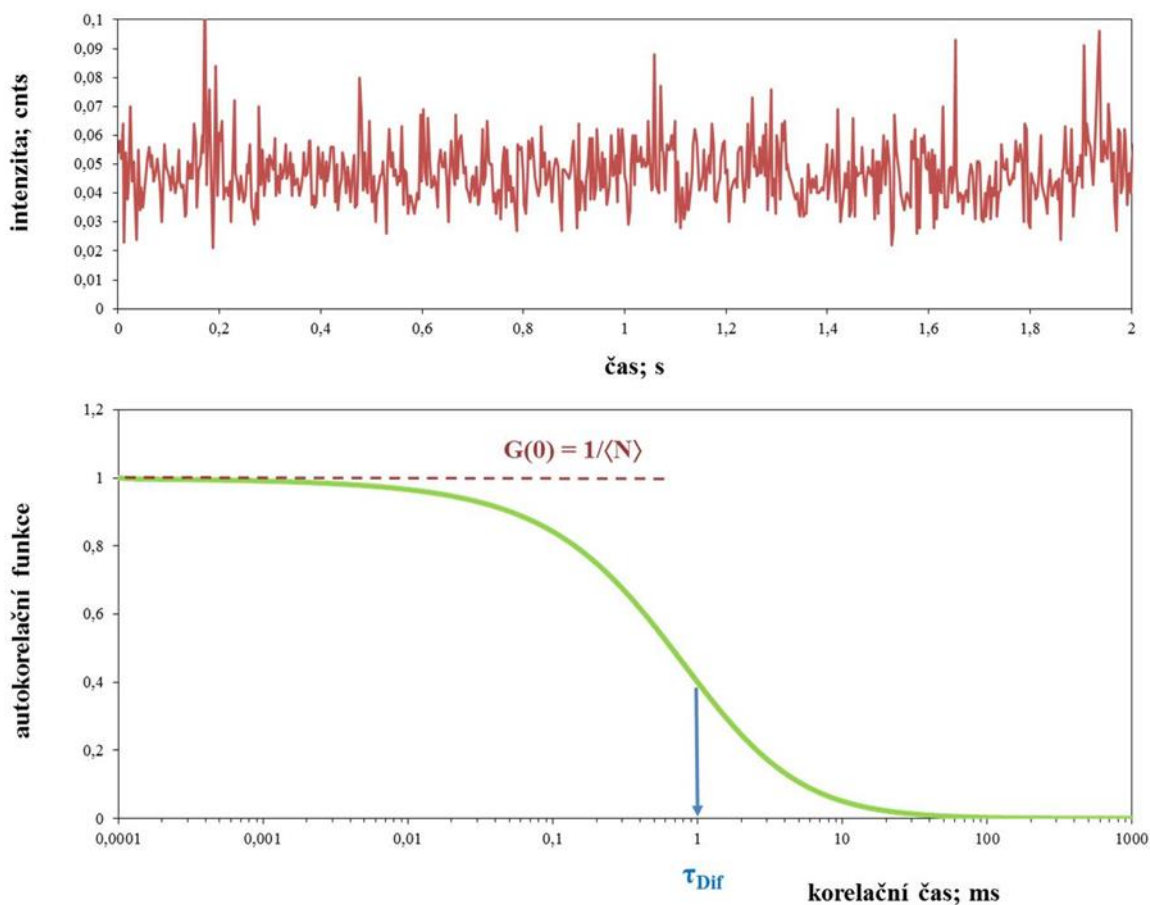
Jak vyplývá z definice autokorelační funkce, ta ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě dt . Autokorelační funkce má své maximum pro nízké hodnoty t , pro delší časy t funkce klesá k nule. Pro částice, které se pohybují volnou difúzí ve třech dimenzích, lze odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(t) = \frac{1}{V_{\text{ef}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{Dif}}}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{t}{\tau_{\text{Dif}}}}}, \quad (4)$$

kde V_{ef} je efektivní detekční objem

$$V_{\text{ef}} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0, \quad (5)$$

τ_{Dif} je tzv. difúzní čas, parametr udávající, jak dlouho je částice v detekčním objemu, C je lokální koncentrace částic, z_0 udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu a w_0 rozměr v ohniskové rovině.



Obr. 18: Časový záznam fluktuace fluorescence difundující molekuly a příslušná autokorelační funkce s naznačenými parametry.

Pokud získaná data proložíme teoretickou závislostí, můžeme získat důležité informace o systému. Prvním z nich je difúzní čas, který souvisí s difúzním koeficientem $\tau_{\text{Dif}} = w_0^2/4D$ a průměrný počet částic N v detekčním objemu

$$N = \frac{1}{G(0)} = V_{\text{ef}} \cdot \langle C \rangle. \quad (6)$$

Pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme pak přímo určit difúzní koeficient a koncentraci dané látky [28].

2.4 Reologie

V systémech obsahujících polyelektrolyt a opačně nabitý tenzid se velmi často tvoří kondenzované fáze. Ty vznikají, pokud je omezena rozpustnost agregátů tvořených oběma komponentami. Tyto fáze mohou mít různou podobu od tekutých koncentrovaných fází, přes tuhé gelovité fáze až po sraženiny. Proto jasně vyvstává potřeba charakterizace jejich mechanických vlastností.

Vývoj chemického průmyslu na začátku 19. stol., následovaný příchodem velké škály vyráběných syntetických polymerů, vyústil ve vznik nové vědy. Reologii jako mezioborovou vědu založili v roce 1928 chemik Eugene Cook Bingham a stavební inženýr Markus Reiner. Reologie se zabývá studiem toku a deformace, konkrétně studiem základních vztahů mezi silou a deformací v materiálech [29]. Nejjednodušší a pravděpodobně první vztah mezi silou a deformací je Hookův zákon.

2.4.1 Hookův zákon

Hookův zákon je základní vztah pro mechaniku pevných látek a mnoho kovů a keramických materiálů je při nízkých hodnotách napětí tzv. „Hookovských“ nebo jinak řečeno ideálně elastických. Ideálně elastický materiál je tedy takový, u kterého nedochází k disipaci vložené mechanické energie, tzn. veškerá vložená energie během namáhání materiálu je po jeho uvolnění zpětně využita. Elastická látka se při působení napětí chová jako pružina, to znamená, že reaguje okamžitě a její deformace je dokonale vratná. Hookův zákon vyjadřující vztah mezi smykovým napětím a smykovou deformací má tvar

$$\tau = G \cdot \gamma, \quad (7)$$

kde τ je smykové neboli tečné napětí a γ smykový úhel. G je konstanta úměrnosti nazvaná modul pružnosti ve smyku, který je vlastností daného materiálu



Obr. 19: schématické znázornění modelu ideálně elastické pevné látky jako pružiny

2.4.2 Newtonův zákon

Plyny a také velká škála nízkomolekulárních kapalin jako je voda nebo oleje zase podléhají Newtonovu zákonu a nazývají se tedy „Newtonské“. Jedná se tedy o ideálně viskózní kapaliny. Jsou to materiály, u nichž dochází k disipaci veškeré vložené mechanické energie při jejich namáhání na teplo. Nedochází tedy k žádnému zpětnému využití vložené mechanické energie při odlehčení tohoto vzorku.



Obr. 20: schématické znázornění modelu ideálně viskózní kapaliny jako tlumiče

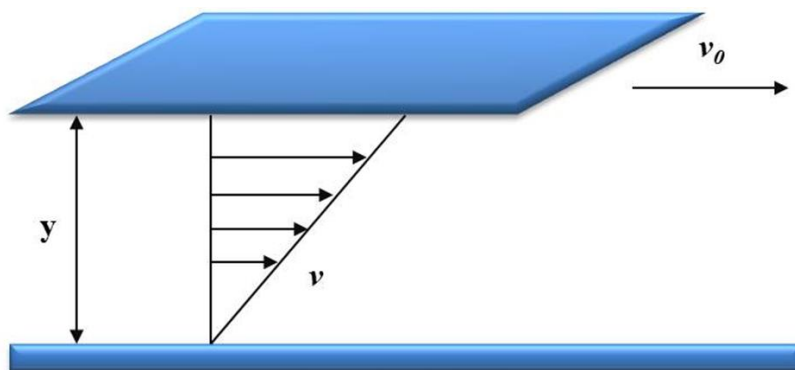
Model ideální viskózní tekutiny, který můžeme vidět na **obr. 20**, ukazuje, že viskózní tekutina reaguje na vložené napětí jako tlumič, to znamená, že se deformuje s časovým zpožděním a nevratně. Newtonův je definován jako

$$\tau_{xy} = \eta_0 \cdot \dot{\gamma}_{xy}, \quad (8)$$

kde τ_{xy} je smykové napětí, η_0 je newtonská neboli limitní viskozita a $\dot{\gamma}_{xy}$ je smyková rychlost nebo také rychlost smykové deformace. Při definování Newtonova zákona je nutno vycházet z představy kapaliny mezi dvěma deskami, mimochodem samotného Newtona inspiroval

k vytvoření teorie o existenci tření v kapalinách a přenosu toku mezi jejich různými vrstvami, pohled na tok vody v korytě řeky. Spodní desku považujeme za stacionární, horní deska nechť se pohybuje rychlostí v_0 vyvolanou smykovou silou F , která působí v rovině desky. Pohybující se deska má plochu A (obr. 21). Smykové napětí je pak definováno jako

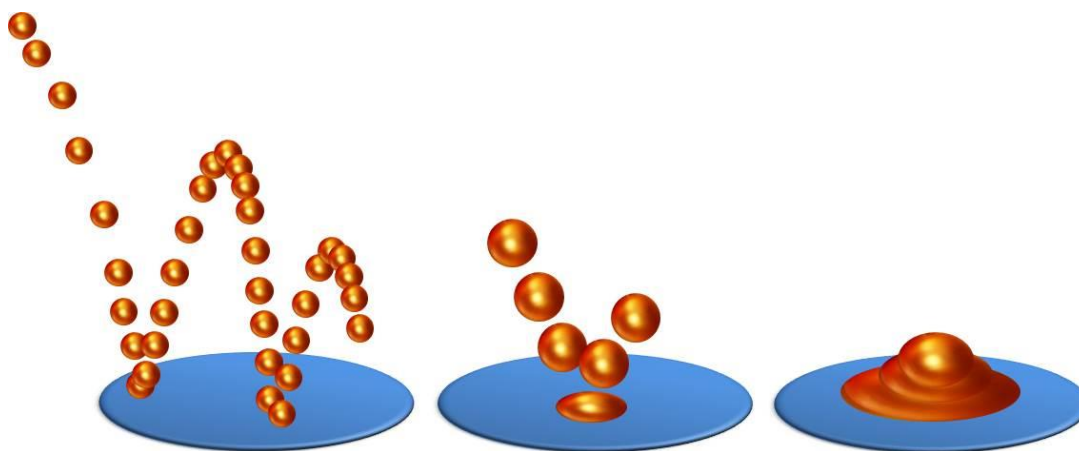
$$\tau = \frac{F}{A}. \quad (9)$$



Obr. 21: Model chování Newtonské kapaliny při smykovém namáhání

2.4.3 Viskoelasticitá

Avšak mnoho důležitých látek svým chováním leží právě mezi ideálně elastickou pevnou látkou a ideálně viskózní tekutinou. Jedná se zejména o polymery, ale také například o některé potraviny nebo krev. Pravděpodobně nejjednodušším příkladem jednoho z těchto přechodných materiálů je běžná hračka „inteligentní plastelína“. Pokud kulička z tohoto materiálu spadne z větší výšky, potom podléhá rychlé deformaci a odrazí se tak, jako by byla vyrobená z gumového materiálu, ale pokud ji necháte ležet na jednom místě několik hodin, potom materiál poteče jako kapalina. Při krátkodobé deformaci se tedy chová jako Hookovská pevná látka, kdežto dlouhodobá deformace způsobí její tok a chování je tak více podobné Newtonské kapalině. Takové chování se nazývá viskoelastické a lze je dobře sledovat právě díky relaxaci modulu $G(t)$ s časem.



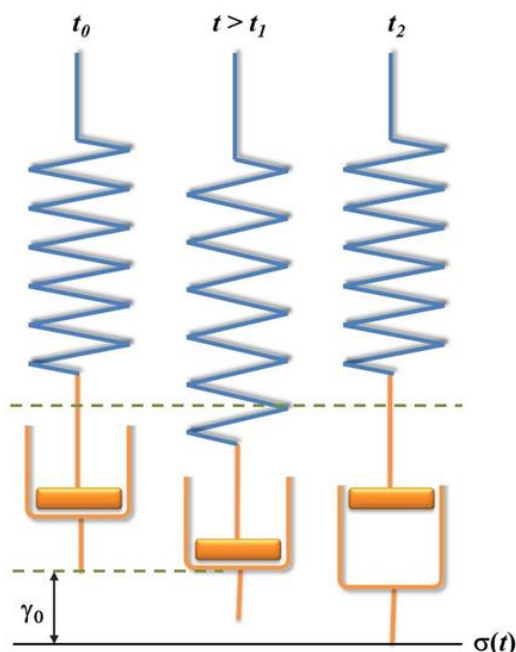
Obr. 22: Chování viskoelastické látky [29]

Viskoelastické materiály reagují na deformaci vždy se zpožděním. Pro stanovení viskoelastické odezvy materiálu používáme dva typy testů. Je to tzv. creepový test, kdy je udržováno napětí a měřena zvětšující se deformace. Poměr měřené deformace a aplikovaného napětí je creepová poddajnost.

Další možností je tzv. relaxační test, kdy je za konstantní teploty udržována konstantní deformace a měřeno je napětí k udržení této deformace. Poměr měřeného napětí a aplikované deformace je relaxační modul.

2.4.3.1 Maxwellův model

Relaxaci lineárního polymeru, tj. viskoelastického materiálu, lze popsat díky Maxwellově modelu. Tento model v podstatě kombinuje jednoduché modely vystihující krajní ideální modely a to tak, že je zařadí za sebe. Je totiž tvořen pružinou s modulem pružnosti E , která reprezentuje Hookovskou neboli elastickou složku a tlumičem, v němž je kapalina s danou hodnotou viskozity η , která naopak představuje Newtonskou neboli viskózní složku. V podstatě jde o tok komplikovaný elasticitou.



Obr. 23: Vývoj Maxwellova modelu v čase

Na **obr. 23** můžeme vidět schematicky znázorněný vývoj Maxwellova modelu v čase. Na začátku, kdy je model ještě nezatížen (t_0) jsou obě jeho komponenty nedeformovány. V čase t_1 kdy skokově aplikujeme napětí a celý model zatížíme, obě jeho složky budou reagovat odlišně. Změny na pružině se projeví okamžitě a ta se protáhne až do rovnovážného stavu, který odpovídá aplikovanému napětí. V tomto stavu pružina setrvá po dobu působení namáhání. Tlumič naopak reaguje se zpožděním a začne se pohybovat až ve chvíli, kdy pružina už je protažená. Po určité době dosáhne i tlumič rovnovážného stavu a oba prvky v tomto stavu vykazují stejnou deformaci úměrnou zatížení. Situace po uvolnění působícího napětí (t_2) bude opět odlišná z pohledu chování obou komponent. Pružina se ihned a zcela vrací do původního stavu, zatímco tlumič naopak zůstává zdeformován. Po skončení deformačního cyklu tak podle tohoto modelu zůstává lineární polymer částečně zdeformován.

Míra navrácení do jeho původního stavu závisí právě na elastické části Maxwellova modelu. Celkové smykové napětí je shodné s napětím v obou částech modelu

$$\sigma = \sigma_p = \sigma_t \quad (10)$$

a celková deformace se rovná součtu deformací jednotlivých komponent

$$\gamma = \gamma_p + \gamma_t. \quad (11)$$

Po dosazení do základního vztahu získáme rovnici

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\sigma_p}{G} + \frac{\sigma_t}{\eta}. \quad (12)$$

Pokud v této chvíli zavedeme veličinu λ , což je **relaxační čas** daného materiálu

$$\lambda = \frac{\eta}{G} \quad (13)$$

a dosadíme ji do předchozí rovnice, získáme diferenciální vztah vyjadřující deformaci v tomto modelu

$$\frac{d\gamma}{dt} G = \frac{d\tau}{dt} + \frac{\tau}{\lambda}. \quad (14)$$

Po relaxaci napětí viskoelastického materiálu jsou okrajové podmínky následující. V čase $t_0 \dots \sigma = 0$, v čase $t_1 \dots \sigma = \sigma_0$ a v čase t_1 až $t_2 \dots \sigma = \sigma(t)$. Po integraci předchozího vztahu a dosazení uvedených okrajových podmínek získáme rovnici Maxwellova modelu:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}}. \quad (15)$$

Průběh napětíové odezvy neboli relaxace napětí se tedy nachází mezi dvěma krajními případy, tj. relaxační křivka ideálně elastické pevné látky a relaxační křivka ideálně viskózní kapaliny. Relaxační čas v podstatě vyjadřuje poměr mezi těmito dvěma komponentami.

V čase $t = 0$ platí

$$\sigma(0) = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}} = \gamma_0 \cdot G \cdot e^0 = \gamma_0 \cdot G = \sigma_{\max}, \quad (16)$$

což znamená, že maximálního napětí je dosaženo právě v okamžiku aplikace deformace.

V čase $t = \infty$ platí

$$\sigma(\infty) = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}} = \gamma_0 \cdot G \cdot 0 = 0, \quad (17)$$

což znamená, že za nekonečně dlouhou dobu působení deformace systém dokonale zrelaxuje a hodnota napětí bude rovna nule.

V čase $t = \lambda$

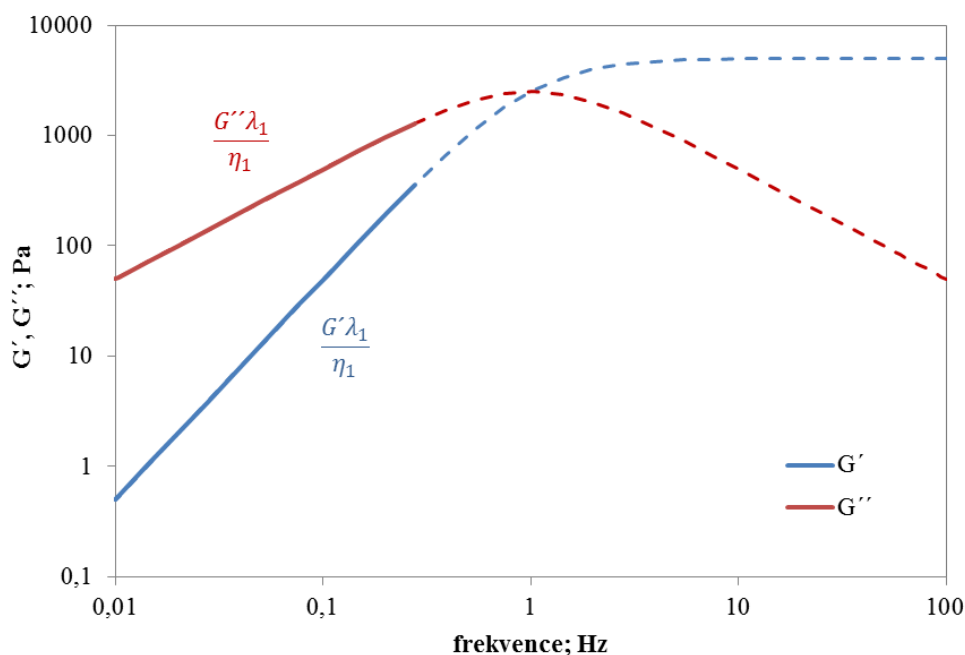
$$\sigma(\lambda) = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}} = \gamma_0 \cdot G \cdot e^{-1} = \gamma_0 \cdot G \cdot 0,368, \quad (18)$$

což znamená, že v čase, který je roven relaxačnímu času, materiál zrelaxuje na 36,8 % maximálního napětí.

Pro jednotlivé moduly (paměťový G' a ztrátový G'') při oscilačních měřeních s malou amplitudou platí

$$G'(\omega) = \frac{G \cdot \lambda^2 \cdot \omega}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2} = \frac{\eta \cdot \lambda \cdot \omega^2}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2}, \quad (19)$$

$$G''(\omega) = \frac{G \cdot \lambda \cdot \omega}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2} = \frac{\eta \cdot \omega}{1 + (\lambda \cdot \omega)^2}. \quad (20)$$



Obr. 24: Znárodnění závislosti ztrátového a paměťového modulu podle Maxwellova modelu a hodnoty jejich směrnic pro úseky zobrazené plnou čarou[30]

2.4.3.2 Generalizovaný Maxwellův model

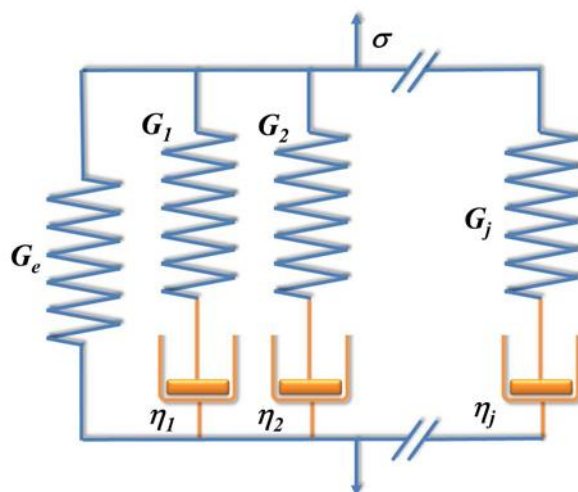
Generalizovaný Maxwellův model v podstatě sestává z jednotlivých jednoduchých Maxwellových prvků zařazených vedle sebe. Jeho schématické znázornění je uvedeno na **obr. 25**. Pro tento model platí vztah

$$G(t) = G_e + \sum_{i=1}^j G_i \cdot e^{-\frac{t}{\lambda_i}}, \quad (21)$$

kde j je počet jednoduchých Maxwellových prvků, G_i a λ_i jsou parametry příslušející i -tému prvku, přičemž G_i je relaxační funkce ve tvaru $G_i = f(\lambda_i)$. Pro jednotlivé moduly při oscilačních měřeních s malou amplitudou pak platí

$$G'(\omega) = \sum_{i=1}^j \frac{G_i \cdot \lambda_i^2 \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2} = \sum_{i=1}^j \frac{\eta_i \cdot \lambda_i \cdot \omega^2}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2}, \quad (22)$$

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^j \frac{G_i \cdot \lambda_i \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2} = \sum_{i=1}^j \frac{\eta_i \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2}. \quad (23)$$



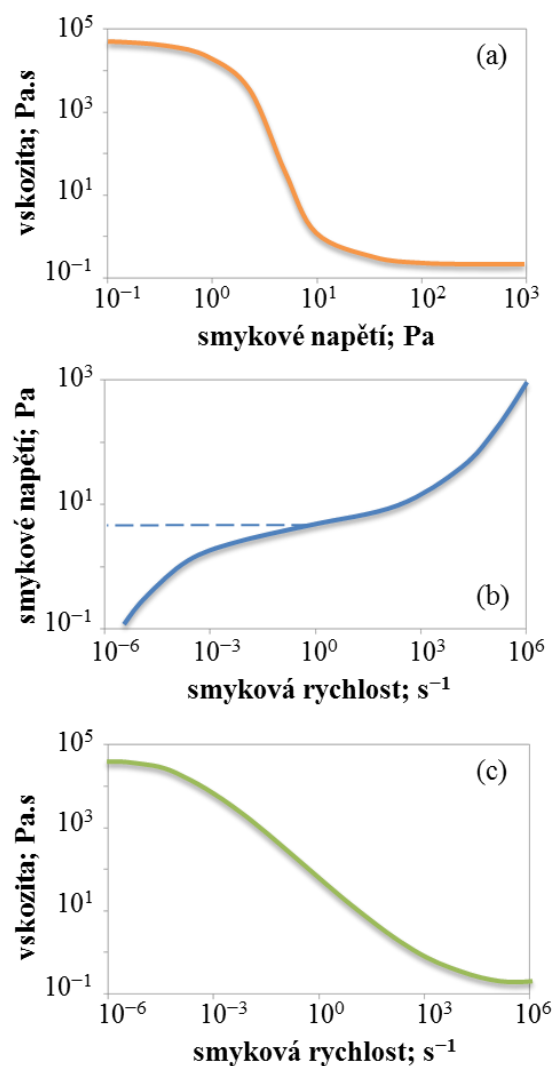
Obr. 25: Schématické znázornění generalizovaného Maxwellova modelu pro konečný počet prvků j .

2.4.4 Pseudoplasticita

Ve chvíli, kdy bylo díky viskozimetrům možno změřit vliv smykové rychlosti na viskozitu, byly objeveny také odchylky od Newtonova zákona a to v případě látek jako jsou například suspenze, emulze nebo roztoky polymerů. Ve většině případů bylo objeveno, že viskozita klesá s rostoucí smykovou rychlostí. Takové látky byly označeny jako **pseudoplastické**. Vyskytly se však i případy, kdy tomu bylo naopak, a viskozita s rostoucí smykovou rychlostí rostla. Takové chování bylo označeno jako **dilatance**.

Pro pseudoplastické materiály, je obecná křivka reprezentující změny ve viskozitě v závislosti na smykovém napětí zobrazena na **obr. 26**. Na tomto obrázku jsou také uvedeny odpovídající grafy závislosti smykového napětí na smykové rychlosti a viskozity na smykové rychlosti.

Křivky ukazují, že při limitních velmi nízkých hodnotách smykové rychlosti (nebo smykového napětí) je viskozita konstantní a také v oblasti limitních tentokrát velmi vysokých hodnot smykové rychlosti (nebo smykového napětí) je viskozita opět konstantní, ale tentokrát vykazuje nižší hodnoty než v prvním případě. Tyto dva extrémy jsou často označovány jako spodní a horní Newtonské regiony, nebo jako první a druhý Newtonský region. Vyšší konstantní hodnota viskozity je však nejčastěji označována jako „zero-rate viscosity“ nebo „zero-shear viscosity“, odkazující se tak na fakt, že se jedná o viskozitu při velmi nízkých hodnotách smykové rychlosti nebo smykového napětí, které se asymptoticky blíží nule. Její opak, tj. nižší hodnota viskozity je analogicky označována jako „infinite-rate viscosity“ nebo „infinite-shear viscosity“ [31].



Obr. 26: Typické chování nenewtonských kapalin vykazující relaci mezi různými parametry. (a) Viskozita versus smykové napětí. Viskozita se se změnami ve smykovém napětí mění rychle v oblasti středních hodnot smykového napětí. (b) smykové napětí versus smyková rychlost. Ve středních hodnotách smykové rychlosti se napětí mění velmi pomalu s rostoucí smykovou rychlostí. Přerušovaná čára naznačuje ideální plastické chování. (c) Viskozita versus smyková rychlost. Široký rozsah smykových rychlostí potřebný ke změnám na celé tokové křivce [31]

2.4.4.1 Cross model

Výraz, který predikuje tvar obecné tokové křivky, potřebuje mít nejméně čtyři parametry. Jedním z takových je tzv. Crossův model [32], jehož rovnice je dána jako

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{[1 + (K\dot{\gamma})^m]}, \quad (24)$$

nebo její ekvivalent

$$\frac{\eta_0 - \eta}{\eta - \eta_{\infty}} = (K\dot{\gamma})^m, \quad (25)$$

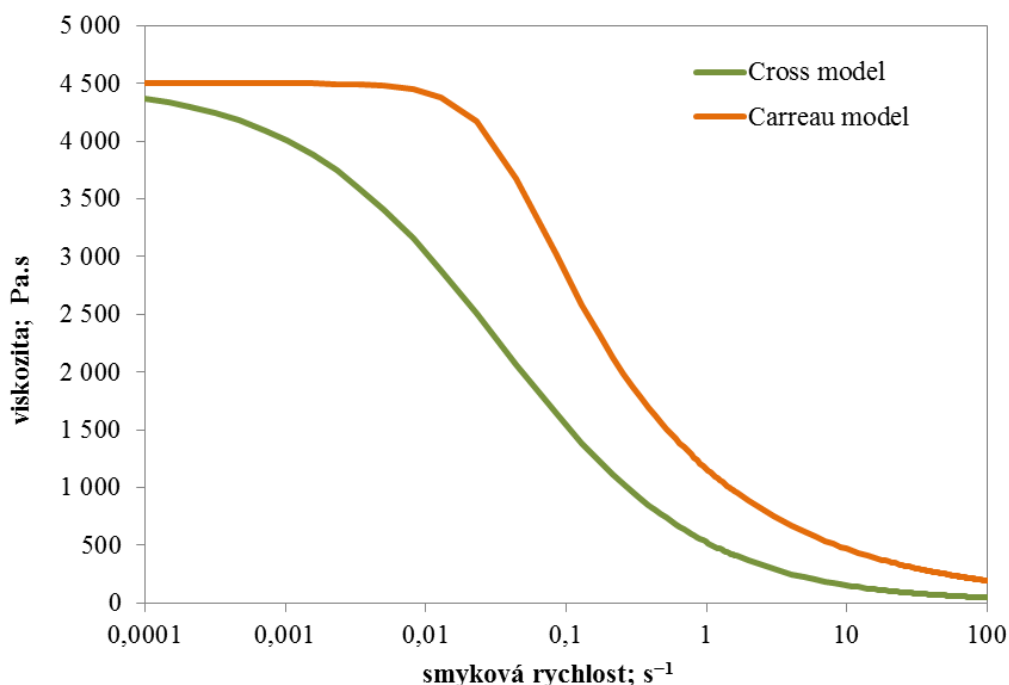
kde η_0 a η_∞ označuje asymptotickou hodnotu viskozity při velmi nízkých smykových rychlostech a při velmi vysokých smykových rychlostech. K je konstanta, která má rozměr času a m je bezrozměrná konstanta.

2.4.4.2 Carreau model

Je to další čtyřparametrický model sloužící k popisu tokových křivek. Jeho vzorec je následující [33]:

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = [1 + (K\gamma)^2]^{\frac{m-1}{2}}. \quad (26)$$

Značení parametrů je analogické s Crossovým modelem. Na **obr. 27** jsou zobrazeny závislosti obou modelů, pro jejichž výpočet byly použity shodné hodnoty všech čtyř parametrů.



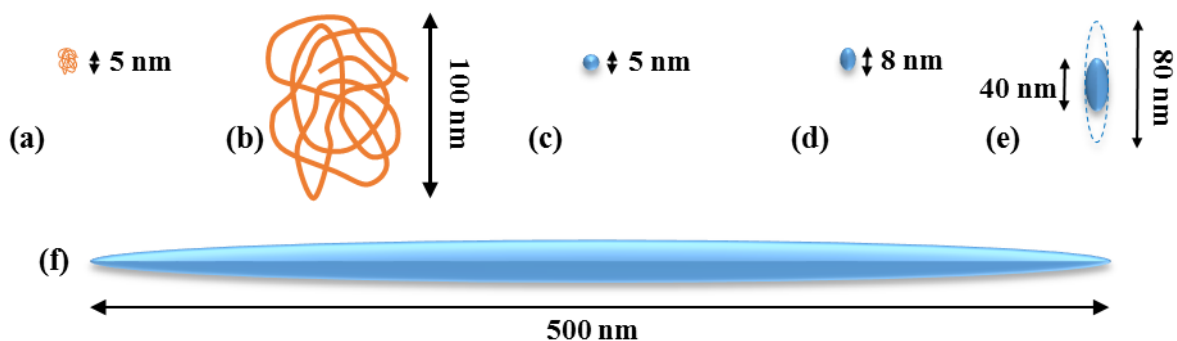
Obr. 27: Tvar Crossova a Carreau modelu se shodnými hodnotami parametrů.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Cílené nosiče léčiv

Vývoj cíleného nosiče léčiva je poměrně složitou záležitostí z důvodu kombinace velkého množství požadavků na tento systém. Ten musí být v první řadě biokompatibilní a biodegradabilní, pro účely cílené distribuce musí mít vymezenou velikost a popřípadě také schopnost interagovat specificky v místě účinku. Dalšími důležitými vlastnostmi jsou také netoxicity produktů jeho degradace a pokud možno co nejmenší sklon k jejich depozici v životně důležitých orgánech, která by je mohla poškozovat [34,35].

Aby byl splněn jeden z 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.** [36] 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 doručení aktivní látky do místa účinku na jedné straně a odbouráním nosiče metabolickými cestami přes játra nebo ledviny viz **obr. 28**.



Obr. 28: Relativní velikosti dvou různých polymerů používaných v cílené distribuci léčiv s různou molekulovou hmotností a různých pórů v organismu. (a) řetězec polyvinyl alkoholu (PVA), 13,5 kDa, (b) PVA, 580 kDa, (c) velikost póru v glomerulu ledvin (d) velké interendotheliální spojení ve zdravé tkáni (e) typický rozsah průměru pórů ve tkáni tumoru (f) velké interendotheliální spojení v nádorové tkáni [36].

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 [37].

Zvláště důležitou roli pak hraje specifický receptor pro hyaluronan s názvem CD 44 [38-40]. 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 [41-45].

Specifickou vazbou hyaluronanu na receptor CD 44 se zabývali **Qhattal S. a spol.** [46]. 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 rostoucí molekulovou hmotností. Zároveň je účinnost konjugátů vyšší, než samotných liposomů bez hyaluronanu. Uvnitř buňky se pak konjugáty primárně hromadili v endozomech a lysozomech.

3.1.1 Nosiče na bázi hyaluronanu

3.1.1.1 Kovalentně vázané konjugáty hyaluronanu a aktivní látky

Fakt, že hyaluronan lze použít zároveň jako pasivně i aktivně cílící prvek vedl k vývoji konjugátů Hya-cytotoxin, využívající hyaluronan jako jednotku rozpoznávající tumor [47].

Cai S. a spol. [48] zkoumali konjugáty hyaluronan-cisplatina jako intralymfatická chemoterapeutika a zjistili, že mají vyšší účinnost než volné léčivo a jsou také organismem lépe snášeny. **Li S. a spol.** [49] se také zabývali konjugáty hyaluronan-cisplatina. Tento konjugát připravili navázaním cisplatiny na hyaluronan přes jeho karboxylové skupiny za vysoké teploty. Takto připravené částice měly velikost 580 nm a testy na myších ukázaly, že je buňky s receptorem CD44 mnohem účinněji zachycují. Takto byly vylepšeny vlastnosti léčiva určeného k intraperitoneálnímu podání cíleného na buňky rakoviny vaječníků, jejíž ložiska jsou v podobě uzlinek roztroušena na peritoneálním povrchu.

Kafedjiiski K. a spol. [50] syntetizovali a charakterizovali konjugát hyaluronanu a etylesteru cysteinu (Hya-Cys) a vytvořili tak základ pro nové nosičové systémy s lepšími mukoadhezivními vlastnostmi a nižší rychlostí biodegradace.

Poněkud komplexněji se problémem zabývali **Esposito S. a spol.** [51], kteří popisují syntézu biodegradabilních mikročástic za použití různých typů hyaluronanu (nativní hyaluronan, esterifikovaný derivát hyaluronanu Hyaff 11p50 kde je 50% karboxylových skupin esterifikováno benzylalkoholem, a síťovaný derivát hyaluronanu). Provedli hodnocení vlivu polymeru a procesu výroby na charakteristiky vznikajících mikročástic (morfologie, solubilizační kapacita) a na profil uvolňování léčiva.

Jiang G. a spol. [52] syntetizovali konjugát polyetyleniminu (PEI) a hyaluronanu s obsahem PEI 24,2 % mol. Komplex tohoto konjugátu a siRNA vykazoval lepší terapeutické vlastnosti než komplex bez obsahu hyaluronanu. Testy biodistribuce siRNA/PEI-Hya komplexu ukázaly, že se hromadí hlavně v orgánech s velkým obsahem CD44 receptorů, jako jsou játra, ledviny a tumor.

Lee H. a spol. [53] syntetizovali chemické konjugáty paclitaxelu a hyaluronanu spojené esterovou vazbou. Tyto konjugáty samovolně agregují ve vodných roztocích za tvorby micelárních agregátů s velikostí v řádu nanometrů. Micely konjugátů vykazují výraznější cytotoxický efekt pro nádory exprimující CD44, než pro buňky, které tyto receptory nemají. Pro aktivní látku paclitaxel (**Luo Y. a spol.** [54]) bylo vyvinuto také „proléčivo“ cílené na buňky za pomoci hyaluronanu. Biokonjugáty Hya-paclitaxel byly syntetizovány navázaním 2'-OH taxolu přes ester sukcinátu na Hya modifikovanou dihydrazidem adipové kyseliny (Hya-ADH).

3.1.1.2 Nosiče na bázi agregátů obsahujících hyaluronan

Yim H. a spol. [55] 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 cytotoxicity, 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 uplatnitelný při léčbě nádorů hyperexprimujících CD44 receptor pro hyaluronan.

Kyselinu retinovou využili také **Yao J. a spol.** [56], 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. [57] 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.** [58] 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.

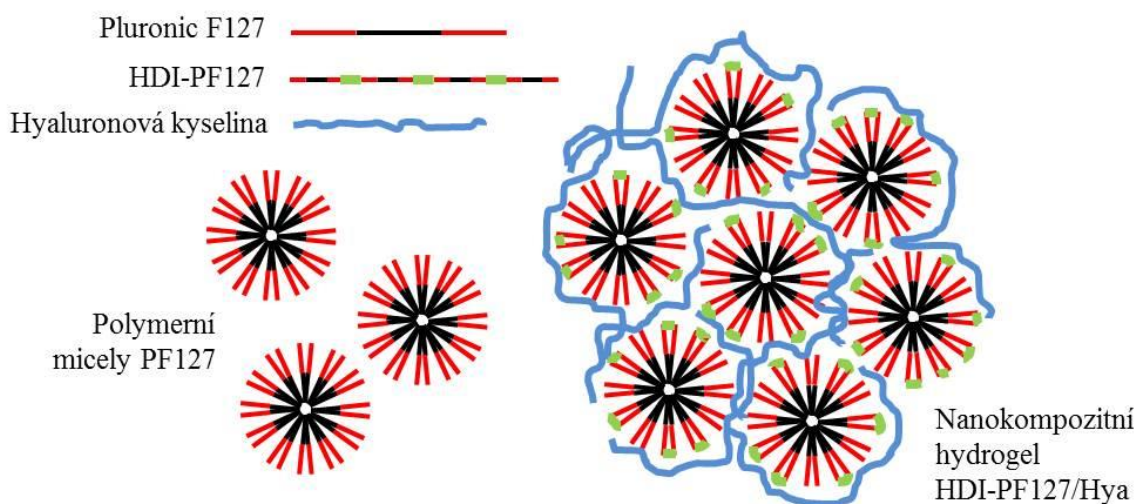
Datir R. S. a spol. [59] se zabývali přípravou, charakterizací a biologickým hodnocením konjugátů multilamelárních karbonových nanotrubiček s hyaluronanem nesoucích doxorubicin. Molekula aktivní látky byla na tyto konjugáty vázána π - π vrstvením. Konjugát byl poté naznačen fluorescenčními barvivy s 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 pětikrát větší inhibiční efekt na tumor plic než pro volný doxorubicin.

Dakdouki M. a spol. [60] se zabývali hyaluronanem 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 hyaluronanem.

3.1.1.3 Nosiče na hydrogelové bázi

Jak ukazuje přehledový článek **Vermonden T. a spol.** [61] jako nosiče lze s úspěchem využít také hydrogely. V tomto smyslu se **Xin W. a spol.** [62] 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 rakoviných buňkách rezistentních vůči aktivní látce, které zasahují plic 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. [63] 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 (**obr. 29**) a byl tak vytvořen termoresponzivní 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.



Obr. 29: Schématická struktura nosičových systémů připravených Chenem a spol. [63]

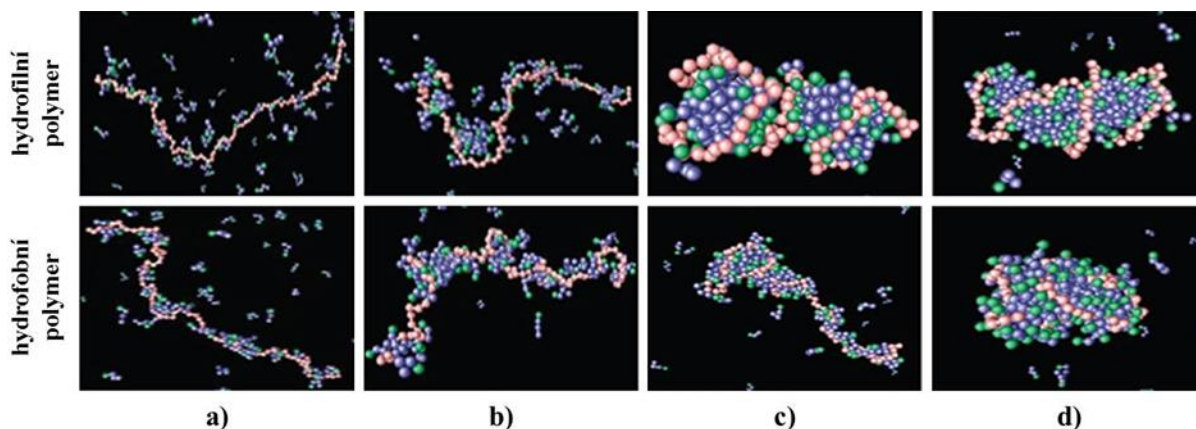
Minaberry Y. a spol. [64] vytvářeli nanoporézní hydrogely kyseliny hyaluronové za pomoci lyofilizace. Zkoumali jejich vlastnosti ve smyslu jejich rozpustnosti a agregace ve vodném prostředí. Vytvořili hydrogelové matrice s gentamicinem disponující prodlouženým uvolňováním aktivní látky.

3.2 Interakce polyelektrolyt - tenzid

Jak ukazují výše uvedené práce, interakce hyaluronanu a amfifilních látek je jednou z potenciálních metod, jak připravovat cílené nosiče léčiv. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné zkoumat hlouběji vlastnosti těchto konjugátů a také faktory, jimiž mohou být tyto vlastnosti ovlivněny. Lze tak získat podklady vedoucí k efektivnějšímu bilancování vlastností nosiče.

Nizri G. a spol. [65] studovali tvorbu nanočástic díky interakci aniontového polyelektrolytu (polyakrylátu sodného NaPA) s řadou opačně nabitých tenzidů s různou délkou řetězce (alkyltrimethylamonium bromidy C_n TAB). Vázání a tvorba nanočástic byla studována pomocí dynamického rozptylu světla, měření zeta potenciálu a NMR. Vnitřní struktura nanočástic byla sledována přímým zobrazováním cryo-TEM, což ukazovalo agregáty hexagonálního tvaru s velikostí v řádu nanometrů. Pro interakci C_n TAB-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.

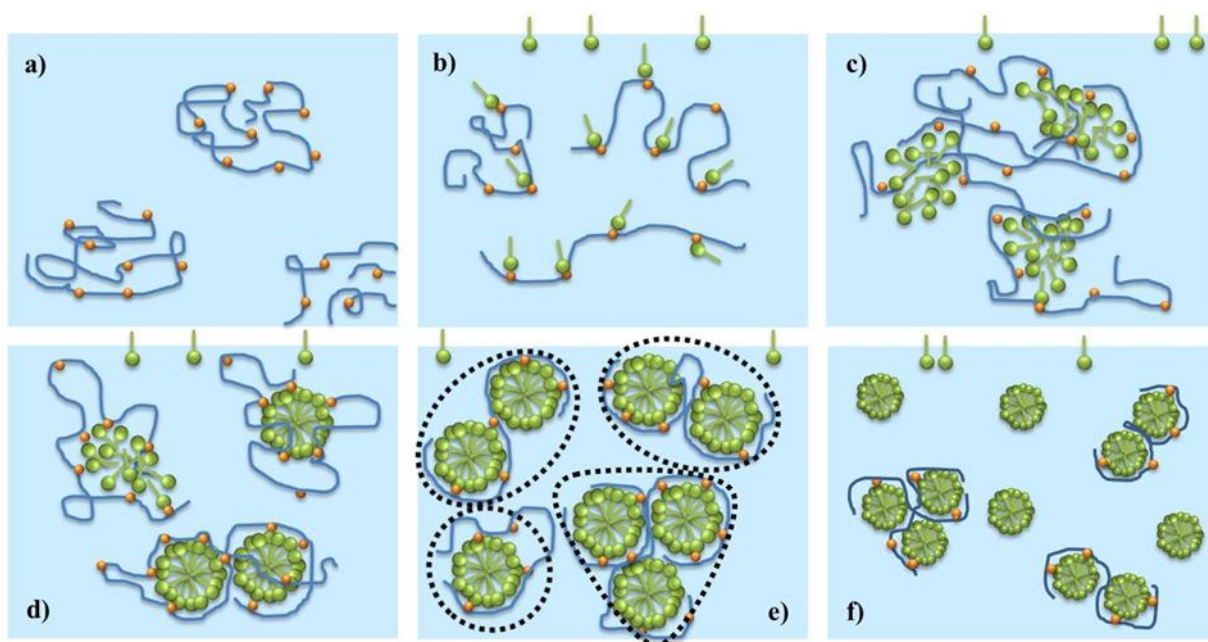
Liu Z. a spol. [66] zkoumali efekt povahy elektrolytu (hydrofilní x hydrofobní) na interakci s opačně nabitým tenzidem. Dynamiku těchto interakcí simulovali za pomoci molekulárního modelování. Bylo zjištěno, že agregace tenzidů na hydrofilním polymeru je značně odlišná od agregace na polymeru hydrofobním. V prvním případě se komplexy tenzidu s polyelektrolytem vyvíjí 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.



Obr. 30: Průběh procesu adsorpce tenzidu na hydrofilní a hydrofobní polyelektrolyt. a) Tenzid se adsorbuje na řetězec polyelektrolytu a tvoří strukturu kartáčku. b) Struktura kartáčku se dalším postupným vázáním tenzidu mění na strukturu perlového náhrdelníku. Tenzidy se podél kostry začínají shlukovat do agregátů. c) Velikost agregátů na kostře polyelektrolytu postupně roste. d) V tomto bodě se chování hydrofilního a hydrofobního polymeru liší. Řetězec hydrofilního polyelektrolytu s tenzidy tvoří stabilní tyčinkovitou micelu, přičemž řetězec se obaluje kolem povrchu micely. Řetězec hydrofobního polyelektrolytu a tenzidy formují sférickou micelu, ve které je hydrofobní polyelektrolyt inkorporován. [66]

Hydrofobní povaha tenzidových řetězců indukuje paralelní uspořádání mezi tenzidy a kostrou polyelektrolytu. Pokud je poměr náboje tenzidu ku polyelektrolytu nízký, polyelektrolyt vykazuje v roztoku expandovanou strukturu. S nárůstem tohoto poměru dochází buď ke kontinuálnímu, nebo náhlému kolapsu, což záleží právě na povaze polyelektrolytu. Při vyšší hustotě náboje na hydrofilním polyelektrolytu se zde vyskytuje synergistický efekt elektrostatických interakcí mezi tenzidem a polyelektrolytem a hydrofobních interakcí mezi jednotlivými řetězci adsorbovaných tenzidů. V případě hydrofobních polyelektrolytů se tento efekt neobjevuje.

Dongcui L. a spol. [67] 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 isothermální 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.



Obr. 31: Schématický model sumarizující mechanismus vázání tenzidu na polyelektrolyt. a) Bez přidavku tenzidu je polyelektrolyt rozpustný ve vodě a zabírá danou hydrodynamickou doménu. Oranžově jsou označena vazná místa s kladným nábojem. b) S malým přidavkem SDS se projevuje silné asociativní vázání, které nakonec vede k fázové separaci ve stavu, kdy koncentrace tenzidu dosahuje nábojové ekvivalence. c) V precipitovaném stavu se pak v roztoku objevují velké klastry tvořené agregáty polyelektrolyt-tenzid. d) Metastabilní stav systému je charakterizován různými druhy agregátů, změny v něm jsou citlivé na vnější podmínky. e) Další následné přidavky SDS indikují vázání micel na polyelektrolyt a při dostatečně velkém náboji působí elektrostatické repulze proti přitažlivým silám v rámci řetězců. Při hraniční koncentraci řetězců tedy dochází ke znovurozpuštění precipitátu. f) Po redisoluci vznikají zhruba kulovité komplexy polymer-tenzid, tyto koloidní částice jsou stabilní. Další přidavek tenzidu je spotřebován na tvorbu volných micel. [67]

Práce **Wang W. a spol.** [68] se zaměřuje na systém kationicky modifikované hydroxyetyl celulózy (catHEC) a dodecylsulfátu sodného (SDS) ve formě hydrogelu vzniklého interakcí těchto látek. SDS bylo použito k solubilizaci modelové hydrofobní látky a poté byla tato látka díky elektrostatickým interakcím inkorporována do dvou typů hydrogelů v závislosti na hustotě náboje polyelektrolytu. 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.

Kizilay E. a spol. [69] zkoumali teplotou indukované fázové přechody (koacervace) v systému polykation a směsné aniontové/neiontové micely. Použili různou koncentraci polyelektrolytu a také různé molekulové hmotnosti, jednalo se o polydiallyldimetylamonium chlorid (PDADMAC) K přípravě směsných micel použili dodecylsulfát sodný (SDS) a Triton X100 (TX100). DLS ukázalo postupný nárůst velikosti klastrů s teplotou až do hraniční teploty t_{fp} , kdy došlo k fázovému přechodu. Poté se klastry rozdělili na menší a větší agregáty. Podle všeho jsou velké klastry (200 – 400 nm) důležité prekursorů koacervace. Toto vysvětlení podporuje i fakt, že se snížením t_{fp} docházelo ke snížení velikosti klastrů. Naopak ke zvětšování klastrů docházelo s rostoucí molekulovou hmotností polyionu.

3.3 Interakce hyaluronan – tenzid

3.3.1 Fosfolipidy

Quemeneur F. a spol. [70] zkoumali vliv chemické struktury polyelektrolytu na jeho interakci s fosfolipidovou membránou a zwiterionickými tenzidy. Použili nativní a hydrofobně modifikovaný hyaluronan. Výsledky ukázaly, že při různých výchozích pH (3,5 a 6) a celkovém kladném náboji liposomu se negativně nabitý polyelektrolyt adsorbuje a vytváří tak negativně nabitou kompozitní částici. Za nepřítomnosti soli se alkylovaný hyaluronan adsorbuje stejně jako nemodifikovaný. Při pH 3,5 stupeň pokrytí membrány prudce stoupá ve spojení s výchozím celkovým pozitivním nábojem liposomu a to pro oba druhy hyaluronanu. Při pH 3,5 a 6 v nadbytku soli je díky hydrofobní autoasociaci alkylovaného hyaluronanu potřeba větší množství Hya-C₁₀, aby bylo dosaženo úrovně pokrytí jako u nemodifikovaného Hya.

Ronchetti Y. a spol. [71] zkoumali interakci hyaluronan-fosfolipid. K suspenzi fosfolipidu dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) byl přidán hyaluronan o různých molekulových hmotnostech. Struktura vzniklých agregátů podle získaných výsledků odpovídala perforované membráně vytvářející kolem kostry hyaluronanu válec o průměru 12 nm (**obr. 32**). Za přítomnosti vysokomolekulárního hyaluronanu docházelo vázáním jednotlivých válců k sobě k tvorbě struktury listu, kdežto nízkomolekulární hyaluronan způsoboval spíše rozpad liposomů nebo formaci omezeného množství válcovitých agregátů, které se navíc vyskytovaly jednotlivě. Za přítomnosti hyaluronanu s nejvyšší použitou molekulovou hmotností (1,9 MDa) byl navíc s postupem času zjištěn vznik kontinuálních agregátů tvořících v roztoku síť. Výsledky také ukázaly, že počáteční uspořádání fosfolipidu nemá na strukturu agregátů vznikajících interakcí s hyaluronanem vliv. Interakcí hyaluronanu a fosfolipidů ve formě liposomu se zabývali také **Crescenzi V. a spol.** [72]. Autoři použili vysokomolekulární hyaluronan a díky jejich výsledkům byla potvrzena tvorba supramolekulárních struktur tvořených agregáty DPPC a hyaluronanu.

3.3.2 Alkyltrimetylamonium bromidy

Thalberg, K. a spol. [73-77] 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 [78].

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 přidavkem 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 přidavek barviva do systému může znamenat částečné rušení interakcí.

Stejný tým se dále zabýval určením fázového chování systému TTAB-Hya-voda. Hlavním znakem je dvoufázový region ve tvaru kapky začínající v rohu diagramu, který přísluší vodě a který je zcela uzavřen jednofázovou oblastí. Jeho tvar je značně nesymetrický, což znamená, že roztok koncentrovaného polyelektrolytu je schopen rozpustit značně velké množství tenzidu, zatímco koncentrovaný roztok tenzidu se po přidání elektrolytu téměř ihned fázově separuje. Fázově separované komplexy Hya-tenzid s postupem času přecházejí na průhlednou koncentrovanou fázi usazenou na dně s relativně vysokým obsahem vody. Přítomnost této koncentrované fáze obsahující okolo 70 % vody reflektuje vysokou hydrofilitu výsledného komplexu.

Zkoumán byl také efekt nízkomolekulárního elektrolytu (NaBr) na fázovou separaci systému CTAB-Hya. Po přidání nízkých koncentrací polyelektrolytu dochází ke zmenšení dvoufázového regionu ve fázovém diagramu a při dosažení kritické hranice koncentrace soli ($250 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) už fázová separace neprobíhá. Po dalším přidavku soli ($500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) se fázová separace znovu objevuje, avšak její charakter je odlišný, protože zahrnuje separaci na roztok bohatý na tenzid a na roztok bohatý na polymer. Z výsledků plyne, že přidaná sůl omezuje interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, což znamená, že značná část interakce je elektrostatické povahy.

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.

3.4 Fluorescenční spektroskopie

3.4.1 Fluorescenční sondy

Stejný tým vedený **Thalbergem K.** [79] 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 [80].

Yin D. a spol. [81] 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. [82] zkoumali pomocí pyrenu mikropolaritu hydrofobních domén v systémech tenzidů s dvěma hydrofobními řetězcí ($C_{12}C_6C_{12}Br_2$) 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 $10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$. Stejný autor pak tuto metodu využil také ke zmapování efektu přídavku soli na tvorbu komplexů mezi kationtovými tenzidy a aniontovými polyelektrolyty [83].

Časově rozlišené měření fluorescence pyrenu bylo pak využito pro výzkum tvorby polyelektrolytem indukovaných micel v článku **Hanssona P. a Almgrena M.** [84]. Jako polyelektrolyt použili polyakrylát sodný (NaPA) a na něj vážali dodecylpyridiniové ionty a dodecyltrimetylamoniiové ionty.

Nizri G. a spol. [85] 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.** [86]. 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.** [87], kteří s její pomocí mapovali lokální složení filmů tvořených alkyltrimetylamoniiovými bromidy s různou délkou uhlíkového řetězce (12, 14, 16 a 18) a polyvinylsulfátem draselným.

3.4.2 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 [88-91]. Použití a podrobný popis této metody pro studium difúze lipidů a proteinů v modelových membránách publikovali **Chiantia S. a spol.** [92] a **Sankaran J. a spol.** [93]. Jedna z nejdůležitějších rešerší, zaměřená na koloidní a povrchovou chemii, byla vydána v

roce 2012 [94]. 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.** [95]. 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 komplikovaném 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 [96], která popisuje chování značeného polystyrenu rhodaminem B v polozřetěném 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 μ s. 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.** [97]. 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.** [98] ve své práci používali kromě schizofylanu i další polysacharidy (polygalaktouronovou kyselinu, sukcinoglykan a různé dextrany), které značili rhodaminovou 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) [99-101], a částice bez nutnosti další modifikace jako kvantové tečky [102-105] a nanodiamanty [106,107].

3.5 Reologie

Reologie se ukázala být také použitelnou při výzkumu interakcí polyelektrolyt-tenzid [108-111]. Např. práce **Maestra A. a spol.** [112] 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. [113] zkoumali interakce hyaluronanu a fibrinogenu také za pomoci 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.** [114]. 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.** [115], kteří zkoumali vliv přídavku liposomů na vlastnosti hydrogelu založeného na hydroxymethylcelulóze. 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 [116]. Pro hodnocení tokových vlastností takových viskoelastických kapalin pak existuje několik hlavních modelů. Srovnání mezi nimi provedl **Garakani A. H. a spol.** [117] a to na systému aktivovaného kalu. Výsledky ukázaly, že čtyřparametrické modely jako je např. Cross a Carreau model jsou pro tyto nenewtonské systémy nejvhodnější i přesto, že hodnocení jejich konstant je poměrně obtížné. Cross model k hodnocení tokových vlastností matic tvořených polysacharidem a tenzidem využil také **Bais D. a spol.** [118].

4 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem 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.

Základním kamenem pro celou práci se stalo zpracování literární rešerše podrobně mapující současný stav poznání v oblasti nosičových systému založených na interakci polyelektrolyt-tenzid. Tato rešerše se pak podrobněji zabývala o systémy obsahující hyaluronan, jejich vlastnosti a výhody a také na pokročilé metody, kterými lze tyto systémy zkoumat. Její zpracování by mělo být jedním z přínosů této práce.

Na základě rešerše bylo zjištěno, že systémy obsahující hyaluronan, ať už kovalentně nebo nekovalentně vázaný jsou velmi výhodnými formulacemi právě pro cílenou distribuci léčiv. Při zaměření pozornosti na fyzikálně vázané systémy hyaluronan-tenzid si tato práce klade za cíl zmapovat interakce hyaluronanu s různými amfifilními látkami.

Jak dále plyne s rešeršní částí, bylo u některých systémů polyelektrolyt-tenzid provedeno detailní mapování agregačního chování a názory na jeho průběh se různí. Dalším cílem této práce je proto pokusit se o podrobný popis interakce a agregace právě v systému hyaluronanu a vybraného tenzidu. K tomuto mají přispět hlavně pokročilé fluorescenční techniky, v jejichž aplikaci a zároveň detailním popisu způsobu jejich použití a vyhodnocení získaných dat tkví další z přínosů práce.

Při zpracování rešerše nebyl přehlížen ani potenciál kondenzovaných systémů vznikajících díky interakci polyelektrolyt-tenzid. Proto si práce jako další dílčí cíl klade podrobnější prozkoumání fázové separace v těchto systémech a také samotnou charakterizaci vznikajících koncentrovaných fází, také s ohledem na možnost jejich využití jako nosičových systémů. Metodiky použité k charakterizaci gelových fází jsou standardně používány, i v jejich případě se však práce poněkud podrobněji zaměřuje na způsob získání a vyhodnocení dat, aby tak byla přínosem i pro čtenáře používajícího stejnou metodu na jiném systému.

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Materiály

Použitý nativní i modifikovaný hyaluronan je produktem firmy Contipro Group. Jednalo se o následující typy nativního hyaluroanu: *HyAct* (75 kDa, š. 071207-P1), *HyAct* (106 kDa, š. 190908-E1), *HySilk* (310 kDa, š. 160708-E1), *HySilk* (650 kDa, š. 280407-D1), *HyCosm* (1,4 MDa, š. 050907-7, š. 210306-D2), *Sodium hyaluronate* (90 kDa, š. 212-2494), *Sodium hyaluronate* (300 kDa, š. 213-3809), *Sodium hyaluronate* (700 kDa, š. 211-341), *Sodium hyaluronate* (750 kDa, š. 212-1902), *Sodium hyaluronate* (806 kDa, š. 213-4160), *Sodium hyaluronate* (2 MDa, š. 211-180).

Během práce byly také použity také modifikované verze hyaluronanu. Jednu z nich představoval hydrofobně 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, š. 111220).

Jako amfifilní látky různých druhů byly použity: cetyltrimetylamonium bromid (CTAB, CAS: 57-09-0, Sigma, š. 059K0041, š. 117K0732), Tetradecyltrimetylamonium bromid (TTAB, CAS: 1119-97-7, Fluka, š. 1377175), cetyltrimetylamonium p-toluensulfonát (CTAT, CAS: 138-32-9, Sigma, š. 205-324-8), TWEEN® 20 (CAS: 9005-65-4, Sigma, š. 087K01981), dodecylsulfát sodný (SDS, CAS: 151-21-3, Fluka, š. 13553471), *n*-dodecyl- β -*D*-maltosid (CAS: 69227-93-6, Fluka, š. 1363358), Cetylbetain (Chemos, š. 415-21A), BETADET® THC-2 (Kao Corporation, š. PGR009.1127)

Jako vývojové produkty dodané firmou Contipro Group k testování jejich agregačních vlastností a interakcí s hyaluronanem byly použity také hydrofobně modifikované aminokyseliny. Jednalo se o dodecylserin (Ser-C₁₂), dodecylglycin (Gly-C₁₂), didecylglutamovou kyselinu (Glu-C₁₀) a dioktylasparagovou kyselinu (Asp-C₈).

Jako fluorescenční sondy byly použity: pyren (CAS: 129-00-0, Fluka, š. 4306611), 1,3-bis(1-pyrenyl)propan (P3P, CAS: 61549-24-4, Molecular Probes, š. 45B1-2), *N,N*-diemtyl-6-propionyl-2-naftylamin (prodan, CAS: 70504-01-7, Sigma, š. BCBBD8898V), nilská červeň (CAS: 7385-67-3, Fluka, š. 1381468)

Jako ostatní hydrofobní i hydrofilní modelové látky byly použity: súdánová červeň G (CAS: 1229-55-6, Fluka, š. 401930/1), merocyanin 540 (CAS: 62795-23-0, Aldrich, š. 03301EH), metyloranž (CAS: 547-58-0, Lachema, š. 67207), thymolová modř (CAS: 76-61-9, Lachema, š. 102361088), rhodamin B (CAS: 81-88-9, Sigma, š. BCBH1723V), *D*-mannitol (CAS: 69-65-8, Lachner, š. PP/2007/04172/0), diklofenak sodná sůl (CAS: 15307-79-6, Aldrich, š. 2393454), 2-metyl-1,4-naftochinon (Menadion, vit. K, CAS: 58-27-5, Aldrich, š. S41643-217), glycerol (CAS: 56-81-5, Lachner, š. PP/2007/03919/0), paclitaxel (Taxol, CAS: 33069-62-4, Haroui pharma-chem Inc., š. 061101), ($\pm$)- α - tokoferol (CAS: 10191-41-0, Fluka, š. 1320538), (-)-riboflavin (CAS: 83-88-5, Fluka, š. 1343102).

K přípravě fosfátového pufru a salinu byly použity: chlorid sodný (CAS: 7647-14-5, Lachner, š. PP/2009/06278), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (CAS: 13472-35-0, Lachner, š. 304660306), hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (CAS: 10039-32-4, Lachner, š. PP/2009/06156).

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

5.2 Příprava vzorků

Díky zaměření práce na systémy mající sice stejný základ (interakce hyaluronan-tenzid), ale různé formy (vodné roztoky a gelové fáze), zde bylo použito více různorodých metod. V této části také předesílám, že použité metody a jejich vyhodnocení je poněkud podrobněji popsáno v následujících částech práce. Jednalo se o metodu fluorescenční sondy sloužící většinou k charakterizaci agregačního chování ve zkoumaných systémech, dále pak o pokročilou metodu fluorescenční korelační spektroskopie mapující hlavně difúzní procesy ve vzorcích a tím odhalující interakce. Dodavatelsky byla prověřena také cytotoxicita systémů. To vše se systémy v roztoku. Dále pak bylo pracováno s kondenzovanými fázemi. Byla provedena základní charakterizace gelových systémů, jejichž vlastnosti byly poté testovány ještě termogravimetricky a reologicky. Přípravu jednotlivých „druhů“ vzorků lze pak s ohledem na výše uvedené shrnutí rozdělit podle jednotlivých metod.

5.2.1 Metoda fluorescenční sondy

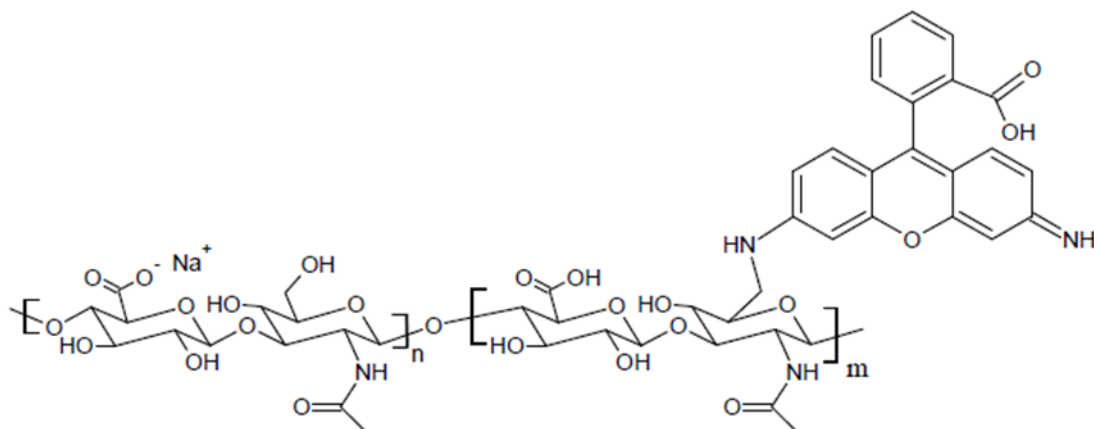
Při práci s **fluorescenčními sondami** byl použit standardní způsob přípravy vzorků spočívající v použití zásobního roztoku sondy v těkavém rozpouštědle. Tyto zásobní roztoky fluorescenčních sond byly připraveny v acetonu a do čistých skleněných vialek byl pipetován daný objem roztoku, tak aby v konečném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

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.

5.2.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Pro prvotní experimenty provedené pomocí **fluorescenční korelační spektroskopie** byl zvolen systém obsahující velmi nízkou koncentraci fluorescenčně značeného hyaluronanu. Jako fluorescenční značka zde sloužil kovalentně vázaný rhodamin 110 (rhHya, Contipro Group). Ve vzorcích byla použita konstantní koncentrace rhHya ($86 \mu\text{g.dm}^{-3}$) a proměnná koncentrace CTAB ($15 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ až 3 mmol.dm^{-3}) ve vodném prostředí. Koncentrace hyaluroanu byla volena tak, aby v detekčním objemu byly přítomny jednotky molekul fluorescenční značky.

Jak vyplývá ze struktury fluorescenčně značeného hyaluronanu (**obr. 32**), molekula rhodaminu je vázána přes aminovou skupinu, což znamená, že karboxylové skupiny zůstávají i po modifikaci volné pro disociaci a mohou tedy tvořit záporně nabitá interakční místa pro kladně nabitě tenzidové molekuly.



Obr. 32: Strukturní schéma značeného polymeru rhodaminylhyaluronátu sodného, dle [119].

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.* [67]). 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 ($20,0 \pm 0,5$ °C).

5.2.3 Cytotoxicita

Pro **testování na buňkách** byly vzorky obsahující jak směs tenzidu s hyaluronanem tak samotný tenzid připraveny smícháním zásobních roztoků daných komponent, popřípadě jejich ředěním. Vzorky byly opět ponechány minimálně 24 hodin na třepačce. Jako blank byly použity roztoky CTAB o příslušné koncentraci, ale bez přídavku hyaluronanu. Jako kontrola byl použit samotný hyaluronan. Ve všech vzorcích byla jeho koncentrace konstantní (0,1 % hm., Hya 806 kDa), kdežto koncentrace tenzidu se měnila v rozmezí od $0,2 \text{ mmol.dm}^{-3}$ do 2 mmol.dm^{-3} . Tyto testy byly provedeny dodavatelsky v rámci projektu COST¹ (RNDr. Marie Kalbáčova, Ph.D., Ústav dědičných metabolických poruch, Univerzita Karlova) a dodaná podrobná zpráva je uvedena v příloze 1.

5.2.4 Základní charakterizace gelových systémů

Při přípravě **gelových systémů** bylo standardně využíváno prostředí $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$ roztoku NaCl. Gelové systémy vznikaly v tomto prostředí při vyšších koncentracích hyaluronanu i tenzidu. V rámci prvotní charakterizace byly stanovovány mezní koncentrace obou komponent, při kterých již docházelo k tvorbě gelové fáze. Ta byla pro lepší orientaci vizualizována súdánovou červení, která byla do vzorků inkorporována podobně jako u

¹ COST LD12068, řešitel prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc., spoluřešitelka Ing. Tereza Halasová

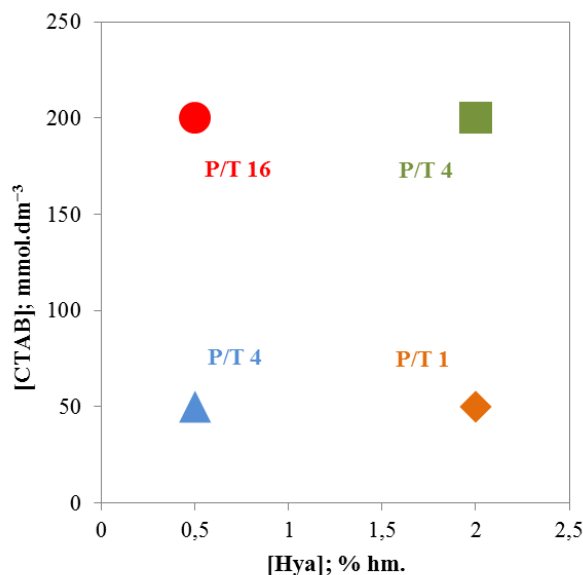
fluorescenčních sond. Vzorky byly připraveny tak, že do skleněných vialek byl pipetován zásobní roztok súdánové červeně v těkavém rozpouštědle a to bylo odpařeno. Následoval přidavek roztoku tenzidu a sonifikace až do kompletního rozpuštění hydrofobního barviva. K takto „obarvenému“ roztoku tenzidu byl poté přidáván roztok hyaluronanu a vzorky byly promíchány na vortexu.

Stejného postupu bylo využito při přípravě vzorků, které měly testovat **solubilizační vlastnosti** gelových systémů pro různé modelové hydrofobní látky, a to jak fluorescenční sondy, tak jiné hydrofobní barviva či látky. V případě inkorporace hydrofilních látek do gelů byly smíšeny vodné roztoky modelové látky a tenzidu, které byly sonifikovány, aby došlo k dokonalému rozpuštění a promíchání. Teprve poté byl přidán zásobní roztok hyaluronanu.

Všechny vzorky, v nichž měla po smíchání hlavních komponent, vzniknout gelová fáze byly ihned po smíchání protřepány na vortexu, ponechány minimálně 24 hodin stát při laboratorní teplotě a poté odstředěny po dobu 30 min při 40 000 otáčkách v rotační odstředivce.

5.2.5 Termogravimetrie a reologie

Vzorky gelových fází pro **termogravimetrické a reologické** testování byly připravovány s hyaluronanem o různé molekulové hmotnosti (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 jedolivých 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. Způsob kombinací koncentrací zásobních roztoků hyaluronanu a tenzidu naznačuje schéma na **obr. 33**. Zásobní roztoky příslušných koncentrací byly směřovány v poměru 1:1.



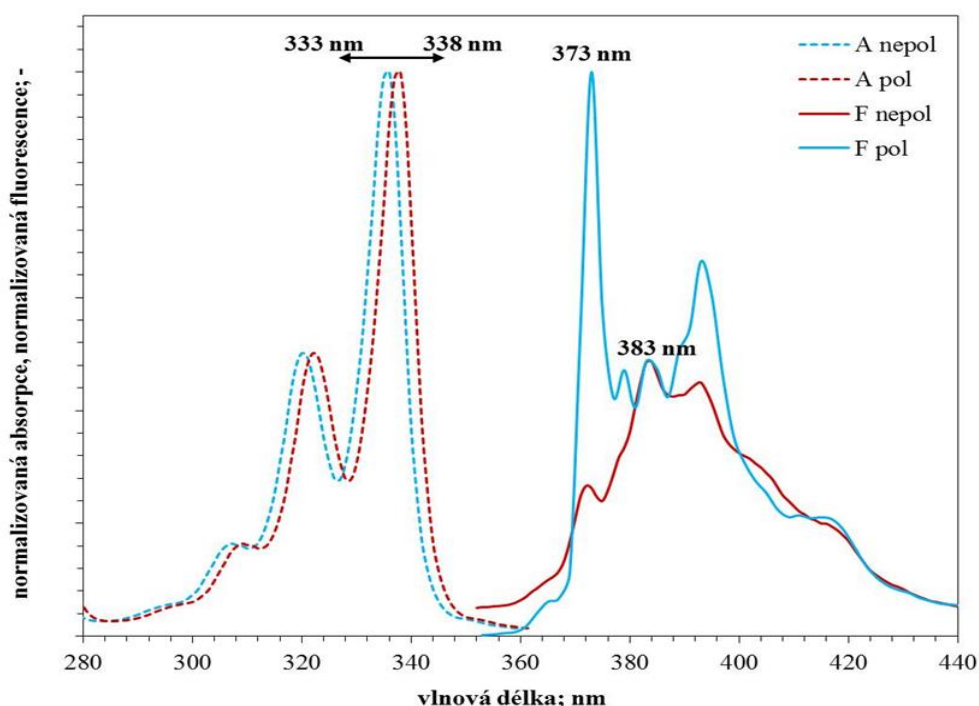
Obr. 33: Schéma přípravy gelových fází pro termogravimetrii a reologii

5.3 Metody a standardní vyhodnocení

5.3.1 Fluorescenční sondy

5.3.1.1 Pyren

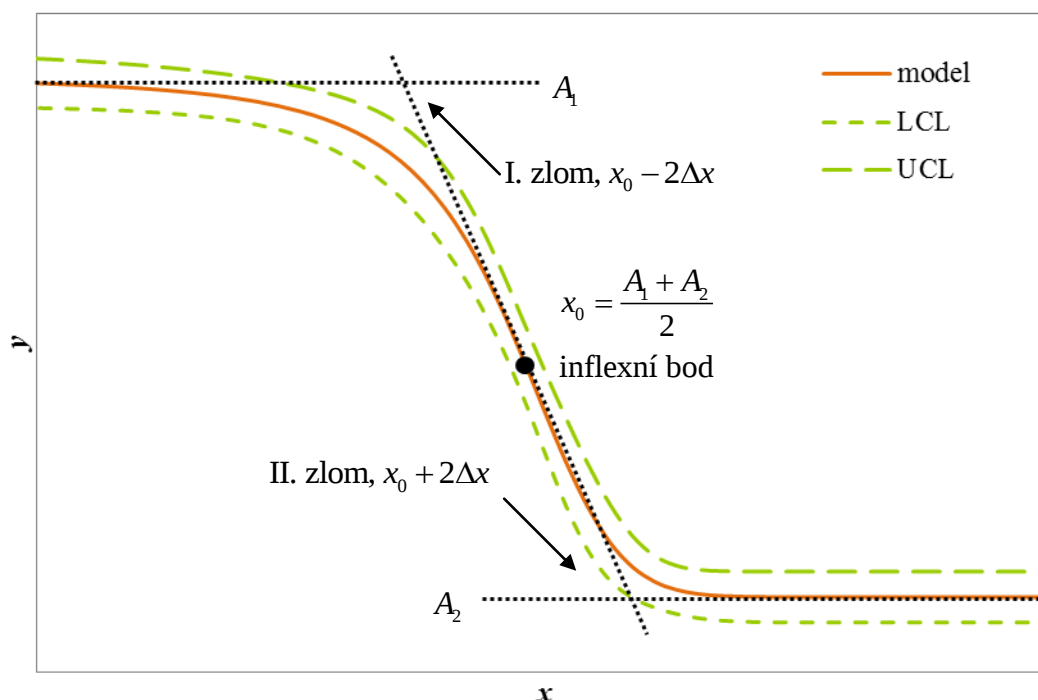
Fluorescenční spektra pyrenu byla měřena na fluorimetru FLUOROLOG. Při měření emisních spekter byl excitační monochromátor nastaven na 336 nm. Spektrum bylo měřeno v rozsahu od 360 nm do 540 nm. V tomto spektru byly sledovány intenzity prvního (373 nm) a třetího (384 nm) maxima. Jejich poměr je jedním z vyhodnocovaných parametrů reagujících na polaritu a bude nadále označován jako EmPI (emisní polaritní index). Dalším parametrem je poměr fluorescence monomeru (bráno 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 monomer) a vypovídá jak o rozložení pyrenu v hydrofobních jádrech, tak o mikroviskozitě příslušného jádra [120].



Obr. 34: Změny v excitačním a emisním spektru pyrenu v závislosti na polaritě prostředí.

U vzorků obsahujících pyren byly také měřeny excitační skeny od 325 nm do 345 nm 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. Excitační spektrum totiž také reaguje na polaritu vzorku a to posunem svého maxima. Tento parametr bude nadále značen jako ExPI (excitační polaritní index).

Závislost EmPI a ExPI na koncentraci tenzidu vykazuje u běžných tenzidů ve vodě jednoduchý sigmoidní charakter [121], což znamená, že na křivce se nachází pouze jeden zlom. Tato závislost je standardně prokládána pomocí Boltzmannova modelu, který je znázorněn na **obr. 35**. Naměřené závislosti byly vyhodnocovány pomocí programu OriginPro 8.1, pomocí něhož byly vypočteny parametry Boltzmannova modelu, a byl také určen interval spolehlivosti na hladině významnosti 0,05. Ten je v obrázku vyznačen zelenými šrafovanými čarami, které jsou označeny jako LCL (lower confidence limit) a UCL (upper confidence limit).



Obr. 35: Boltzmannova závislost a její charakteristické parametry

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. Poslední dvě zmíněné hodnoty vypovídají o vlastnostech systému před a po agregaci. Zvláště pak jde o minimum A_2 , z něhož lze usuzovat na polaritu hydrofobních jader vzniklých a ustálených agregátů. Posledním parametrem je Δx , které je přímo spojeno s rozsahem nezávislé proměnné, ve kterém probíhá náhlá změna závislé proměnné, což jinými slovy znamená, že tato hodnota charakterizuje jak strmý je pokles v klesající části křivky a vypovídá tak o průběhu samotné agregace [121].

Rovnice Boltzmannovy křivky je dána jako:

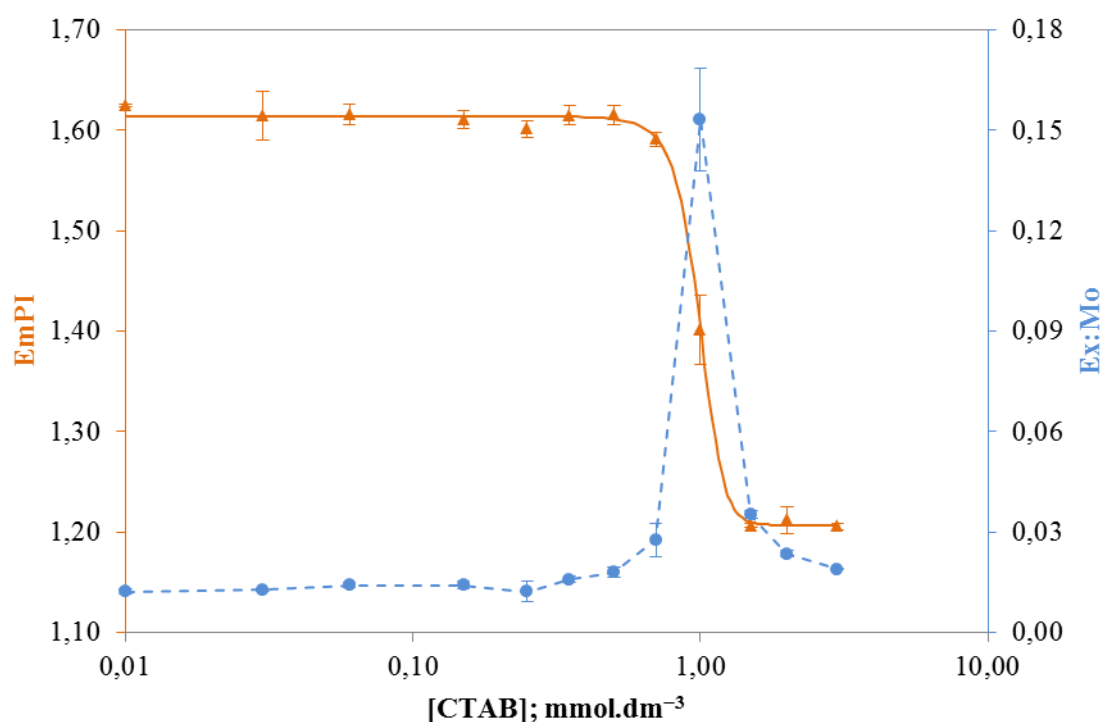
$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (27)$$

kde proměnná y odpovídá EmPI nebo ExPI a nezávislá proměnná x označuje celkovou koncentraci tenzidu, A_1 a A_2 je horní a spodní limita sigmoidní křivky

Pyren je z hlediska použití pro charakterizaci koloidních roztoků velmi rozšířenou fluorescenční sondou [122-124]. Na jeho použití však nelze hledět nekriticky, protože signál této sondy může být ovlivněn řadou faktorů. Pyren je z hlediska své struktury (polycyklický aromatický uhlovodík) hydrofobní povahy. I přes tyto svoje vlastnosti se však ve vodě částečně rozpouští a z vody jako polárního prostředí dává také charakteristický signál. S tím je nutno počítat při interpretaci dat, protože signál ze vzorku bude v tom případě vždy více či méně zkreslován vodním signálem pyrenu a to podle toho, jaké bude rozdělení fluorescenční sondy mezi vodné a hydrofobní prostředí. Projevem tohoto chování pyrenu je v podstatě tvar samotné sigmoidní závislosti, který vykazuje EmPI nebo ExPI na koncentraci tenzidu. Modelově je na **obr. 36** znázorněna závislost EmPI na koncentraci CTAB ve vodě. Horní rameno této křivky je v podstatě tvořeno hodnotami EmPI charakteristickými pro vodné prostředí, protože při tak nízkých koncentracích tenzidu, ještě nejsou vytvořeny žádné micely

mající hydrofobní jádro schopné pyren solubilizovat. Tenzidy se v této oblasti koncentrací hromadí na mezifázovém rozhraní. V případě že by byl pyren opravdu ve vodě naprosto nerozpustný, nemohli bychom signál ze vzorků s tak nízkou koncentrací tenzidu vůbec získat.

Po dosažení kritické koncentrace tenzidu v roztoku pak dochází k tvorbě micel, což se na závislosti projevuje zlomem. Jak již víme, tento zlom může mít různý sklon, což nám udává parametr Δx Boltzmannova modelu. Z pohledu fluorescenční sondy však tento zlom a samotný sigmoidní průběh může být zapříčiněn dvěma jevy. Prvním z nich jsou lišící se vlastnosti vznikajících micel od vlastností micel už ustálených dále za CMC. Jedná se o to, že v oblasti zlomu mohou vznikat premicelární agregáty, jejichž jádro je ještě poměrně dobře přístupné pro vodu a jeho polarita tedy neklesá k tak nízkým hodnotám jako polarita již ustálených micel ve volném roztoku. Zároveň může však jít také o jev způsobený samotným rozdělením sondy v roztoku, což by znamenalo, že toto chování do systému sami vnášíme právě použitou metodou. Z tohoto hlediska je totiž možné, že ve chvíli, kdy dosáhne koncentrace tenzidu svojí kritické hranice, dojde v systému již k vytvoření plnohodnotných micel, jejichž vlastnosti se dále se zvyšující se koncentrací tenzidu nemění a důvodem pozvolně klesajících hodnot na závislosti $EmPI$ je pouze jejich množství. Těsně po kritické micelární koncentraci totiž v systému bude vytvořeno pouze malé množství micel, které budou schopny solubilizovat pouze část fluorescenční sondy rozpuštěné v systému a výsledné hodnoty polaritního indexu v oblasti CMC budou uměle zvýšeny právě signálem pyrenu z vodného prostředí. Skutečnou hodnotu polaritního indexu ustálených micel, pak naměříme až ve chvíli, kdy bude v systému dostatečné množství agregátů k solubilizaci většiny fluorescenční sondy a zkreslení zbytkovým pyrenem z vody pak bude minimální.



Obr. 36: Závislost $EmPI$ a $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu CTAB ve vodě. Hladkou plnou čarou zobrazena závislost Boltzmannova modelu odpovídající datům pro $EmPI$. Hladkou čárkovanou čarou pro názornost propojeny body závislosti $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu.

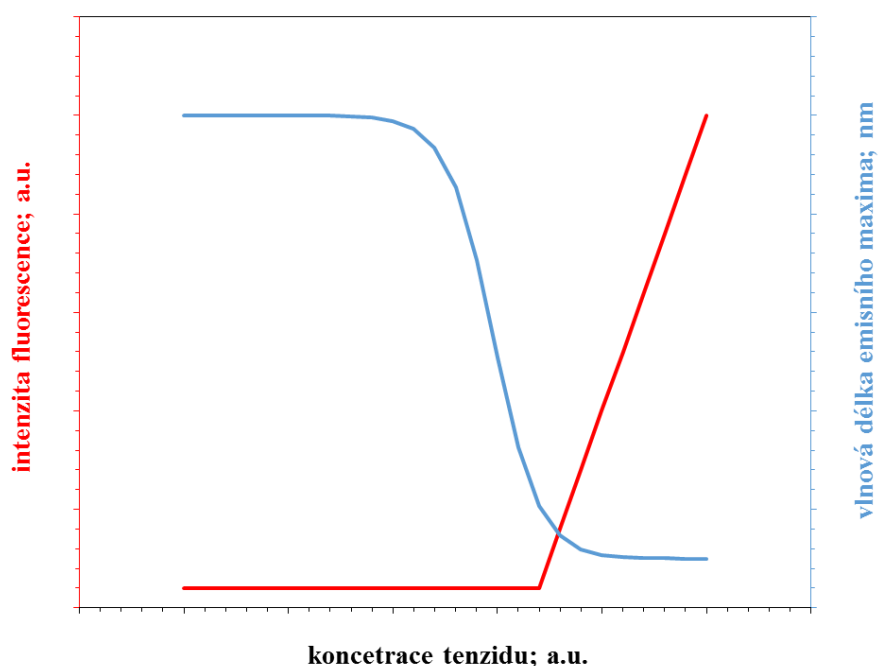
Na **obr. 36** pak můžeme vidět také závislost Ex:Mo na koncentraci tenzidu. Tento parametr v podstatě charakterizuje tvorbu excimeru ve vzorcích a ač je naměřen z jednoho vzorku se stejnou sondou, je založen na jiném principu, než polaritní parametry. Tvorba excimeru je totiž z důvodu interakce dvou molekul fluorescenční sondy difuzně řízený proces, protože tyto dvě molekuly se musí k sobě dostat do určité vzdálenosti, aby mohl excimer vzniknout. Přeneseně tak dostáváme informace o mikroviskozitě hydrofobního jádra, pokud je totiž prostředí v nepolárním jádře rigidní, pak je menší pravděpodobnost, že se dvě molekuly pyrenu během doby života excitovaného stavu k sobě dostanou a vytvoří excimer. Pokud je prostředí fluidní, urazí excitovaná molekula pyrenu během doby života delší vzdálenosti a pravděpodobnost tvorby excimeru vzroste, tím také narůstá ve spektru jeho signál a zvyšují se hodnoty parametru Ex:Mo.

Výše uvedená situace ovšem platí pouze pro micely, jejichž jádro je fluorescenční sondou obsazeno vícenásobně a tato situace nastává pouze za určitých podmínek, které jsou dány poměrem koncentrace micel a pyrenu. Detekovat excimer a zjistit tak informace o mikroviskozitě jádra jsme tedy schopni jen v případě určitého rozdělení pyrenu mezi vodnou a hydrofobní fázi. V prostředí volného rozpouštědla je k tvorbě excimeru potřeba koncentrace pyrenu $10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$, přičemž při koncentraci $10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ již excimer zcela vymizí. V roztocích použitých k měření závislostí zobrazených na **obr. 36** byla použita koncentrace sondy $10^{-7} \text{ mol.dm}^{-3}$ a přesto je zde tvorba excimeru v oblasti CMC patrná.

Jedná se právě o situaci, kdy je v systému pouze malé množství micel a zároveň dostatek pyrenových molekul, aby jejich část byla molekulami sondy obsazena vícenásobně. Tvar závislosti Ex:Mo na koncentraci tenzidu má proto maximum právě v oblasti CAC, před touto oblastí se excimer netvoří, protože v roztoku nejsou hydrofobní domény, ve kterých by došlo k zakoncentrování pyrenu. Za CAC pak intenzita fluorescence excimeru opět klesá, protože roste množství micel a dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení fluorescenční sondy mezi jejich jádra. Počet vícenásobně obsazených micel pak s jejich rostoucí koncentrací klesne na minimum. Jak je vidět komplexnější obraz systému získáme teprve korelací polaritního parametru s parametrem Ex:Mo.

5.3.1.2 Nilská červeň

Pro nilskou červeň byl excitační monochromátor nastaven na 550 nm a emisní monochromátor na 638 nm. Sledována byla intenzita a poloha maxima emisního píku a dále byl pro vyhodnocení použit také totální integrál emisního spektra v rozmezí od 610 nm do 700 nm. Takto naměřená data mají charakteristický průběh, intenzita fluorescence a totální integrál emisního spektra jsou v oblasti před CMC konstantní a nabývají nízkých hodnot. Sonda je v tomto prostředí zhasena vodným prostředím. Po dosažení CMC následuje prudký nárůst intenzity fluorescence a potažmo i hodnoty jejího integrálu. Vyhodnocení pak probíhá metodou průsečíku dvou přímk. Stoupající část závislosti je proložena lineární regresí, do jejíž rovnice je dosazena průměrná hodnota intenzity nebo totálního integrálu z konstantní části křivky a takto je vypočtena CMC (**obr. 37**, plná červená čára) [125, 126].



Obr. 37: Standardní vyhodnocení dat získaných nilskou červení pomocí metody průsečíku dvou křivek

Naměřená data posunu emisního maxima nilské červeně mají charakteristický sigmoidní tvar (**obr. 37**, modře značená závislost) a proto je k jejich vyhodnocení použita výše zmíněná Boltzmannova závislost. Jako CMC je brána koncentrace tenzidu odpovídající inflexnímu bodu. Stejný model lze použít také k vyhodnocení dat intenzity fluorescence a totálního integrálu emisního spektra nilské červeně, ale to jen v případě, že dojde k saturaci signálu a jeho hodnoty se ustálí na daném maximu. Potom je jako hodnota CMC brána koncentrace, při které na křivce nastává první zlom, což odpovídá vyhodnocení pomocí průsečíku dvou přímek.

5.3.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

5.3.2.1 Přístrojové vybavení

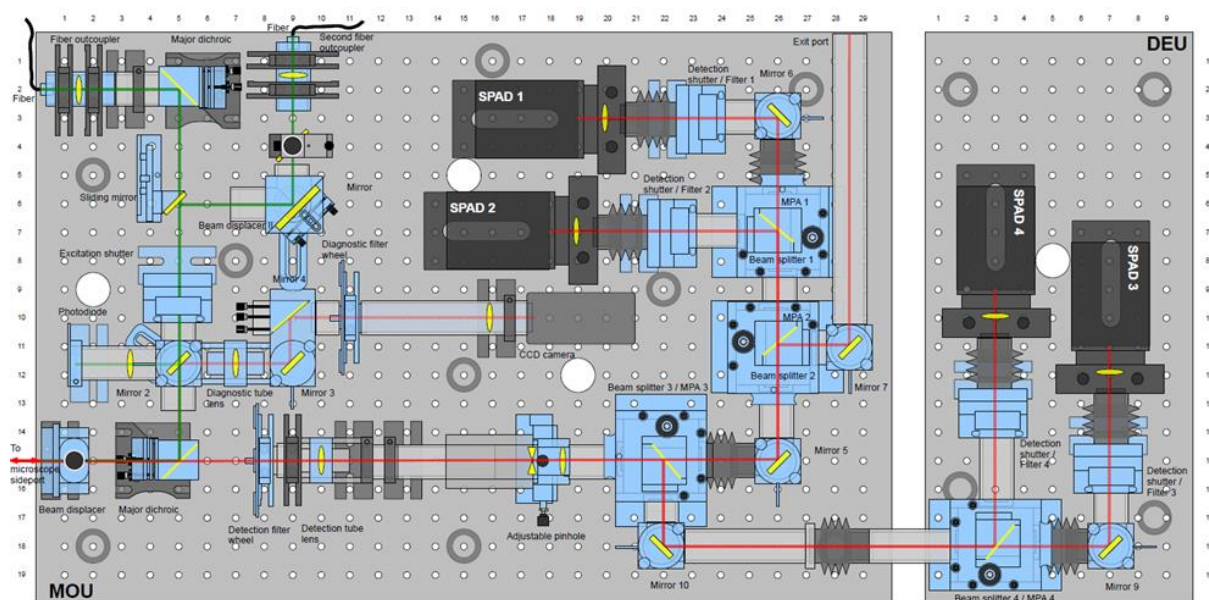
Konfokální mikroskop s fluorescenční korelační spektroskopií, na němž byly vzorky měřeny, je postaven na inverzním mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačních zdrojích a elektronice firmy PicoQuant (PicoQuant GmbH), skeneru se sub-nanometrovým rozlišením firmy Physik Instrumente (Physik Instrumente GmbH) a externího femtosekundového laserového zdroje Menlo Orange (Menlo Systems GmbH).

Systém obsahuje excitační zdroje, pulzní laserové diody (fundamentální frekvence 80, 64, 50 MHz) o vlnových délkách 375, 405, 440, 470, 510, a 640 nm. Jeho součástí je i externí femtosekundový laser pro vícefotonovou excitaci s vlnou délkou 1030 ± 30 nm, frekvence 50 MHz a výkonem 250 mW před kompresí.

Měřicí soustava obsahuje čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z nich jsou zastoupeny detektory typu τ -SPAD se šumem nepřekračujícím 100 cnts.s^{-1} a dva zbylé představují detektory MPD-SPAD se šumem pod 250 cnts.s^{-1} . Dále je přístroj vybaven externím

spektrografem s CCD kamerou Newton (Andor), který umožní snímání stacionárních fluorescenčních spekter současně s probíhajícím konfokálním experimentem.

Pro experimenty byla použita následující konfigurace měřicího 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 (**obr. 38**)



Obr. 38: Schéma diagnostického a detektorového prostoru konfokálního mikroskopu s fluorescenční korelační spektroskopií

5.3.2.2 Měření a úprava dat

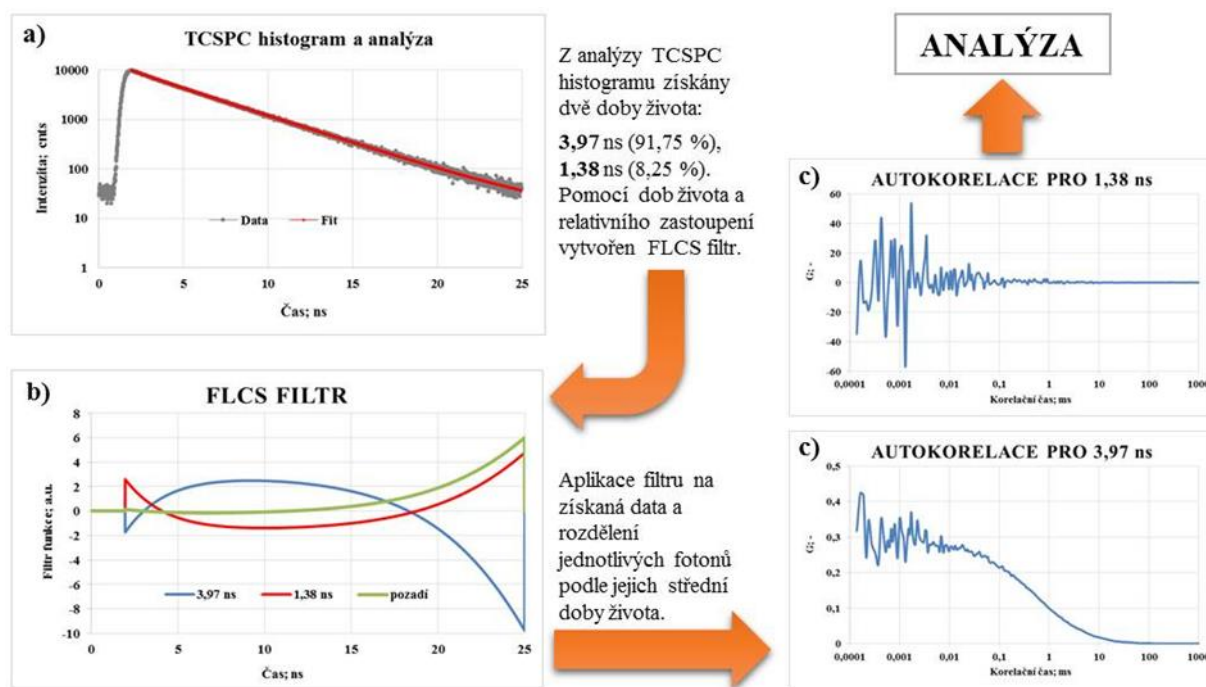
Základem pro měření a vyhodnocení je program SymphoTime64. Pro každý vzorek jsou data sbírána minimálně po dobu 5 minut. Po tuto dobu jsou vizuálně kontrolována díky algoritmu, který vykresluje autokorelaci, případně kros-korelaci mezi detektory, okamžitě v měřicím okně. Data jsou pak uložena ve formátu „*.tttr“ (time-tagged time-resolved), který určuje absolutní čas příchodu fotonu na detektor. Výhodou tohoto datového uspořádání je možnost na jednou naměřených datech provést více typů analýz a vyhodnotit tak globální dobu života fluoroforu ve vzorku.

Pomocí programu jsou pak data interpretována podle zvolené analýzy. V případě FCS měření se jedná hlavně o dvě možnosti interpretace. První z nich je klasická FCS, při které je vhodné použít kros-korelaci mezi dvěma detektory a druhou pak časově rozlišená FLCS.

Z hlediska přesnosti je vhodnější volit časově rozlišenou variantu, která spolehlivě potlačí šum detektorů, parazitní světlo z prostředí a tzv. „afterpulsing“ způsobený zpětnou vazbou fotonu na detektoru. Tento mód totiž umožní aplikovat na surová data filtr založený na době života přítomných fluoroforů. Obecně je tuto interpretaci vhodné využít v případech, kdy se doba života mění z důvodu umístění fluoroforu v odlišném prostředí. Po aplikaci filtrů pak lze získat různé autokorelační funkce pro fluorofory s odlišnou dobou života, tedy pro takové, které se nacházejí v odlišném prostředí nebo které se spektrálně překrývají.

Z důvodů komplikovanosti konkrétního zkoumaného systému rhHya – CTAB, byla data analyzována a interpretována pomocí různých přístupů. Data byla měřena simultánně na dvou detektorech, a proto zde byla možnost jejich kroskorelace s potlačením afterpulsingu a navíc i jednoduchým potlačením pozadí pomocí výše popsaného zjednodušeného FLCS filtru. Ten je přímo integrován ve skriptu pro klasickou FCS analýzu a je používán bez dalšího nastavení. Kroskorelace mezi stejnými detektory ve stejné spektrální oblasti není v literatuře příliš častá, protože jen málo přístrojů disponuje dvojicemi shodných detektorů. Výjimku tvoří práce **Zettla U. a spol.** [96].

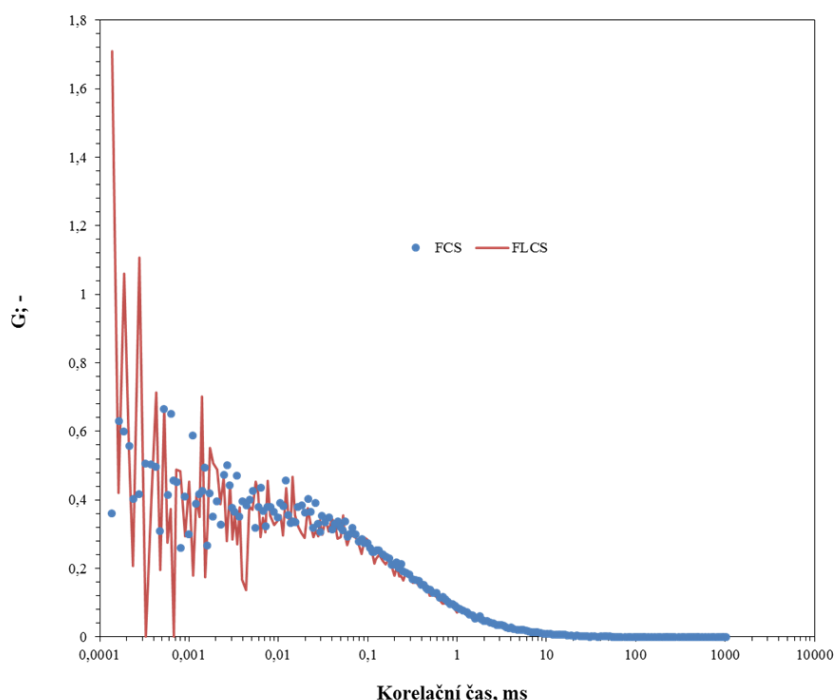
Při předúpravě dat byla vybrána surová data z detektoru τ -SPAD1 (**obr. 39 a**)) a ta byla podrobena FLCS analýze, při níž program vyhodnotí doby života přítomných fluoroforů a jejich relativní zastoupení. Pomocí těchto dat pak generuje FLCS filtr (**obr. 39 b**)), který je aplikován na původní surová data. Díky této úpravě lze získat autokorelační funkce příslušející různým dobám života fluoroforu (**obr. 39 c**)). Jak je po aplikaci filtru patrné, data příslušející minoritní kratší době života nevykazují žádnou korelaci a tudíž se nejedná o difúzní proces, zatímco data pro majoritní delší dobu života korelaci vykazují. Pro všechna vyhodnocovaná data lze konstatovat, že pokud vzorek rhHyA vykazoval více dob života, tak pro analýzu byla použitelná pouze autokorelační funkce příslušející delší době života fluoroforu, která byla vždy majoritně zastoupená.



Obr. 39: Schématické naznačení FLCS analýzy pro dvě doby života ve vzorku.

Při měření se vyskytly i případy, kdy měl fluorofor v měřeném vzorku pouze jednu dobu života. Při porovnávání interpretace dat těchto vzorků pomocí kroskorelační FCS a FLCS analýzy bylo zjištěno, že je vhodnější použít kroskorelační FCS analýzu, která dokáže účinněji potlačit „afterpulsing“, jak ukazuje **obr. 40**. Z něj je zřejmé, že křivky pro FCS a FLCS se v oblastech stanovení difúzního času neliší. K významným odlišnostem dochází pouze v oblasti velmi krátkých korelačních časů, které obsahují záznamy pocházející z „afterpulsingu“. Z hlediska proložení dat modelem není však odlišnost tak významná, jak by

naznačovalo grafické zobrazení, protože software přiřazuje krátkým korelačním časům nízkou váhu, a ty pak model méně ovlivňují. Proložení FCS a FLCS křivky se ale rozchází v určování hodnoty $G(0)$, což je hodnota autokorelační funkce při korelačních časech limitně se blížících nule. Z tohoto důvodu, pokud vzorky vykazovaly jedinou dobu života, jsou data diskutována na základě kroskorelační FCS interpretace.



Obr. 40: Srovnání FCS a FLCS analýzy na vzorku vykazujícím jednu dobu života

5.3.2.3 Vyhodnocení dat

Pro vyhodnocování a porovnávání byly zvoleny dva parametry. Jedním z nich je počet molekul ve sledovaném konfokálním objemu a druhým stanovený difúzní čas. Oba tyto parametry lze získat na základě autokorelační funkce, kterou lze získat na základě proložení dat pomocí modelů integrovaných ve vyhodnocovacím programu (Pure diffusion, Triplet, Triplet Extended 2D a 3D, Conformation, Protonation). Poté jsou bez dalších dodatečných kalibračních měření přístupné hodnoty difúzních časů a amplitudy autokorelační funkce, jejíž převrácená hodnota určuje počet molekul v pozorovaném objemu. Pokud je v systému více difundujících molekul, pak jsou přístupné i parciální amplitudy a tedy jejich relativní zastoupení. Samotné vyhodnocení FCS se řídí nejen matematickými kritérii, hodnotou chí-kvadrát a reziduální analýzou, ale i logickým očekáváním chování vzorku. Ne vždy je nutné dosáhnout hodnoty chí-kvadrát přesně jedné, pokud model nevyjadřuje fyzikální podstatu pozorovaného jevu. Následující rovnice reprezentují nejčastěji používané modely v případě, že ve vzorku je očekávána volná difúze.

Model „**Pure diffusion**“ předpokládá, že fluktuace funkce pocházejí jen z difundujících molekul.

$$G(t) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i]}\right]\right] \cdot \left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i] \cdot \kappa^2}\right]^{0.5}\right]}, \quad (28)$$

kde n_{Dif} je počet nezávisle difundujících částic, $\rho[i]$ je příspěvek i -té složky, τ_{Dif} je difúzní čas i -té složky a κ je poměr délky z_0 a laterálního poloměru w_0 efektivního excitačního objemu V_{ef} . Z výše uvedeného vyplývá průměrný počet částic v pozorovaném objemu N :

$$N = \left[\sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \rho[i] \right]^{-1}. \quad (29)$$

Tento parametr není výsledkem proložení, ale počítá se z hodnoty $G(0)$ (hodnota autokorelační funkce při korelačních časech limitně se blížících nule). Při znalosti velikosti pozorovaného objemu je pak možno stanovit koncentraci molekul v pozorovaném objemu:

$$C = \frac{N}{V_{\text{ef}} \cdot N_A}, \quad (30)$$

kde N_A je Avogadrovo číslo ($6,022\,141\,79(30) \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). Pokud je známá hodnota pozorovaného objemu a κ , pak je možné určit efektivní laterální poloměr ohniska w_0 při hodnotě intenzity $1/e^2$ jako

$$w_0 = \left[\frac{V_{\text{ef}}}{\kappa} \right]^{\frac{1}{3}} \cdot \pi^{-0,5}. \quad (31)$$

Pak lze difúzní konstantu i -té složky vyjádřit jako

$$D[i] = \frac{w_0^2}{4 \cdot \tau_{\text{Dif}}[i]}. \quad (32)$$

Model „**Triplet**“ bere v úvahu i vliv existence tripletního, tedy dlouho dohasínajícího signálu od měřených molekul. Je třeba poznamenat, že většina fluoreskujících molekul tento tripletní signál vykazuje a proto je doporučováno používat právě modely, které ve svojí analýze s tripletním stavem počítají.

$$G(t) = \left[1 + \left[T_f \left[e^{(-t/\tau_{\text{Trip}})-1} \right] \right] \right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i]} \right] \right] \cdot \left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i] \cdot \kappa^2} \right] \right]^{0,5}}, \quad (33)$$

kde T_f je tmavá (tripletní) frakce molekul, τ_{Trip} je doba života tripletního stavu. Pro vyhodnocení platí výše uvedené rovnice s výjimkou vztahu pro počet částic ve vzorku, který je nutné upravit na:

$$N = \left[[1 - T] \sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \rho[i] \right]^{-1}. \quad (34)$$

Výše uvedené rovnice byly s větším či menším úspěchem aplikovány na experimentální data. Vzhledem ke zjevné nestabilitě systému byla data analyzována pomocí sofistikovanějšího modelu nazývaného „**Triplet Extended 3D**“. Tento model popisuje opět difúzi ovlivněnou přítomností tripletního stavu, ale je navíc rozšířen o koeficient „anomální

difúze“, což je difúzní proces s nelineárním vztahem mezi středním kvadratickým posunem částice (tzv. MSD) a časem. Lze díky němu tedy popsat i subdifúzní i superdifúzní jevy.

$$G(t) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{\text{Trip}}-1} \left[T[j] \left[e^{\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Trip}}[j]} \right)^{-1}} \right] \right] \right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i]} \right]^{\alpha[i]} \right] \cdot \left[1 + \left[\frac{t}{\tau_{\text{Dif}}[i] \cdot \kappa^2} \right]^{\alpha[i]} \right]^{0,5}} + G_{\text{inf}}, \quad (35)$$

kde α je anomálním parametrem i -té difundující částice a G_{inf} je posunutí FCS křivky v nekonečném čase. V tomto případě pak je počet částic popsán vztahem:

$$N = \left[\left[1 - \sum_{j=0}^{n_{\text{Trip}}-1} T[j] \right] \cdot \left[\sum_{i=0}^{n_{\text{Dif}}-1} \rho[i] \right] \right]^{-1}. \quad (36)$$

5.3.3 Cytotoxicita

Prvotní testy cytotoxicity byly provedeny na buňkách osteosarkomu s označením SAOS-2 ve dvou četnostech (20000 a 40000 buněk na cm^2). Buňky byly inkubovány po dobu jednoho dne a poté na ně byly přeneseny vzorky. Takto připravované vzorky byly inkubovány po dobu 3, 5 a 24 hod v McCoyově médiu s přidavkem 15 % fetálního hovězího séra. Cytotoxicita byla sledována po 5 a 24 hod po přidavku vzorků pomocí kitu LIVE/DEAD[®] (Molecular Probes) a také po 24 hod pomocí MTS testu (Promega).

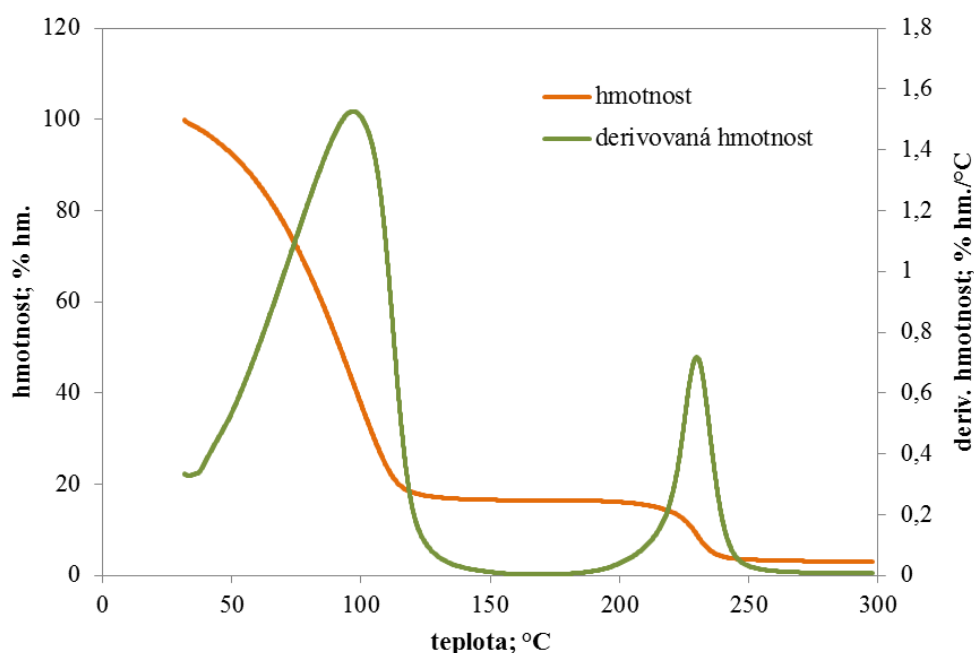
LIVE/DEAD[®] kit poskytuje testování viability buněk na základě souběžného rozlišení živých a mrtvých buněk díky dvěma různým fluorescenčním sondám. Jedná se o kalcein AM a etidium homodimer (EthD-1). Princip spočívá v rozlišení živých buněk díky aktivitě intracelulární esterázy, která je determinována enzymatickou konverzí prakticky nefluorescentního kalceinu AM na intenzivně fluoreskující kalcein. Kalcein, jako aniontový polyelektrolyt, je dobře zadržován uvnitř živých buněk a poskytuje pak intenzivní zelenou fluorescenci živých buněk (excitace 495 nm a emise 515 nm). EthD-1 živé buňky nepohlí, prostupuje naopak do buněk s poškozenými membránami a jeho emise je podporována vázáním nukleových kyselin. Pak způsobuje červenou fluorescenci u buněk mrtvých (excitace 495 nm a emise 635 nm).

MTS proliferační test (CellTiter 96[®]) je kolorimetrická metoda pro určení počtu živých buněk. Tento test obsahuje sloučeninu 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium označovanou jako MTS a reagent fenazin etosulfát zkráceně PES. Sloučenina tetrazolia MTS je bioredukována živými buňkami na barevný produkt formazan, který je rozpustný v médiu. Ke kvantifikaci tohoto produktu slouží měření absorbance vzorku při vlnové délce 490 nm. Tato hodnota je pak přímo úměrná počtu živých buněk v kultuře.

5.3.4 Termogravimetrie

Gelovité fáze tvořené interagujícím hyaluronanem a CTAB byly termogravimetricky testovány na přístroji TGA Q50 (TA Instruments). Byly provedeny teplotní rampy $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu až do teploty $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ a to za vzduchové atmosféry o průtoku 60 dm^{-3} za minutu. Testy byly provedeny pro gely vzniklé smícháním různě koncentrovaných roztoků hyaluronanu a tenzidu. Byly použity tři molekulové hmotnosti hyaluronanu (300, 700 a 2000 kDa).

Ve spektrech se u všech vzorků objevuje dvouzlomová křivka, což znamená, že na křivce derivované podle teploty pak všechny naměřené závislosti vykazují dvě maxima. První pík, jehož maximum se nachází okolo $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, odpovídá vysušení vody ze vzorku. Druhé maximum nacházející se obvykle okolo $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ přísluší tepelné degradaci komponent a jejich spálení. Hmotnost se poté ustaluje na konstantní hodnotě příslušející konečnému množství popela.

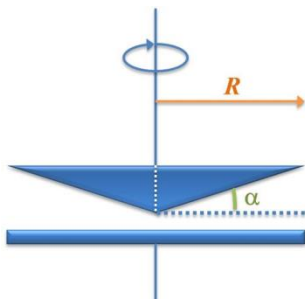


Obr. 41: Záznam TG měření vybraného vzorku (Hya 2000 kDa 2% hm. a 200 mmol.dm^{-3})

Příklad obou zmíněných závislostí je na **obr. 41**. Z naměřených křivek byly vyhodnocovány 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 $t_{\text{poč1}}$ udávající hodnotu teploty při které se voda ze vzorku začíná uvolňovat. Tato hodnota je však zatížena velkou chybou kvůli uspořádání měření. Vzorek byl totiž na pánvičku přístroje přenesen ze vzorku gelu se supernatantem, aniž by byl nějak povrchově osušen. Voda z povrchu gelu se tedy začíná uvolňovat ihned po začátku měření. Z konstantních oblastí na křivkách následujících po prvním maximum byla vyhodnocena hodnota sušiny v hmotnostních procentech označena jako $m_{\text{suš}}$. Analogicky byly vyhodnoceny i druhé zlomy a maxima, z nichž byly stanoveny parametry t_{inf2} , $t_{\text{poč2}}$ a m_{pop} . Zde se jedná o teploty charakterizující počátek degradace, spálení většiny vzorku a ustálenou hmotnost popela.

5.3.5 Reologie

Reologická měření byla provedena na reometru AR-G2. Jedná se o rotační reometr, využívána byla geometrie kužel-deska. Výhodou tohoto uspořádání jsou přesně definované tokové podmínky. Schéma tohoto uspořádání je uvedeno na **obr. 42**.



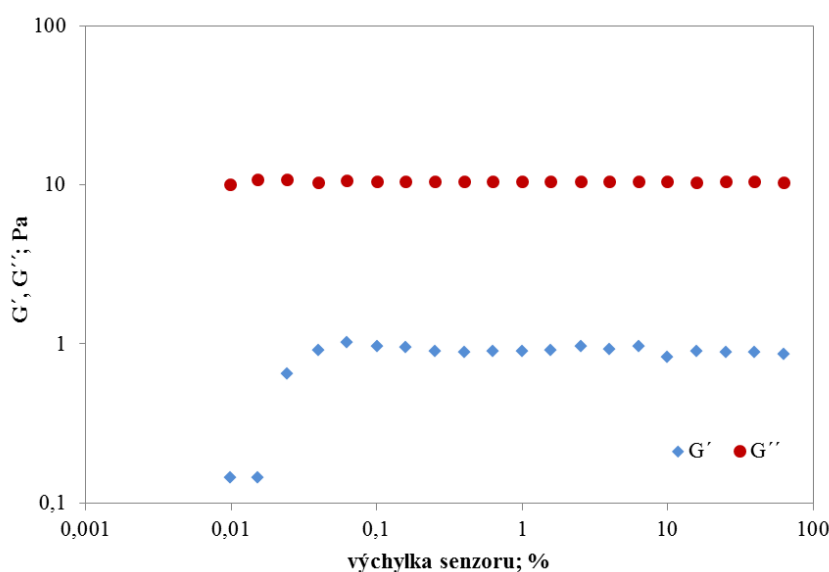
Obr. 42: Schéma rotačního reometru s uspořádáním kužel-deska

Deska je v tomto uspořádání stacionární a vzorek se nanáší na ni. Kužel s poloměrem R rotuje kolem své osy úhlovou rychlostí Ω . Za předpokladu, že úhel α , který svírá skosená část kužele s deskou je malý, tj. v řádu několika stupňů, lze odvodit rychlost smykové deformace a to obdobně jako u Newtonova zákona

$$\gamma = \frac{\Omega r - 0}{r \cdot \alpha} = \frac{\omega}{r}, \quad (37)$$

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^3}, \quad (38)$$

kde M je krouticí moment a r je poloha vrstvy vzorku vůči ose otáčení. V tomto geometrickém uspořádání je jak rychlost smykové deformace, tak i smykové napětí nezávislé na pozici mezi kuželem a deskou. V našem případě byl použit kužel s poloměrem 40 mm a zkosením 1° .



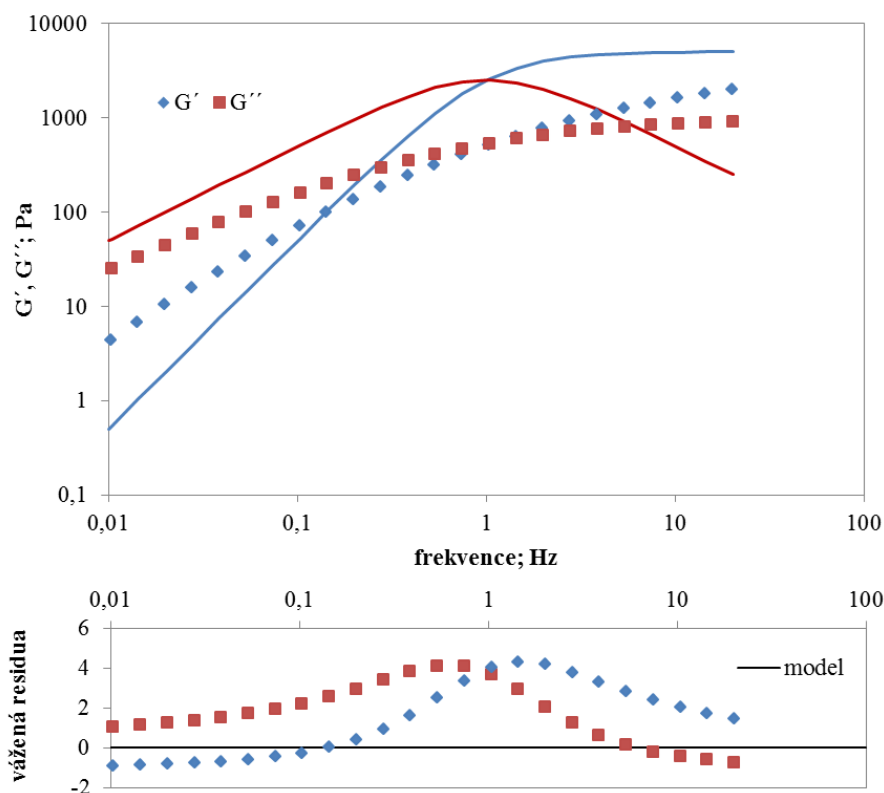
Obr. 43: Závislosti pamětového a ztrátového modulu na výchylce senzoru vymezující lineární viskoelastickou oblast

Všechny reometrické testy byly měřeny při teplotě vzorku 25 °C, přičemž součástí každého měření byl tzv. „conditioning step“, při kterém byly po určitý čas ponechány ustálit podmínky měření. Pro určení ideální výchylky senzoru při měření byl nejprve změřen tzv. „strain sweep test“ ve kterém byly sledovány závislosti ztrátového a paměťového modulu na výchylce senzoru (**obr. 43**). Byla tak nalezena lineární viskoelastická oblast, z níž byla vybrána vhodná výchylka senzoru pro následná měření. Tato výchylka byla zvolena na 2 %.

Dále byly s touto konstantní výchylkou 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.

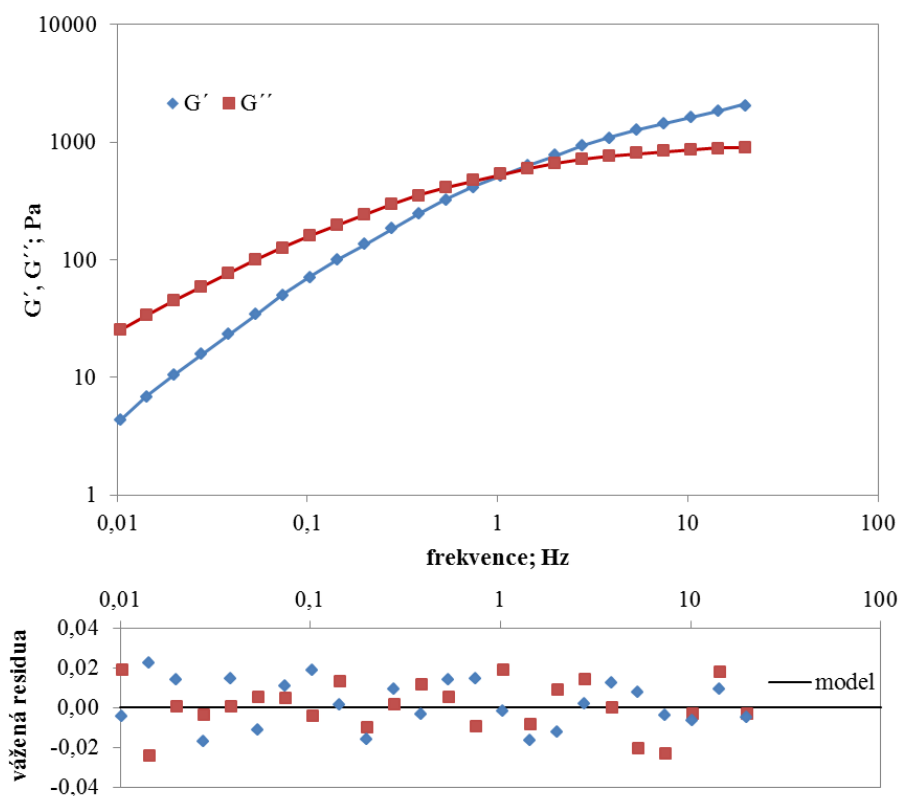
5.3.5.1 Vyhodnocení oscilačních testů

Jednoduchý Maxwellův model pro naměřená data nelze použít, jak je vidět na **obr. 44**, kde jsou znázorněna vybraná naměřená data (Hya 700 kDa 0,5 % hm. a 50 mmol.dm⁻³). Tento model na naměřená data nesedí, což potvrzuje i reziduální analýza, která je součástí obrázku. Závislost residuí na frekvenci v obou případech vykazuje jasný trend, což je vidět i na samotném grafu.



Obr. 44: Závislosti paměťového a ztrátového modulu na frekvenci pro vybraný vzorek a jejich proložení jednoduchým Maxwellovým modelem. Křivky modelu jsou znázorněny plnými čarami v barvě odpovídajících bodů. Ve spodní části grafu uvedena reziduální analýza, kde plná černá čára znázorňuje model.

Pro vyhodnocení oscilačních testů byl tedy použit generalizovaný Maxwellův model. K proložení byl použit MS Excel a byly postupně hodnoceny proložení modely od dvou Maxwellových členů až po deset Maxwellových členů. Podle residuální analýzy byl jako nejvhodnější model pro proložení dat s co nejmenším počtem Maxwellových členů vybrán generalizovaný Maxwellův model s pěti Maxwellovými prvky. Jeho aplikaci na výše uvedená vybraná data znázorňuje **obr. 45**. Jak je vidět na první pohled, pěti prvkový Maxwellův model vyhovuje daleko lépe než jeho jednoduchá varianta. To potvrzuje i reziduální analýza, jejíž body jsou kolem modelu rozmístěny náhodně a navíc oproti jednoduchému modelu jsou hodnoty reziduí o dva řády nižší.



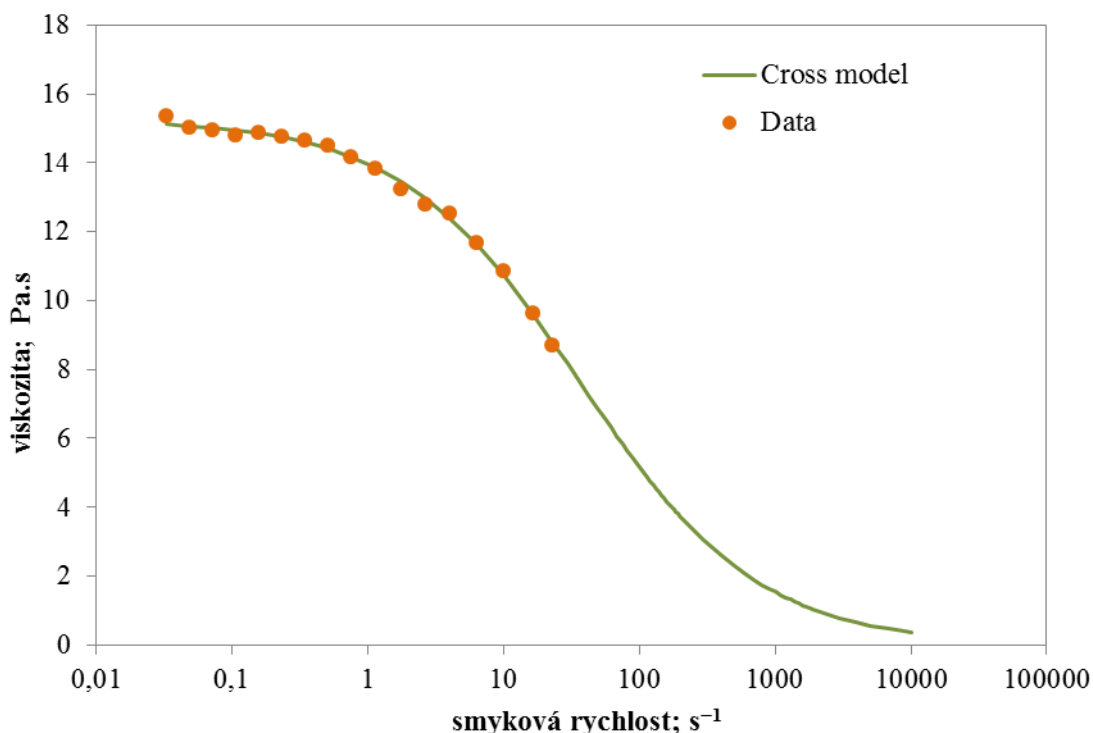
Obr. 45: Závislosti pamětového a ztrátového modulu proloženy generalizovaným Maxwellovým modelem obsahujícím pět Maxwellových elementů. Ve spodní části grafu je uvedena reziduální analýza, kde plná černá čára představuje model.

Z generalizovaného Maxwellova modelu byly vyhodnoceny parametry pro jednotlivé články modelu. Jednalo se o relaxační časy λ_{1-5} a složky jednotlivých modulů G'_{1-5} a G''_{1-5} . Dále byla z naměřených závislostí vyhodnocena poloha tzv. překřížení, tj. bodu kde došlo k protnutí pamětového a ztrátového modulu. V tomto bodě nabývají oba moduly shodné hodnoty. Za pomoci programu TA Data analysis byly zjištěny jak hodnoty polohy na ose x, tj. hodnota frekvence, při které překřížení nastalo, tak konkrétní hodnota obou modulů.

5.3.5.2 Vyhodnocení tokových testů

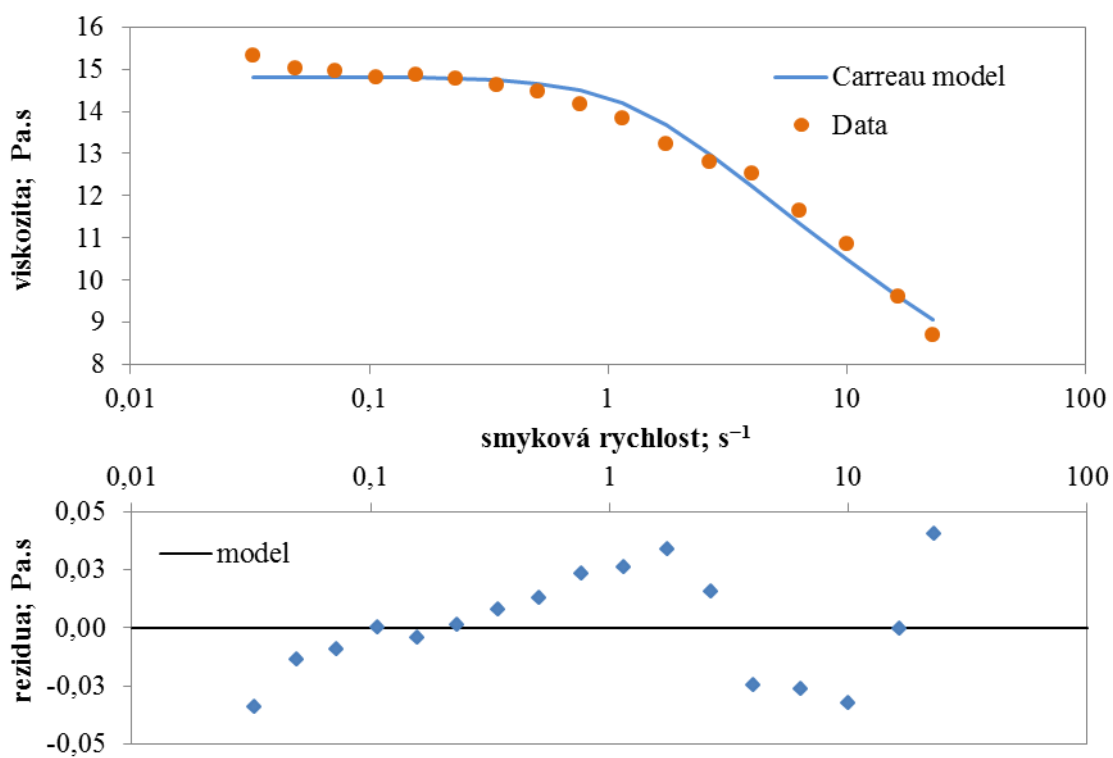
Pro vyhodnocení tokových závislostí, kdy byla vynášena závislost viskozity na smykové rychlosti, bylo voleno mezi dvěma různými modely (Cross a Carreau). Oba tyto modely mají ve shodnosti s teorií viskoelastivity sigmoidní průběh a jsou čtyřparametrické. Oba určují následujícími parametry - limitní viskozitu při nekonečně malé smykové rychlosti η_0 , limitní viskozitu při smykové rychlosti blížíci se k nekonečnu η_∞ , konstantu K , označovanou jako konzistence a uvedenou v sekundách a bezrozměrnou konstantu m označovanou jako rychlostní index. Liší se však v matematickém významu rychlostního indexu, viz kapitola 2.4.4.

Pokud však vezmeme v úvahu sigmoidní charakter obou modelů vyplývající z teorie, pak naměřené tokové křivky ve většině případů nedosahovali až do oblasti, ve které dojde k opětovnému ustálení viskozity a vytvoří se druhá Newtonská oblast, jak ilustruje **obr. 46**. Pro část modelové křivky tedy chybí naměřená data, která by potvrdila shodnost modelu s daným měřením. Tato data však nebyla dostupná, protože při vyšších smykových rychlostech se většina vzorků mechanicky poškodila natolik, že nebylo možné dále sledovat jejich tokové vlastnosti. Z toho důvodu byl z vypočtených parametrů brán největší zřetel na hodnotu η_0 , pro jejíž vypočtení jsou řídící právě hodnoty viskozity naměřené při nižších smykových rychlostech.

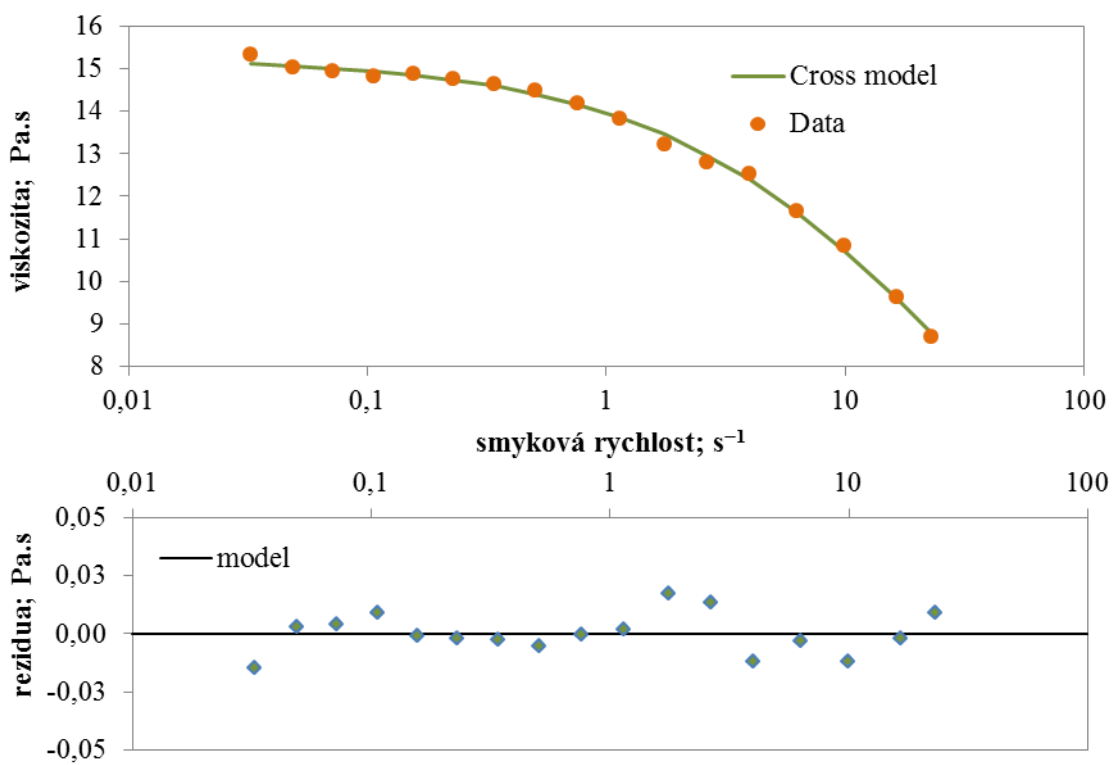


Obr. 46: Dostupná naměřená data proložená Crossovým modelem dosahujícím až k vysokým smykovým rychlostem

Výběr vhodného modelu graficky znázorňují **obr. 47** a **obr. 48**. Na prvním z nich je zobrazeno proložení vybraných dat pomocí modelu Carreau a na druhém je pak použit Crossův model. Jak je vidět z obou proložení a k nim příslušejících reziduálních analýz, Crossův model se pro charakter naměřených dat hodí lépe. Platilo to i u ostatních naměřených dat a proto byl Crossův model použit ke stanovení hodnot η_∞ .



Obr. 47: Proložení dostupných dat pomocí modelu Carreau



Obr. 48: Proložení dostupných data pomocí modelu Cross

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Systémy hyaluronan – tenzid v roztoku

6.1.1 Mapování interakce Hya s různými tensidy

V první fázi výzkumu interakcí hyaluronanu a amfifilních molekul bylo provedeno mapování širší škály tenzidů. Výsledky těchto testů již byly publikovány [127]. 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 tensidy ze třídy zwitterionických betainů a to BETADET THC 2 a cetylbetain. Tyto testy byly provedeny pomocí dvou fluorescenčních sond (pyren a nilská červeně) a to ve fyziologickém roztoku ($0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$).

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.

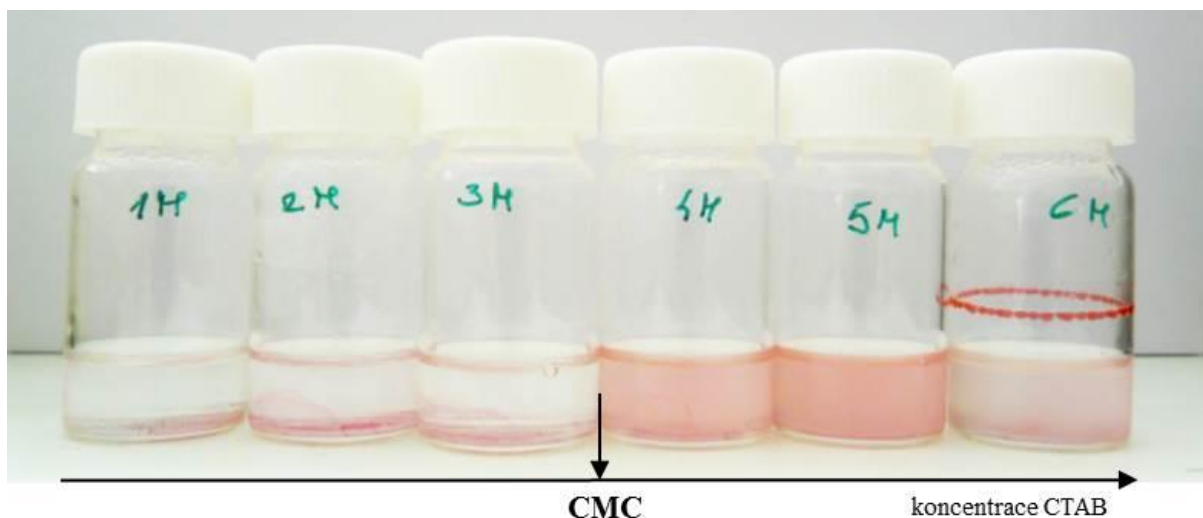
Z výše uvedeného výčtu použitých tenzidů byly největší rozdíly mezi systémem samotného tenzidu a systémem obsahujícím hyaluronan zaznamenány pro neionogenní Tween 20 a kationtový CTAB. V prvním případě byly zaznamenané interakce poněkud překvapující, zvláště s ohledem na neionickou povahu tenzidu a na fakt, že ostatní neionogenní tensidy s hyaluronanem neinteragovaly. Specifické chování Tweenu 20 je pravděpodobně způsobeno jeho strukturou, jeho relativně objemná hlava totiž obsahuje velké množství polárních skupin, které jsou schopny tvořit vodíkové můstky s řetězcem hyaluronanu.

U CTAB byly naopak elektrostatické interakce očekávány. Pyrenová data však poukazují na to, že došlo pouze k nárůstu CMC. Tvar závislosti EmPI na koncentraci se oproti volnému tenzidu nezměnil, což poukazuje na interakce velmi slabé, pravděpodobně z velké části potlačené přítomností nízkomolekulárního elektrolytu. Interakce v tomto systému tak mohou být pouze hydrofobní povahy a to mezi dlouhým alkylovým řetězcem tenzidu a oblastmi řetězce Hya s nízkou polaritou.

Co se týče fluorescenčních dat, porovnání mezi dvěma použitými sondami v jednom systému ukázalo, že výsledky získané pomocí rozdílných sond se mohou lišit. Tyto rozdíly jsou způsobeny lokací sondy v systému, její rozpustností a také specifickými rozdíly v jejich fotofyzikálním chování. Z tohoto hlediska je pyren použitelný pro detekci počátku tvorby agregátů a také přesné vymezení regionu koncentrací, ve kterém tvorba agregátů probíhá. Sledování polohy maxima nilské červeně poskytuje podobné informace, zatímco změny v její integrované intenzitě jsou citlivé spíše na okamžik, kdy už se vytvoří dostatečné množství čistě hydrofobních domén k solubilizaci jejích molekul. Podrobněji jsou výsledky diskutovány v článku v příloze 2.

6.1.2 CTAB

Jak vyplývá z širšího mapování, byl největší důraz kladen na tenzidy kationtové povahy, u nichž se předpokládala nejsilnější interakce s hyaluronanem díky elektrostatickým přitažlivým silám. Během této práce byl pro bližší zkoumání vybrán cetyltrimetylamonium bromid a to s ohledem na předchozí širší mapování. Struktura práce s tímto tenzidem se přizpůsobila prvotnímu experimentu, který jasně rozdělil obory zkoumaných koncentrací, viz **obr. 49**.



Obr. 49: Koncentrační řada tenzidu CTAB v $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$. V řadě od vzorku jedna po vzorek šest roste koncentrace tenzidu. Ve všech vzorcích je pak konstantní koncentrace nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,4 MDa a to 0,1% hm.

Ve vzorcích na **obr. 49** byla sledována rozpustnost hydrofobního barviva Súdánové červeně v závislosti na rostoucí koncentraci tenzidu. V prvních třech vzorcích nedochází k rozpuštění barviva, protože koncentrace tenzidu v těchto vzorcích nedosáhla CMC. Po dosažení této koncentrace pak dochází k rozpuštění hydrofobního barviva, což prokazuje přítomnost hydrofobních domén ve vzorcích čtyři a pět. V šestém vzorku je pak pravděpodobně dosažena koncentrace tenzidu nutná pro nasycení kritického počtu vazných míst na řetězci Hya a dochází v něm k fázovému přechodu a vzniku koncentrované fáze zachycené na skle vialky. Tento fakt je jasným důkazem interakce CTAB s hyaluronanem, protože ve vzorcích bez hyaluronanu k této separaci nedochází. Další informaci nám vzorek šest přináší díky distribuci súdánové červeně. Velká část je totiž zachycena právě v koncentrované fázi, což znamená, že tato fáze obsahuje hydrofobní domény solubilizující ve vodě nerozpustné látky.

Na první pohled jednoduchý experiment měl však klíčovou roli ve strukturalizaci další následné práce. U těchto systémů bylo totiž na jedné straně nutno charakterizovat chování při koncentracích tenzidu blízkých CMC a zjistit zda i vzorky těsně kolem této koncentrace obsahují stabilní agregáty tvořené interakcí hyaluronan-tenzid a pokud ano, tak charakterizovat jejich vlastnosti. Na druhé straně pak za samostatnou pozornost stála také koncentrovaná fáze vznikající ve vzorku šest, její vlastnosti, stabilita a podmínky jejího vzniku.

6.1.3 Interakce při koncentracích blízkých CMC

První část práce směřovaná na bližší charakterizaci průběhu agregace tenzidu spočívala ve zkoumání užšího koncentračního rozmezí kolem kritické micelární koncentrace CTAB. Nejdříve byly tedy stanoveny samotné hodnoty CMC v systémech obsahujících pouze tenzid a to ve vodě a fosfátovém pufru. Obě závislosti EmPI na koncentraci tenzidu měly jednoduchý sigmoidní průběh. CMC byly vypočteny z parametrů Boltzmannova modelu (viz kapitola 5.3.1). Takto stanovené hodnoty kritické micelární koncentrace CTAB byly $0,94 \pm 0,01 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ve vodě a $0,086 \pm 0,004 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ve fosfátovém pufru. CMC v pufru je snížena vlivem stínění elektrostatických repulzí mezi kladně nabitými hlavami tenzidů o jeden řád oproti vodě. Toto chování je u ionogenních tenzidů běžné.

6.1.3.1 Fosfátový pufr

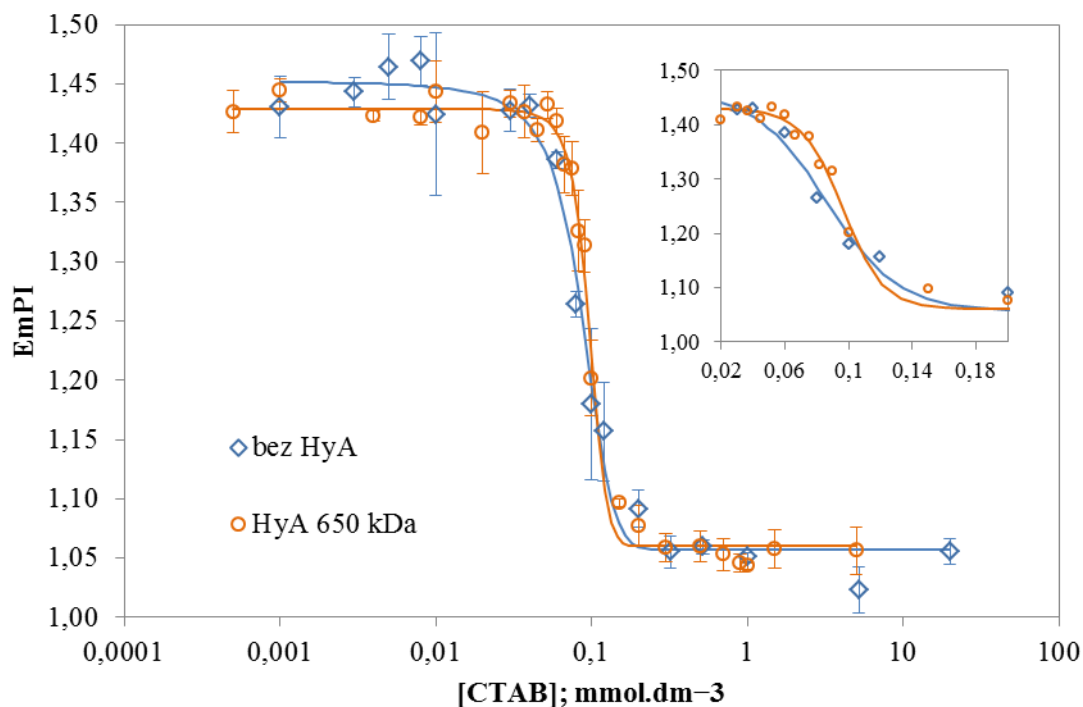
Byl sledován vliv přídavku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (75 kDa, 650 kDa a 1,4 MDa) a konstantní koncentraci 5 mg.dm^{-3} na CMC cetyltrimetylamonium bromidu ve fosfátovém pufru. Všechny takto naměřené závislosti EmPI na koncentraci tenzidu měly jednoduchý sigmoidní tvar a byly proto vyhodnocovány pomocí Boltzmannovy závislosti. Parametry křivek použitých pro proložení těchto závislostí a z nich stanovené CAC pro jednotlivé systémy jsou uvedeny v **tab. 3**.

Tab. 3: Stanovené CAC a parametry modelů naměřených závislostí

	pufr	Hya 75 kDa, 5 mg.dm^{-3}	Hya 650 kDa, 5 mg.dm^{-3}	Hya 1,4 MDa, 5 mg.dm^{-3}
CAC; mmol.dm^{-3}	$0,086 \pm 0,004$	$0,085 \pm 0,001$	$0,096 \pm 0,002$	$0,086 \pm 0,002$
A_1	$1,46 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,01$
A_2	$1,08 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$
Δx	$0,022 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,002$
R^2	0,985	0,994	0,992	0,986

Z hodnot uvedených v tabulce je patrné, že CAC tenzidu se posunuje pouze v případě přídavku Hya 650 kDa a to pouze minimálně k vyšší hodnotě. Hodnoty pro ostatní systémy se v rámci stanovené chyby nemění. Shodnost parametru A_2 vyjadřujícího minimum Boltzmannovy závislosti v sobě nese informaci o podobné polaritě hydrofobních jader a potažmo sktruktuře agregátů vznikajících ve všech zkoumaných systémech. Naopak mírné snížení parametru Δx v řadách s přídavkem hyaluronanu značí mírně strmější průběh agregace oproti samotnému pufru. To je nejlépe patrné na výřezu umístěném v **obr. 50**, ve kterém je zobrazen pouze interval koncentrací, v němž probíhá agregace a není tak zatížen zkreslením logaritmického měřítka.

Obr. 50 zachycuje průběh vybrané závislosti (Hya 650 kDa, 5 mg.dm^{-3}) v porovnání s průběhem závislosti naměřené v systému tenzid-pufr bez přídavku hyaluronanu. Hladkou čarou jsou vyobrazeny příslušné modely. Sigmoidní charakter křivek viditelných na obrázku a vyskytující se i u zbylých dvou molekulových hmotností hyaluronanu naznačuje jednoduchý průběh agregace prokázaný v roztocích tenzidů ve vodě [121].



Obr. 50: Závislost $EmPI$ na koncentraci tenzidu ve fosfátovém pufru bez přidavku hyaluronanu a s přidavkem Hya 650 kDa o konstantní koncentraci 5 mg.dm^{-3} . Ve výřezu vybrána pouze oblast agregace a použito lineární měřítko.

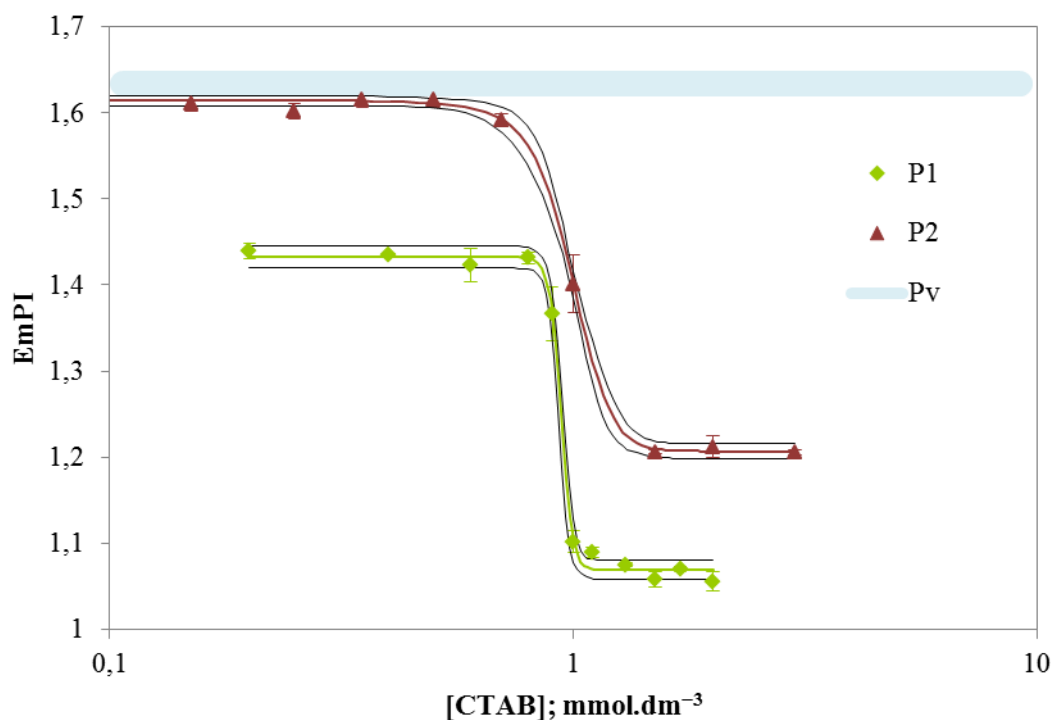
Na výsledky získané zkoumáním agregačního chování CTAB za přítomnosti hyaluronanu v systémech jejichž prostředí tvoří pufr, lze pohlížet dvěma způsoby. Je možné sledovat drobné nuance v průběhu agregace a hodnotit zda je změna v CAC u Hya 650 kDa významná či ne. Druhý pohled je obecnější. Z tohoto pohledu mají i přes drobné rozdíly všechna data stejný sigmoidní trend, nedochází k významným změnám tohoto trendu, nedochází k žádným výrazným například řádovým změnám v CAC a neliší se ani maxima a minima, kterých křivky dosahují. Z tohoto pohledu nedochází v systémech, jejichž prostředím je pufr, k interakci mezi hyaluronanem a cetyltrimetylamonium bromidem, která by ovlivnila agregaci CTAB. Silnější elektrostatické interakce je v tomto případě bráněno pravděpodobně právě pufrem, jehož iontová síla stíní jak repulzní tak přitažlivé interakce.

6.1.3.2 Voda

Pro další zkoumání byly proto použity vodné roztoky, u kterých bylo předpokládáno, že případné elektrostatické interakce nebudou stíněny. Pro tato měření byl použit hyaluronan o třech molekulových hmotnostech (90 kDa, 750 kDa a 2 MDa) a to v koncentraci 15 mg.dm^{-3} . Dále byl použit hyaluronan s jednotnou molekulovou hmotností 750 kDa v různých následujících koncentracích: již zmíněná 15 mg.dm^{-3} , 5 mg.dm^{-3} , 30 mg.dm^{-3} , 50 mg.dm^{-3} , 100 mg.dm^{-3} . Mimo sledování samotného agregačního chování ve vzorcích, byl hodnocen také vliv koncentrace fluorescenční sondy na tyto systémy a doplňkově byla měřena vodivost a pH.

CTAB ve vodě

Jako základ pro další práci bylo třeba charakterizovat chování samotného CTAB ve vodě. Výsledky jsou zobrazeny na **obr. 51** a to pro dvě koncentrační řady CTAB ve vodě měřené s různou koncentrací fluorescenční sondy. Jak je vidět nejen z **obr. 51**, ale také z následující **tab. 4**, shrnující parametry získané měřením koncentrace sondy ovlivňuje jak tvar křivek, tak potažmo některé parametry Boltzmannova modelu.



Obr. 51: Závislosti $EmPI$ na koncentraci CTAB ve vodě naměřené s různou koncentrací pyrenu. Křivka P1 odpovídá koncentraci pyrenu $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, křivka P2 odpovídá koncentraci pyrenu $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Oblast Pv odpovídá možným hodnotám $EmPI$ pyrenu v nasyceném vodném roztoku ($1,63 \pm 0,02$). Hladkou barevnou čarou je zobrazeno proložení přímek a hladkými černými čarami je zobrazen interval spolehlivosti jednotlivých dat.

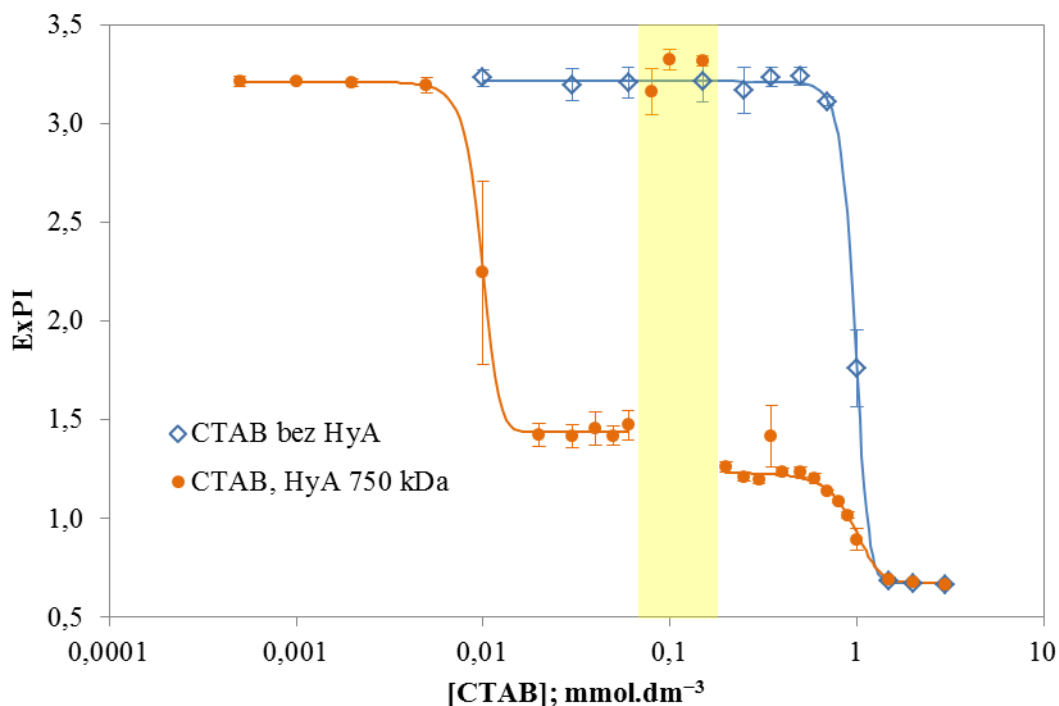
Strmější klesání křivky a tím pádem i nižší hodnota Δx pro použitou vyšší koncentraci pyrenu naznačuje, že větší obsah hydrofobní sondy podporuje agregaci a agregáty jsou pak vytvořeny v kratším koncentračním intervalu, kdežto nižší obsah sondy méně zkresluje samotný průběh agregace. Dalšími lišícími se parametry jsou limity Boltzmannova modelu, které jsou s vyšší koncentrací pyrenu posunuty k nižším hodnotám $EmPI$. Hlavním důvodem tohoto posunu je pravděpodobně rozdělení molekul sondy mezi polární a nepolární prostředí. Molekula pyrenu je obecně brána jako hydrofobní, ale i přesto je schopna se v nízkých koncentracích rozpustit i ve vodě (nasycený roztok pyrenu ve vodě má koncentraci $6,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [128]). V grafu je proto jako světle modrá oblast zobrazen interval hodnot, ve kterých se nachází $EmPI$ pro nasycený vodný roztok pyrenu.

Tab. 4: Shrnutí parametrů Boltzmannových modelů pro CTAB ve vodě při obou použitých koncentracích pyrenu

	[pyren]; $10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$	[pyren]; $10^{-7} \text{ mol.dm}^{-3}$
CMC; mmol.dm^{-3}	$0,94 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,1$
A_1	$1,43 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,01$
A_2	$1,07 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,01$
Δx	$0,026 \pm 0,003$	$0,101 \pm 0,012$
R^2	0,996	0,999

Z tabulky i z grafu je pak vidět, že parametrem, který je koncentrací sondy nejméně ovlivněn, je CMC, jejíž hodnoty se liší jen minimálně. Co se tedy týče polohy zlomů v koncentračních souřadnicích, zde jsou výsledky srovnatelné. I tak je při obecnějším hodnocení použité metody třeba mít na paměti, že zde dochází k ovlivňování systému, ať už použijeme jakoukoli koncentraci sondy a také, že průběhy křivek a jejich limity naměřené s různými koncentracemi hydrofobní fluorescenční sondy lze srovnávat a hodnotit jen s vědomím tohoto ovlivnění.

Vliv koncentrace Hya na agregaci CTAB ve vodě



Obr. 52: Vliv přidavku hyaluronanu (750 kDa, 5 mg. dm^{-3}) na agregaci chování CTAB ve vodě. Žlutě je vyznačena oblast fázové separace.

Na **obr. 52** je zobrazen vliv přidavku Hya 750 kDa o konstantní koncentraci 5 mg. dm^{-3} na agregaci chování CTAB ve vodě. V tomto případě byl použit pyren o koncentraci $10^{-7} \text{ mol.dm}^{-3}$, 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.

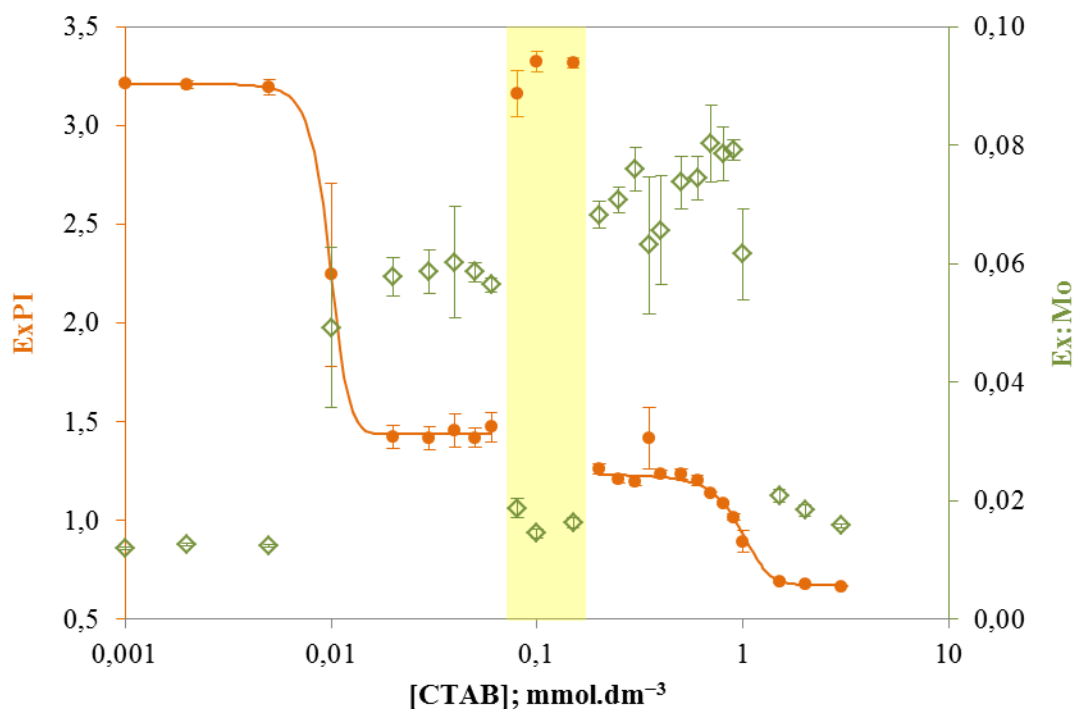
Vlivem přídavku hyaluronanu pak dochází na závislosti ke zlomu, který je o dva řády posunut k nižším hodnotám koncentrace tenzidu oproti závislosti ve vodě. Tento zlom charakterizuje tzv. indukovanou agregaci tenzidu (viz kapitola 2.2.1). Díky elektrostatickému vázání kladně nabitě hlavy tenzidu na záporně 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.

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.

Výsledky získané měřením polaritry pak potvrzují také změny dalšího parametru, jak je vidět na **obr. 53**. Jedná se o poměr intenzity excimeru k monomeru pyrenu (Ex:Mo). Jak je vidět k nárůstu parametru Ex:Mo dochází při poklesu EmPI v oblasti kritické agregační koncentrace. Poté co EmPI klesá a tvoří lokální plató, Ex:Mo neklesá k původním hodnotám před agregací, tak jak by tomu bylo u agregace samotného tenzidu, ale jeho hodnota se ještě mírně zvýší a ustálí se v rozmezí koncentrací od CAC do fázové separace ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $0,06 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Toto chování je v rozporu s průběhem jednoduché agregace.

Ve vzorcích totiž v tomto oboru koncentrací množství CTAB stále stoupá, mělo by tedy dojít k rovnoměrnějšímu rozdělení pyrenu do přibývajících micel, i když se jedná o micely vázané na řetězci. Vysvětlením tohoto chování může být právě velikost micel. Micely indukované polyiontem a vázané na jeho kostře mají totiž nižší agregační číslo a jsou menší oproti volným micelám. Dochází tedy k tomu, že díky menšímu hydrofobnímu jádru, které poskytuje vázaná micela se pravděpodobnost vzniku excimeru opět zvýší. V tomto případě tedy hodnoty Ex:Mo vypovídají o vlastnostech vázaných micel, jejichž jádro je menší než u běžných micel [13], zůstává však fluidní a dovoluje tak přiblížení dvou molekul pyrenu a tvorbu excimeru během doby života excitovaného stavu fluorescenční sondy.

Snížené hodnoty Ex:Mo v oblasti fázové separace jsou signálem molekul pyrenu zbylých v prostředí supernatantu, které nejsou solubilizovány uvnitř žádného hydrofobního jádra a v tomto prostředí je tedy tvorba excimeru nepravděpodobná.



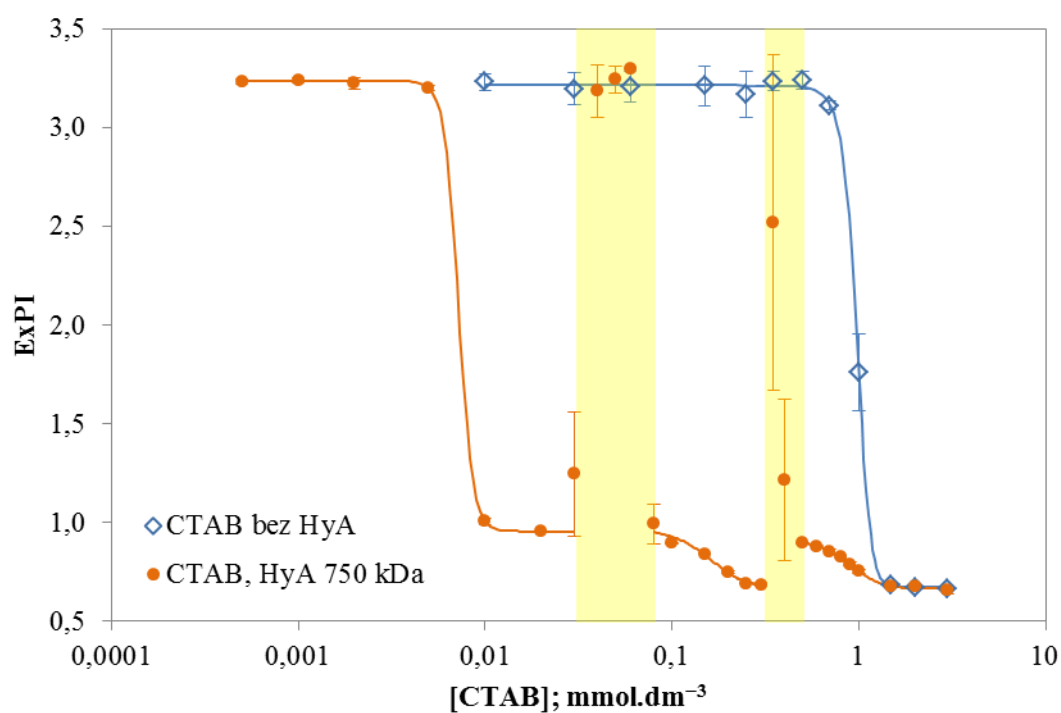
Obr. 53: Porovnání závislostí ExPI a Ex:Mo pro vzorky s přidavkem Hya 750 kDa o koncentraci 5 mg. dm^{-3}

Při koncentracích vyšších než je hranice fázové separace poměr Ex:Mo opět narůstá. Jak je vidět v oblasti do koncentrace 1 mmol. dm^{-3} pak hodnota kolísá a zvětšují se i chybové úsečky což značí neustálenost systému až do chvíle, kdy dojde ke tvorbě volných micel, pyren je rovnoměrněji rozdělen mezi větší počet hydrofobních jader a signál excimeru vymizí. Toto chování odpovídá výkladu vázání tenzidu na polyion, který prezentuje **Radeva T.** [13]. Jak uvidíme dále, situace pro vyšší koncentraci hyaluronanu, je však složitější.

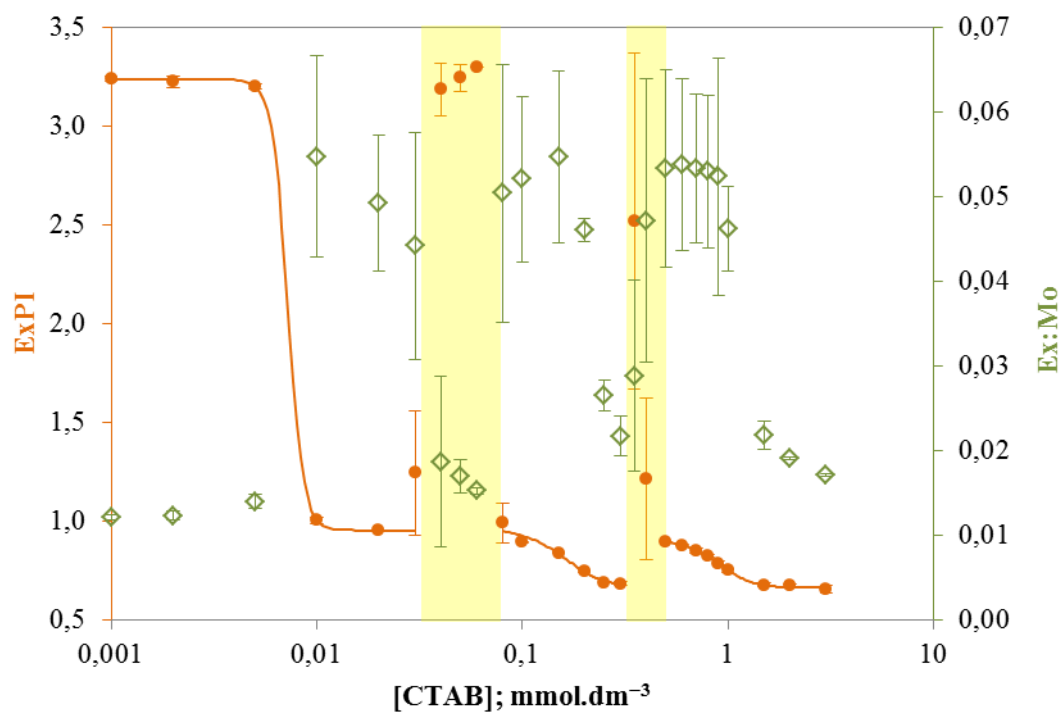
Obrázek 54 a 55 ilustruje situaci s použitím vyšší koncentrace (15 mg. dm^{-3}) Hya o stejné molekulové hmotnosti 750 kDa. Jak je vidět na první pohled, v obou grafech jsou vidět dvě oblasti fázové separace, což je hlavním rozdílem oproti předchozím vzorkům s nižší koncentrací Hya. Oblasti fázové separace jsou v grafech vyznačeny žlutě, první z nich je v rozmezí koncentrací CTAB od $0,04$ do $0,06 \text{ mmol. dm}^{-3}$ a druhá od $0,35$ do $0,4 \text{ mmol. dm}^{-3}$.

Z hlediska ExPI a Ex:Mo je počátek závislosti až do první fázové separace analogický s koncentrací Hya 5 mg. dm^{-3} , opět se zde nachází první zlom charakterizující CAC a to na obou zmíněných závislostech. Jediným rozdílem oproti nižší koncentraci jsou hodnoty, ke kterým klesá ExPI a současně stoupá Ex:Mo. Tato hodnota je v případě ExPI výrazně nižší, což značí buď tvorbu vázaných micel s nižší polaritou, nebo vytvoření většího množství micel s podobnou hodnotou polarity. V každém případě k první fázové separaci při použití vyšší koncentrace hyaluronanu, 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. To potvrzuje i nárůst parametru Ex:Mo k vyšším hodnotám v oblasti koncentrací tenzidu od $0,01$ do $0,03 \text{ mmol. dm}^{-3}$.



Obr. 54: Vliv přidavku hyaluronanu (750 kDa, 15 mg. dm^{-3}) na agregační chování CTAB ve vodě. Žlutě jsou vyznačeny oblasti fázové separace.



Obr. 55: Porovnání závislostí ExPI a Ex:Mo pro vzorky s přidavkem Hya 750 kDa o koncentraci 15 mg. dm^{-3}

V první oblasti fázové separace odpovídají oba parametry signálu zbytkového pyrenu z vodného prostředí. Za horní hranici fázové separace pak dochází k dalšímu poklesu ExPI a to až k jeho hodnotám typickým pro volné micely samotného tenzidu. Při koncentraci CTAB $0,35 \text{ mmol.dm}^{-3}$ dochází znovu k fázové separaci a na skleněné stěně vialky je opět pozorovatelná čirá gelovitá usazenina. Hodnoty sledovaných parametrů se však nechovají stejně jako při první fázové separaci. ExPI neroste až k vodným hodnotám a chybové úsečky mají příliš velký rozsah. Ani hodnoty Ex:Mo neklesají k tak nízkým hodnotám jako při první fázové separaci.

To vše naznačuje, že systém je v těchto koncentracích velmi variabilní a také nestabilní. Naměřené hodnoty ukazují, že v tomto případě podléhá fázové separaci pouze část systému a v supernatantu stále zůstává určitá část agregátů obsahujících hydrofobní domény a výsledné hodnoty parametrů jsou pak směsí signálů z vodného a hydrofobního prostředí. Jak je vidět na chybových úsečkách parametrů při opakování měření přechází na gelovou fázi rozdílné množství systému. Pokud se podíváme na **obr. 55** na závislost ExPI pro Hya 750 kDa o koncentraci 5 mg. dm^{-3} i zde je jedna koncentrace tenzidu ($0,35 \text{ mmol.dm}^{-3}$) při které hodnota ExPI ani v rámci chybové úsečky nepatří do trendu ostatních bodů, také zde dochází k mírnému zvýšení hodnoty ExPI. I přes to, že tvorba gelové usazeniny zde není viditelná, dochází pravděpodobně ve vzorku k částečné fázové separaci také, ale na gel přechází jen malá část systému a ten tak není pozorovatelný.

Při koncentraci Hya 15 mg. dm^{-3} (**obr. 54, 55**) se od koncentrace tenzidu $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$ už gelová fáze neobjevuje a hodnota ExPI těsně za touto hranicí odpovídá hodnotě na spodním ramenu sigmoidní křivky charakterizující CAC. Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu pak dochází k opětovnému poklesu ExPI a to až k hodnotám odpovídajícím volným micelám. Při těchto hodnotách ExPI v systému pravděpodobně převládají právě volné micely nad micelami indukovanými a vázanými na řetězci hyaluronanu.

Pro ostatní použité koncentrace hyaluronanu (Hya 750 kDa) 30 mg. dm^{-3} , 50 mg. dm^{-3} a 100 mg. dm^{-3} tvar všech naměřených závislostí (EmPI, ExPI a Ex:Mo) odpovídá průběhu křivek pro koncentraci 15 mg. dm^{-3} . U všech těchto závislostí se také vyskytují dvě oblasti fázové separace, jediné v čem se data naměřená pro různé koncentrace hyaluronanu liší, jsou koncentrační oblasti, ve kterých se fázové separace nachází.

Tyto oblasti přehledně shrnuje **tabulka 5**. V ní jsou uvedeny vypočtené teoretické hodnoty parametru P/T, který dává do poměru počet vazných míst na polymeru vyjádřených koncentrací karboxylových skupin a počet molekul tenzidu. Červené hodnoty v tabulce pak odpovídají oblastem, ve kterých proběhla fázová separace, modrou čarou jsou pak odděleny vždy dvě koncentrace vzorků, mezi kterými se nachází kritická agregační koncentrace. Jak je vidět poměr P/T, nebo spíše jeho teoretická hodnota, není řídicím parametrem ani pro kritickou agregační koncentraci ani pro fázové separace. Situace v reálném vzorku však může být odlišná, protože měnící se koncentrace hyaluronanu, bude mít vliv na konformaci polymeru v roztoku a je tak možné, že ne všechny disociované karboxylové skupiny budou přístupné pro interakci s molekulami tenzidu.

Tab. 5: Tabulka uvádějící poměr P/T pro jednotlivé vzorky. Modrou čarou rozděleny koncentrace vzorků, mezi kterými byla stanovena CAC. Červené uvedeny hodnoty pro fázově separované vzorky.

[CTAB]; mmol.dm ⁻³	P/T				
	[Hya]; 5 mg.dm ⁻³	[Hya]; 15 mg.dm ⁻³	[Hya]; 30 mg.dm ⁻³	[Hya]; 50 mg.dm ⁻³	[Hya]; 100 mg.dm ⁻³
0,0005	25	75	150	249	500
0,001	12	37	75	125	250
0,002	6	19	37	62	125
0,005	2	7,5	15	25	50
0,01	1,25	3,7	7,5	12	25
0,02	0,62	1,9	3,7	6	12
0,03	0,42	1,2	2,5	4	8
0,04	0,31	0,9	1,9	3	6
0,05	0,25	0,7	1,5	2,5	5
0,06	0,21	0,6	1,2	2,0	4
0,08	0,16	0,47	0,9	1,6	3
0,1	0,12	0,37	0,7	1,2	2,5
0,15	0,08	0,25	0,5	0,8	1,7
0,2	0,06	0,19	0,4	0,6	1,2
0,25	0,05	0,15	0,3	0,5	1,0
0,3	0,042	0,12	0,25	0,41	0,8
0,35	0,036	0,11	0,21	0,35	0,7
0,4	0,031	0,09	0,19	0,31	0,6
0,5	0,025	0,07	0,15	0,25	0,5
0,6	0,021	0,06	0,12	0,21	0,42
0,7	0,017	0,05	0,10	0,18	0,35
0,8	0,016	0,047	0,09	0,16	0,31
0,9	0,014	0,042	0,08	0,14	0,28
1	0,013	0,037	0,07	0,12	0,25
1,5	0,008	0,025	0,05	0,08	0,17
2	0,006	0,019	0,04	0,06	0,12
3	0,004	0,012	0,02	0,04	0,08

Jak je vidět z **tab. 5**, CAC se nachází u všech vzorků zhruba při stejné koncentraci tenzidu, což se však u první fázové separace říci nedá. Ta se pro koncentraci Hya 5 mg.dm^{-3} nachází v rozmezí koncentrací od $0,08$ do $0,15 \text{ mmol.dm}^{-3}$, kdežto pro vyšší koncentraci 15 mg.dm^{-3} probíhá již při nižších koncentracích tenzidu ($0,04$ až $0,06 \text{ mmol.dm}^{-3}$). Při dalším nárůstu koncentrace hyaluronanu (30 a 50 mg.dm^{-3}) se fázová separace posunuje opět k vyšším hodnotám. Při nejvyšší použité koncentraci Hya 100 mg.dm^{-3} je první fázová separace mezi koncentracemi tenzidu $0,08$ až $0,1 \text{ mmol.dm}^{-3}$, což je opětovný posun k nižším hodnotám. Hodnoty P/T při první fázové separaci se pohybují v podobném rozmezí pouze u koncentrací Hya 15 , 30 a 50 mg.dm^{-3} , pro koncentraci Hya 5 mg.dm^{-3} jsou nižší a pro koncentraci Hya 100 mg.dm^{-3} jsou naopak vyšší. Různá koncentrační rozmezí první fázové separace a částečná nesourodost poměru P/T v těchto rozmezích je pravděpodobně způsobena tím, že v tomto oboru koncentrací se na řetězec vážou indukované micely, jejichž velikost a vlastnosti se u každého systému liší.

Co se týče druhé fázové separace, tato naopak začíná vždy při stejné koncentraci tenzidu $0,35 \text{ mmol.dm}^{-3}$. Zvýšení ExPI při této koncentraci tenzidu ve vzorcích s obsahem Hya 5 mg.dm^{-3} je bráno také jako fázová separace, i když vznik gelové sraženiny není okem viditelný. Při této koncentraci hyaluronanu dochází k tvorbě koncentrované fáze pouze při jediné koncentraci, ale se vzrůstajícím množstvím hyaluronanu se obor koncentrací, ve kterých se fázová separace nachází, rozšiřuje. Také množství usazené gelové fáze se zvětšuje. Při koncentraci CTAB $0,35 \text{ mmol.dm}^{-3}$ se tedy vyskytuje hranice, při které začíná být systém v roztoku opět nestabilní a kolabuje.

V **tab. 6** pak vidíme další shrnutí parametrů pro měření s různými koncentracemi hyaluronanu. Jedná se hlavně o maxima a minima Boltzmannových modelů odpovídajících prvnímu zlomu na křivkách (charakterizace CAC) a poslednímu zlomu na křivkách (charakterizace vzniku volných micel). Porovnávány jsou parametry závislosti ExPI na koncentraci tenzidu. Jak je z tabulky patrné závislosti začínají vždy na hodnotách ExPI okolo $3,2$, což také odpovídá hodnotě parametru pro vodné prostředí. V roztocích tedy v počátečních vzorcích nejsou vytvořeny žádné agregáty obsahující hydrofobní jádro.

Nad kritickou agregační koncentrací dojde k vytvoření vázaných indukovaných micel. O polaritě jejich jádra vypovídá parametr A_2 pro zlom CAC. Ten se s rostoucí koncentrací hyaluronanu snižuje, přičemž největší snížení je vidět, při zvýšení koncentrace hyaluronanu z 5 mg.dm^{-3} na 15 mg.dm^{-3} , při dalším zvyšování koncentrace hyaluronanu dochází už pouze k menšímu snížení polaritě jader, přičemž při dvou nejvyšších koncentracích hyaluronanu se v rámci chyby jedná o snížení parametru pouze o jednu setinu, což je vzhledem ke složitosti a dynamice systému, snížení zanedbatelné. Důležitou informací však je, že koncentrace hyaluronanu má vliv na vlastnosti vázaných micel, jejichž struktura se pravděpodobně vlivem rostoucí koncentrace Hya a tím pádem měnících se vlastností polymerního roztoku, liší.

Maximum Boltzmannova modelu (A_1) pro zlom charakterizující CMC vypovídá o vlastnostech systému před proběhnutím tvorby volných micel. Tento parametr se napříč rostoucími koncentracemi hyaluronanu mění, ale tyto změny nemají jednotný trend. Co se ale neliší je parametr A_2 , který ve všech případech odpovídá hodnotám naměřeným pro volné micely CTAB ve vodě. Ve všech koncentračních řadách tak po dosažení určité koncentrace tenzidu dojde také vzniku volných micel a jejich množství nakonec převáží nad micelami indukovanými.

Tab. 6: Shrnutí některých parametrů Boltzmannova modelu pro sérii měření s různými koncentracemi hyaluronanu (Hya 750 kDa)

		zlom CAC	zlom CMC
[Hya]; 5 mg.dm ⁻³	A ₁	3,21 ± 0,01	1,24 ± 0,01
	A ₂	1,44 ± 0,01	0,67 ± 0,01
	R ²	0,999	0,998
[Hya]; 15 mg.dm ⁻³	A ₁	3,23 ± 0,01	1,00 ± 0,03
	A ₂	0,96 ± 0,01	0,68 ± 0,03
	R ²	1,000	0,942
[Hya]; 30 mg.dm ⁻³	A ₁	3,26 ± 0,03	1,32 ± 0,35
	A ₂	0,92 ± 0,01	0,66 ± 0,01
	R ²	0,999	0,990
[Hya]; 50 mg.dm ⁻³	A ₁	3,34 ± 0,08	0,79 ± 0,03
	A ₂	0,84 ± 0,01	0,65 ± 0,01
	R ²	0,998	0,989
[Hya]; 100 mg.dm ⁻³	A ₁	3,24 ± 0,02	0,79 ± 0,03
	A ₂	0,82 ± 0,01	0,65 ± 0,02
	R ²	1,000	0,991

Vliv molekulové hmotnosti Hya na agregaci CTAB ve vodě

Dále byl sledován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na agregační chování CTAB ve vodě. Byly připraveny koncentrační řady s konstantní koncentrací Hya 15 mg.dm⁻³ o různých molekulových hmotnostech (90 kDa, 750 kDa a 2 MDa). Výsledky pro kombinaci Hya 750 kDa a 15 mg.dm⁻³ jsou již shrnuty výše (**viz obr. 54 a 55, tab 5 a 6**). Při použití hyaluronanu o jiné molekulové hmotnosti, nedojde v průběhu agregace k žádným změnám, křivky všech měřených parametrů mají naprosto stejný průběh, což podtrhuje i fakt, že Boltzmannovy modely použité pro proložení těchto křivek u všech použitých molekulových hmotností mají téměř identické parametry.

Vliv Hya na agregaci CTAB - shrnutí

Závěrem této kapitoly je uvedena přehledová **tab. 7** 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 molekulové hmotnosti hyaluronanu v rámci chyby nemění. Molekulová hmotnost tedy na chování systému nemá vliv. Pokud budeme sledovat změny CAC s rostoucí koncentrací hyaluronanu, 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 složitěho systému je podobnost hodnot zarážející a vede k domněnce, že řídicím faktorem v agregaci CTAB je právě koncentrace samotného tenzidu a že přídavek hyaluronanu sice způsobuje indukovanou tvorbu vázaných micel, ale kdy se tyto micely vytvoří, záleží čistě na koncentraci tenzidu.

Tab. 7: 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

6.1.3.3 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.

Ustálený systém

V ustáleném systému se po aplikaci FLCS filtru vyskytovala pouze jedna doba života rhodaminu vázaného na hyaluronanu, která se pohybovala okolo 3,9 ns. To znamená, že fluorofor vázaný na hyaluronanu se v daném vzorku vyskytuje pouze v jednom prostředí. V tomto případě se jedná o vodné prostředí vzorku. Pro vyhodnocení autokorelační křivky pro tuto dobu života byl použit model „Triplet extended 3D“.

Jak je vidět z **tabulky 8** u většiny vzorků se pak vyskytoval také pouze jeden difúzní čas ($\tau_{\text{Dif}} 1$), avšak u některých vzorků byly nalezen také druhý difúzní čas ($\tau_{\text{Dif}} 2$). I v těchto případech byl však druhý difúzní čas minoritní a této frakce fluoroforů se ve vzorku vyskytovalo maximálně 18 %. $\tau_{\text{Dif}} 2$ pak pro koncentrace tenzidu 0,03 a 0,3 mmol.dm⁻³ dosahuje poměrně vysokých hodnot, což znamená pomalou difúzi velkých částic a také hodnoty α_2 charakterizující druh difúze výrazně překračují jednotkovou hodnotu.

To by ukazovalo na aktivně podpořenou difúzi těchto velkých částic. Tento typ difúze je nejčastěji zastoupen při aktivním buněčném transportu, v našem vzorku pak může být způsoben například sedimentací. Je možné, že tento signál pochází z fázově separovaných mikročástic gelové fáze (viz kapitola 6.1.3.2).

τ_{Dif} 2 při koncentraci CTAB $0,09 \text{ mmol.dm}^{-3}$ naopak ani nedosahuje hodnoty τ_{Dif} 1 pro tento vzorek a také hodnota α_2 ukazuje na prostou difúzi. V tomto vzorku se pravděpodobně vyskytují dvě srovnatelné velikosti částic tvořené různě velkými agregáty hyaluronanu a CTAB. Za povšimnutí stojí také fakt, že koeficienty α_1 pro majoritní difúzní časy ukazují v celém koncentračním rozmezí tenzidu na prostou difúzi.

Tab. 8: Shrnutí parametrů získaných pomocí analýzy FCS kroskorelace pro molekuly rhodaminu s dobou života 3,9 ns v ustálených vzorcích

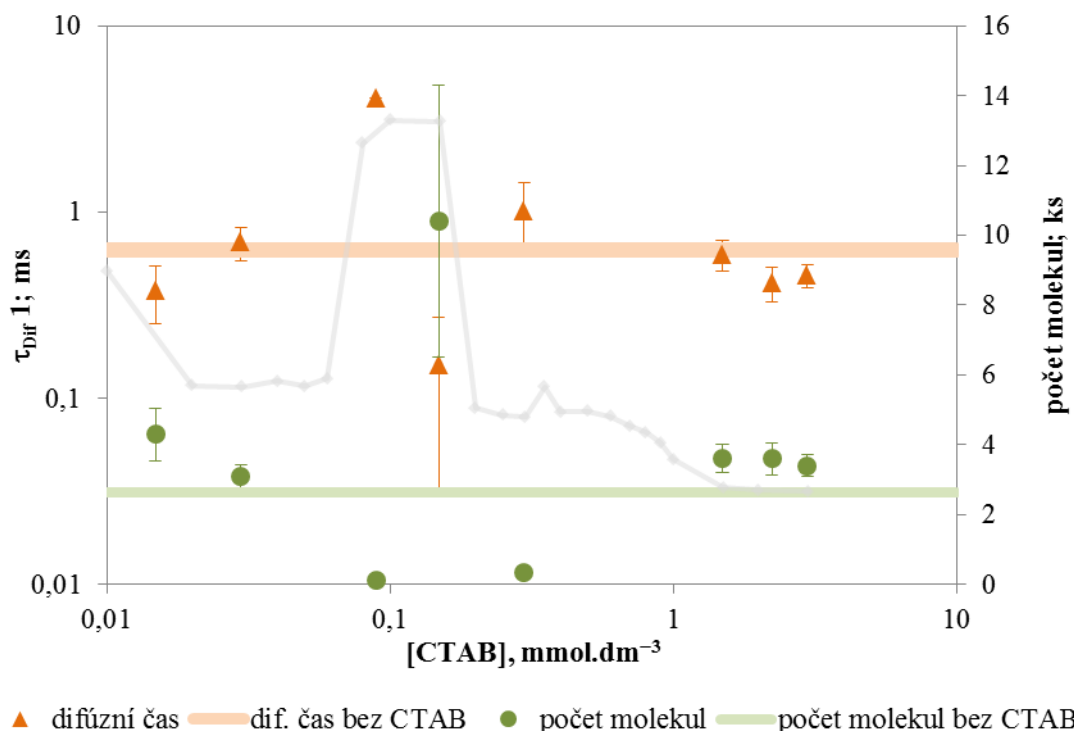
[CTAB]; mmol.dm^{-3}	τ_{Dif} 1; ms	ρ_1 ; %	α_1	τ_{Dif} 2; ms	ρ_2 ; %	α_2	N; ks
0,00	$0,6 \pm 0,1$	100	$1,00 \pm 0,02$				$2,63 \pm 0,12$
0,01	$0,4 \pm 0,1$	100	$0,99 \pm 0,12$				$4,30 \pm 0,75$
0,03	$0,7 \pm 0,1$	91	$1,06 \pm 0,11$	$27,6 \pm 1,3$	9	$3,9 \pm 0,3$	$3,09 \pm 0,34$
0,09	$4,1 \pm 0,1$	82	$1,09 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,1$	18	$1,0 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$
0,15	$0,2 \pm 0,1$	100	$1,01 \pm 0,24$				$10,40 \pm 3,90$
0,30	$1,0 \pm 0,4$	83	$1,10 \pm 0,28$	$53,3 \pm 7,1$	17	$3,4 \pm 0,8$	$0,33 \pm 0,03$
1,49	$0,6 \pm 0,1$	100	$1,07 \pm 0,05$				$3,60 \pm 0,40$
2,23	$0,4 \pm 0,1$	100	$0,99 \pm 0,05$				$3,61 \pm 0,46$
2,97	$0,5 \pm 0,1$	100	$0,99 \pm 0,19$				$3,40 \pm 0,30$

Graficky jsou získané parametry znázorněny na **obr. 56**. Jedná se o závislost majoritního difúzního času a počtu molekul v konfokálním objemu na koncentraci CTAB. V pozadí je také zobrazena závislost ExPI pro vzorek obsahující nativní hyaluronan 750 kDa, 5 mg.dm^{-3} a to kvůli hrubému vymezení různých koncentračních regionů ve vzorku. Koncentrace hyaluronanu v něm sice není stejná, ale pro základní orientaci postačí, zvláště pokud vezmeme v úvahu předchozí výsledky naznačující, že polohu zlomů na křivce a také fázové separace řídí právě koncentrace tenzidu.

Jak je vidět z obrázku po prvním přídavku hyaluronanu dochází k odchýlení obou hodnot od počáteční hranice dané vzorkem bez CTAB, difúzní čas se snižuje a počet molekul v pozorovaném objemu se zvýší, při následném přídavku se obě hodnoty opět vrací k původní hranici. V tomto regionu jsou fluktuace pravděpodobně způsobeny navázáním jednotlivých molekul tenzidu na kostru hyaluronanu, přičemž tenzidy vázané v monomerní formě pravděpodobně difúzi poměrově mnohem většího řetězce polymeru neovlivní natolik, aby došlo k výraznějším změnám.

Naopak prudká změna při koncentraci CTAB $0,09 \text{ mmol.dm}^{-3}$ naznačuje hranu fázové separace. To by potvrzoval hlavně fakt, že z pozorovaného objemu téměř vymizí částice a ty zbylé mají poměrně vysoký difúzní čas, což by naznačovalo velké objemné částice reprezentované buď frakcí stále rozpuštěných agregátů, nebo už fázově separovaných mikročástic. Celkově region koncentrací tenzidu od 0,09 do 0,3 mmol.dm^{-3} vykazuje velmi dynamické chování s ohledem na prudké změny a chybové úsečky některých bodů. Zde se pravděpodobně nacházíme právě v metastabilním stavu (**Dongcui L. a spol.** [67]), charakterizovaným velkou citlivostí systému na vnější změny. V tomto případě musíme pak

uvažovat i vliv měření. Tím, že v systému excitujeme molekuly fluoroforu laserem, pravděpodobně způsobujeme také lokální změny teploty, na které takto citlivý systém bude reagovat. Paradoxně zde tedy určité koncentrační rozmezí vymezuje právě rozkolísanost systému.



Obr. 56: Závislost majoritního difúzního času (doba života rhodaminu 3,9 ns) a počtu molekul v pozorovaném objemu na koncentraci CTAB v ustáleném systému. Plné čáry znázorňují oblast hodnot pro rhHya bez obsahu CTAB. Šedou barvou v pozadí naznačena závislost ExPI na koncentraci CTAB naměřená pomocí pyrenu pro vzorek s obsahem nativního Hya 750 kDa, 5 mg. dm⁻³, tato závislost je uvedena pro hrubé srovnání.

Při třech nejvyšších koncentracích CTAB ve vzorcích pak dochází k ustálení hodnot na obou závislostech. Tyto koncentrace už leží za kritickou micelární koncentrací samotného tenzidu. V tomto regionu je tedy nutno počítat s tvorbou volných micel. Pravděpodobně díky velkému přebytku tenzidu zde dochází k vytvoření rovnováhy mezi tenzidy vázanými na kostře polymeru a ve volných micelách. Systém pak obsahuje pravděpodobně směs rozpustných agregátů rhHya–CTAB (**Liu Z. a spol.** [66]) a volných micel. Přídavky tenzidu jsou v tomto regionu spotřebovány spíše na tvorbu volných micel a agregáty tenzidu s Hya tak nejsou nadále výrazně ovlivňovány.

Neustálený systém

V neustáleném systému se po aplikaci FLCS filtru na naměřená data objevila jedna koncentrace tenzidu (0,3 mmol.dm⁻³) při které bylo možno vykreslit smysluplnou autokorelační křivku pro obě dvě naměřené doby života fluoroforu (3,9 ns a 1,3 ns). To znamená, že ve vzorku se objevily dva druhy difúze náležející pravděpodobně rhodaminovanému hyaluronanu ve dvou různých prostředích. Tyto dvě doby života byly naměřeny i u jiných vzorků, avšak po aplikaci FLCS filtru nebyla patrná při kratší době života žádná kroskorelace. Hodnoty parametrů pro neustálený systém jsou uvedeny v **tab. 9**.

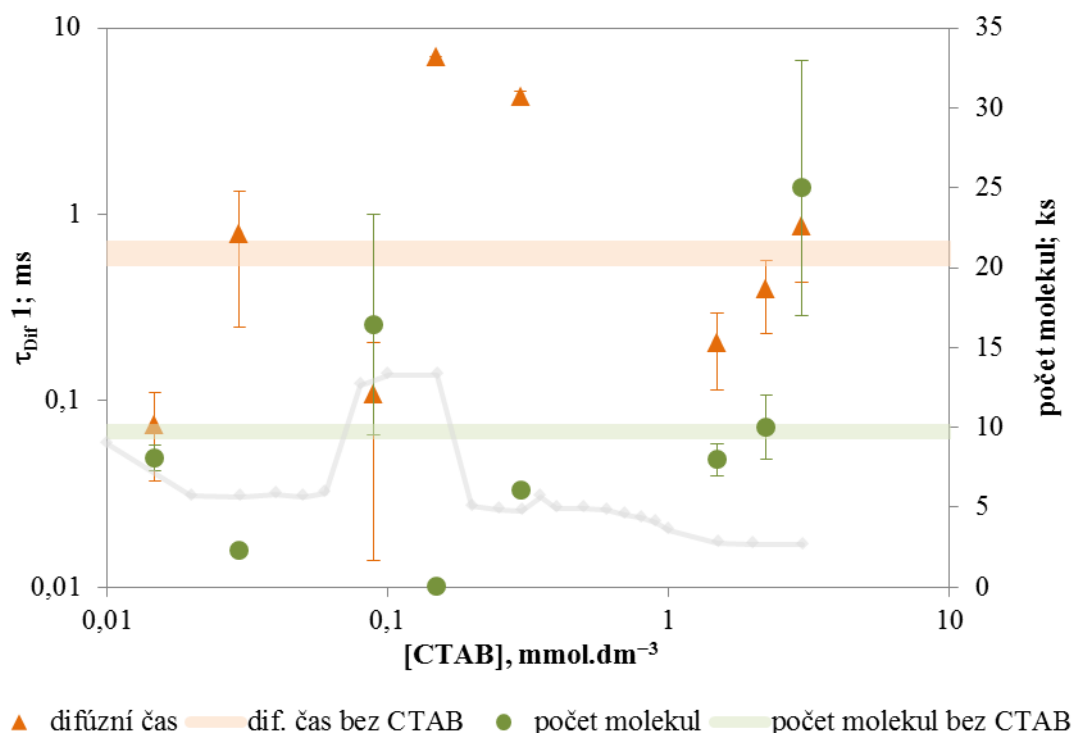
Tab. 9: Shrnutí parametrů získaných pomocí analýzy FCS kroskorelace pro molekuly rhodaminu s dobou života 3,9 ns a při koncentraci CTAB 0,3 mmol.dm⁻³ při obou zjištěných dobách života

[CTAB]; mmol.dm ⁻³	$\tau_{\text{Dif 1}}$; ms	ρ_1 ; %	α_1	$\tau_{\text{Dif 2}}$; ms	ρ_2 ; %	α_2	N; ks
0,00	0,6 ± 0,1	73	1,21 ± 0,34	6,2 ± 1,5	27	1,21 ± 0,12	9,73 ± 0,66
0,01	0,07 ± 0,04	50	1,03 ± 0,36	1,4 ± 0,3	50	1,03 ± 0,07	8,10 ± 0,78
0,03	0,8 ± 0,5	87	1,04 ± 0,21	36 ± 32	13	1,00 ± 0,90	2,30 ± 0,09
0,09	0,11 ± 0,10	94	1,00 ± 0,50	437 ± 180	6	1,00 ± 0,01	16,4 ± 6,9
0,15	7,0 ± 0,1	100	1,00 ± 0,02				0,10 ± 0,01
0,30 (3,9 ns)	4,3 ± 0,3	100	1,00 ± 0,20				6,05 ± 0,35
0,30 (1,3 ns)	3,5 ± 0,4	100	0,90 ± 0,06				0,011 ± 0,005
1,49	0,2 ± 0,1	82	0,94 ± 0,14	3,0 ± 1,8	18	1,04 ± 0,19	8,00 ± 1,00
2,23	0,4 ± 0,2	100	0,80 ± 0,08				10,00 ± 2,00
2,97	0,9 ± 0,4	100	0,71 ± 0,10				25,00 ± 8,00

Jak je vidět z výše uvedené **tab. 9** v případě neustáleného systému byly získané parametry značně rozkolísané. V některých vzorcích byly opět stanoveny dva difúzní časy a při koncentraci 0,01 mmol.dm⁻³ tvořili částice charakterizované $\tau_{\text{Dif 2}}$ dokonce 50 % frakci všech měřených částic. Dva difúzní časy zjištěné u velkého počtu vzorků a také hodnoty druhého difúzního času lišící se v širokém rozmezí od jednotek až po stovky milisekund ukazují právě na velkou dynamiku a různorodost, tak jak u neustálených vzorků lze předpokládat. V systémech se nachází částice různé velikosti, tak jak probíhá vázání tenzidu na hyaluronan. Koeficient α však nikde nevykazuje hodnotu výrazně vyšší než jedna, v těchto systémech tedy není aktivně podporovaná difúze. Právě naopak, v případě tří nejvyšších koncentrací CTAB dochází k poklesu α_1 pod jednotku, což by znamenalo difúzi bržděnou, například prostředím.

Jak již bylo zmíněno na začátku podkapitoly, výjimku zde tvořila koncentrace CTAB 0,3 mmol.dm⁻³, při níž byla nalezena kroskorelace pro dvě doby života. Pro každou z nich byl však určen jediný difúzní čas. Rhodamin se v tomto vzorku zřejmě nachází ve dvou typech agregátů, které z hlediska difúzního času mají srovnatelnou velikost, avšak samotná molekula fluoroforu se v nich nachází v odlišném prostředí. V tomto případě je možné, že díky probíhajícím konformačním změnám a neustálenosti systému zde v agregátu charakterizovaném kratší dobou života interaguje CTAB přímo s molekulou rhodaminu. Tato interakce díky kladnému náboji tenzidu ovlivňuje delokalizovaný systém elektronů na rhodaminu a mění tak jeho dobu života.

Závislosti získaných parametrů lze vidět na **obr. 57**. Jak je vidět hodnoty kolísají až do koncentrace 1,5 mmol.dm⁻³, kdy oba parametry nad CMC volného tenzidu rostou. V tomto regionu se tedy s přibývajícím CTAB prodlužuje majoritní difúzní čas a roste počet částic v detekčním objemu. To může být způsobeno změnou konformace polymeru, kdy vznikají větší částice s delším difúzním časem a zároveň je díky sbalení polymeru s navázanými molekulami fluoroforu v detekčním objemu přítomno více molekul tohoto fluoroforu.



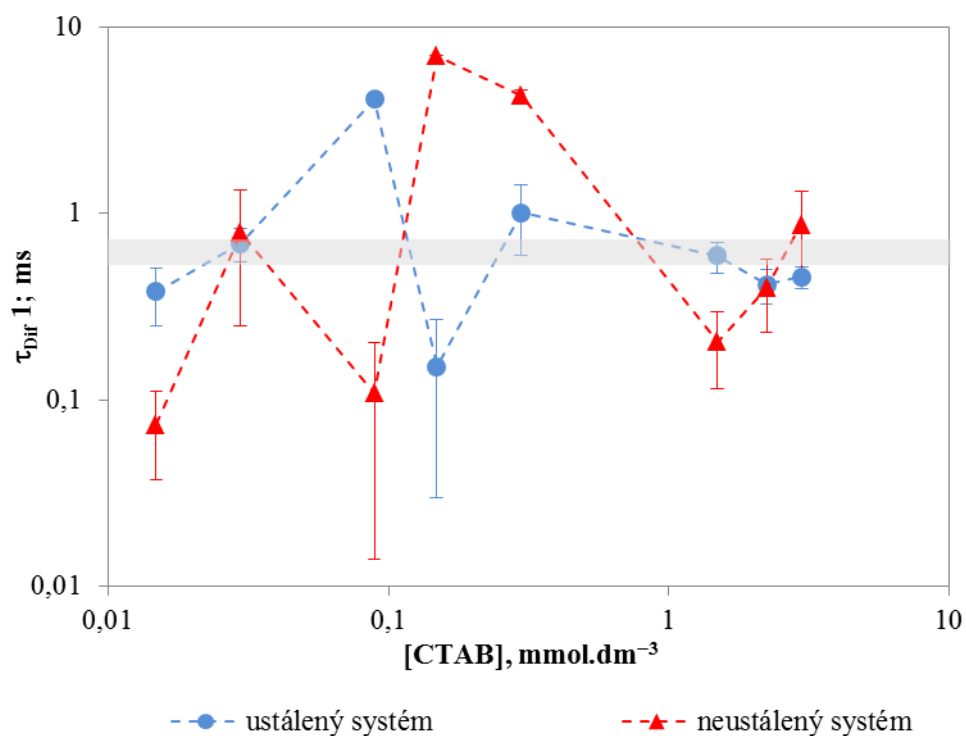
Obr. 57: Závislost majoritního difúzního času (doba života Rhodaminu 3,9 ns) a počtu molekul v pozorovaném objemu na koncentraci CTAB v neustáleném systému. Plné čáry znázorňují oblast hodnot pro rhHya bez obsahu CTAB. Šedou barvou v pozadí naznačena závislost ExPI na koncentraci CTAB naměřená pomocí pyrenu pro vzorek s obsahem nativního Hya 750 kDa, 5 mg. dm⁻³, tato závislost je uvedena pro hrubé srovnání.

Srovnání ustáleného a neustáleného systému

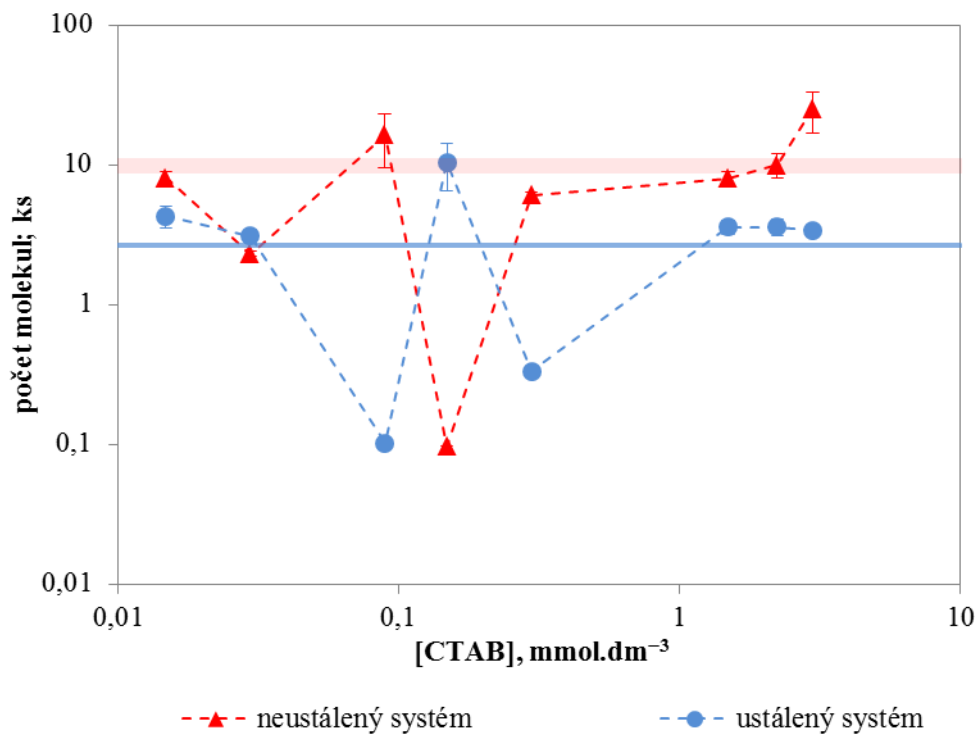
Při srovnávání systémů v obou stavech poslouží **obr. 58** a **59**. První jmenovaný porovnává závislosti difúzního času pro oba stavy. Šedou oblastí je zde vyznačeno rozmezí hodnot, kterých může v rámci chyby nabývat difúzní čas pro rhHya bez přídavku CTAB. Jak je vidět pokles hodnoty v neustáleném 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.

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, jak je vidět na obou obrázcích. Toto chování a 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.



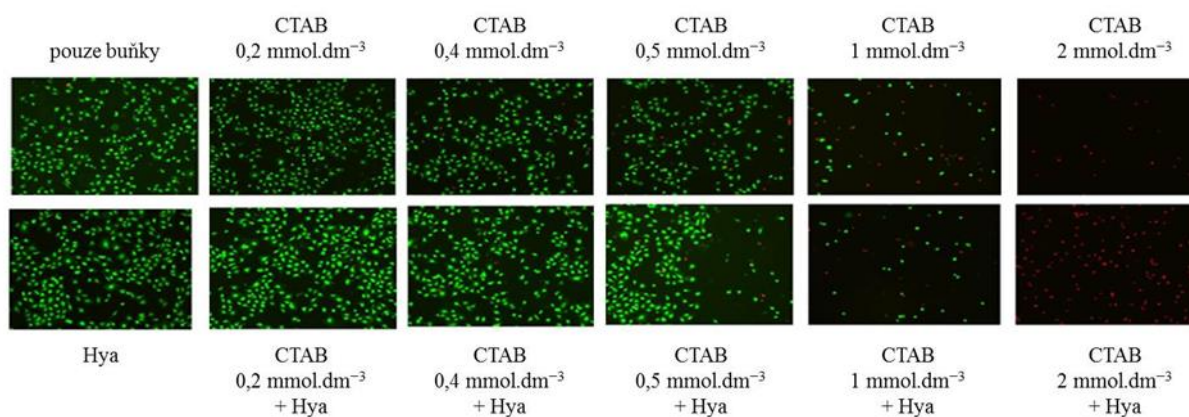
Obr. 58: Srovnání hodnot majoritních difúzních časů v ustáleném a neustáleném systému. Šedá oblast znázorňuje rozmezí hodnot, ve kterém se pohybuje difúzní čas rhHya bez přidavku CTAB a platí pro obě závislosti.



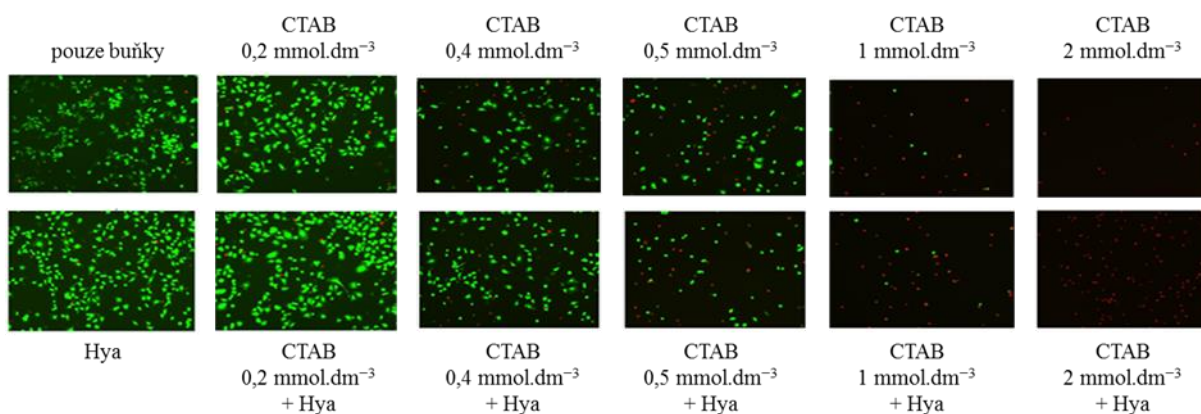
Obr. 59: Srovnání hodnot počtu molekul v konfokálním objemu v ustáleném a neustáleném systému. Příslušná ke křivce barevně odpovídající oblast pak vyjadřuje rozmezí, ve kterém se pohybuje hodnota N pro rhHya bez obsahu CTAB.

6.1.3.4 Testy na buňkách

Byly provedeny prvotní pilotní testy cytotoxicity systémů obsahujících hyaluronan a CTAB ve vodě. Jako blank byly použity roztoky CTAB o příslušné koncentraci, ale bez přídavku hyaluronanu. Jako kontrola byl použit samotný hyaluronan. Ve všech vzorcích byla jeho koncentrace konstantní ($0,1\%$ hm., Hya 806 kDa), kdežto koncentrace tenzidu se měnila v rozmezí od $0,2\text{ mmol.dm}^{-3}$ do 2 mmol.dm^{-3} . K hodnocení viability buněk byly použity LIVE/DEAD® test a CellTiter 96® tzv. MTS test. Podrobná zpráva je uvedena v příloze 1.



Obr. 60: Výsledky testu Live/Dead 5 hod po přidavku vzorků (četnost buněk 20000 b./cm^2).



Obr. 60: Výsledky testu Live/Dead 24 hod po přidavku vzorků (četnost buněk 20000 b./cm^2).

Z výsledků je jasné patrné, že koncentrace CTAB 2 mmol.dm^{-3} je pro buňky cytotoxická. Při této koncentraci totiž oba testy vykazují už po pěti hodinách téměř 100 % mrtvých buněk a to jak v přítomnosti, tak bez přítomnosti hyaluronanu. Naopak po 5 hod ani po 24 hod není pro buňky toxická koncentrace tenzidu o řád nižší. Při koncentraci $0,4\text{ mmol.dm}^{-3}$ není cytotoxicita po 4 hod znatelná, ale po 24 hod už se mírně projevuje. Tento efekt je shodný i s vyššími koncentracemi tenzidu ($0,5\text{ mmol.dm}^{-3}$ a 1 mmol.dm^{-3}), kdy je po 24 hod úmrtnost buněk vyšší než po 4 hod.

Výsledky obou dvou použitých četností buněk si odpovídají a čistý hyaluronan vykazuje stejné hodnoty jako samotné buňky, které sloužili jako pozitivní kontrola. Z toho plyne, že hyaluronan toxický není, jak bylo i předpokládáno a že úmrtnost buněk způsobuje právě CTAB. Faktem ale zůstává, že výsledky testů se nelišili pro vzorky s obsahem a bez obsahu

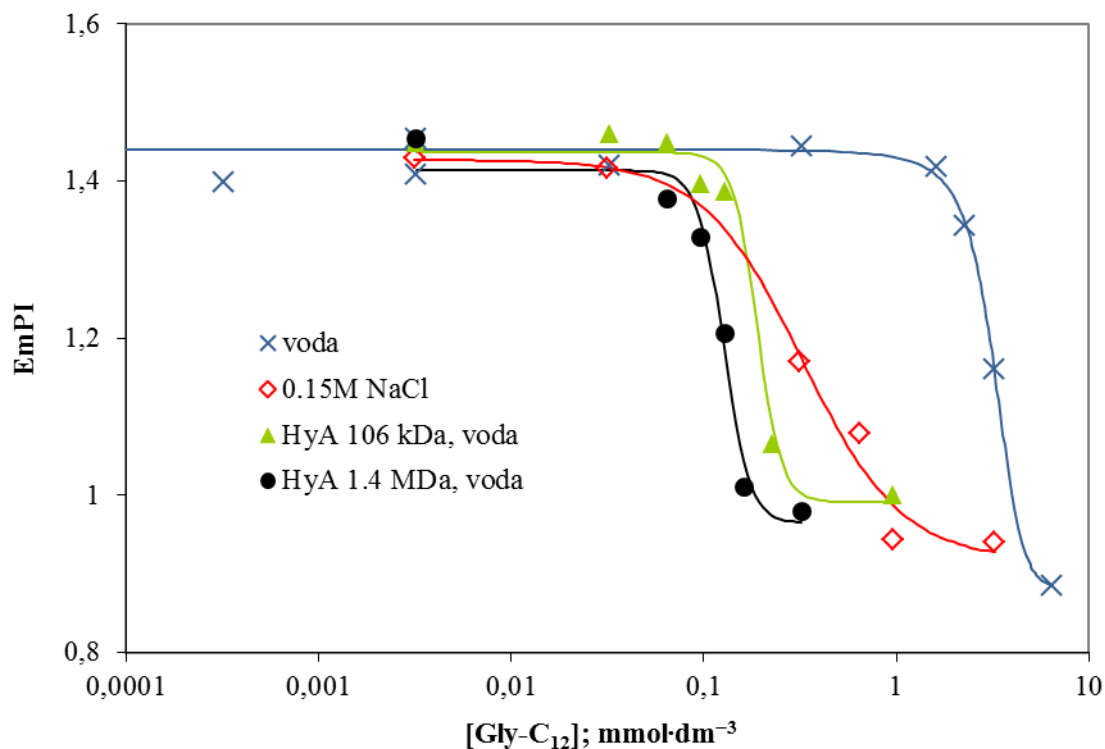
hyaluronanu. Hyaluronan tedy cytotoxicitu tenzidu nijak neovlivňuje. Původně bylo očekáváno její snížení s přidavkem hyaluronanu z toho důvodu, že u agregátů vázaných na tenzid bude jejich cytotoxicita částečně potlačena. Důvodem získaných výsledků může být fakt, že po přidavku vzorku k buňkám dochází nevyhnutelně k jeho zředění a to navíc buněčným médiem, které je směsí sloučenin s různorodými vlastnostmi. Je tedy možné, že po přidavku vzorku došlo například vlivem iontové síly roztoku k rozpadu agregátů hyaluronan-tenzid. Tuto teorii je však nutno dodatečně ověřit. Na druhou stranu důvod může být také mnohem prostší a to je fakt, že hyaluronan neovlivňuje cytotoxicitu vázaných agregátů. Z toho důvodu je nutno podrobit systémy v této oblasti dalšímu zkoumání.

6.1.4 Hydrofobně modifikované aminokyseliny

Jako alternativa prostých tenzidů byly použity hydrofobně modifikované aminokyseliny. Jednalo se o dodecylserin (Ser- C_{12}), dodecylglycin (Gly- C_{12}), didecylglutamovou kyselinu (Glu- C_{10}) a dioktylasparagovou kyselinu (Asp- C_8). Výsledky těchto testů již byly publikovány [129] a struktury použitých látek jsou zobrazeny v článku v příloze 3. Všechny tyto hydrofobně modifikované aminokyseliny mají alkylové řetězce navázány přes karboxylovou skupinu. První dvě zmíněné obsahují pouze jeden hydrofobní řetězec o délce dvanácti uhlíků na jedné základní molekule aminokyseliny. U druhých dvou jsou pak na základní aminoskupinu navázány dva hydrofobní řetězce. V případě glutamové kyseliny jde o řetězce s deseti uhlíkovými atomy a v případě asparagové kyseliny jde o řetězce skládající se z osmi uhlíků. Struktura posledních dvou jmenovaných je pak podobná spíše fosfolipidům. Aminokyseliny byly vybrány tak, aby ve svojí struktuře obsahovaly amoniiovou skupinu zajišťující kladný náboj a potažmo přitažlivé elektrostatické interakce se záporně nabitými skupinami na řetězci hyaluronanu.

Při těchto experimentech byl použit nativní hyaluronan o dvou molekulových hmotnostech 1,4 MDa a 106 kDa. Interakce byly sledovány ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 mol.dm⁻³ roztoku NaCl. Koncentrace hyaluronanu (1 g.dm⁻³) byla ve vzorcích konstantní. Pro ilustraci je na **obr. 62** uveden vybraný graf, znázorňující závislost polaritního parametru na koncentraci dodecylglycinu. Jak je vidět na obrázku mají všechny závislosti tvar jednoduché sigmoidní křivky. Ani u měření s ostatními hydrofobně modifikovanými aminokyselinami nedocházelo ke změně základního tvaru průběhu křivky, tak jako tomu bylo například ve vzorcích s CTAB ve fosfátovém pufru viz kapitola 6.1.3.1.

Na **obr. 62** je vidět pouze posun zlomu charakterizujícího CMC k nižším hodnotám koncentrace Glu- C_{12} oproti vodě, a to jak ve vzorcích s 0,15 M NaCl, tak za přítomnosti hyaluronanu v obou použitých molekulových hmotnostech. V tomto případě lze říci, že vliv přidavku hyaluronanu se podobá vlivu zvýšení iontové síly přidavkem jednoduchého polyelektrolytu. S ohledem na nezměněný tvar křivek a na fakt, že v žádném ze vzorků nedocházelo k fázové separaci, lze usuzovat na to, že interakce mezi Glu- C_{12} a hyaluronanem jsou slabší než v případě CTAB. To v podstatě platilo i pro ostatní hAMK, jak uvidíme dále.



Obr. 62: Závislost E_{mPI} na koncentraci dodecylglycinu ve vodě, v $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl bez hyaluronanu a s přidavkem hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech.

Kompletní výsledky jsou podrobněji rozebrány v článku v příloze 3. Shrnutí výsledků ilustruje **tab. 10** obsahující kritické micelární koncentrace stanovené pomocí změn dvou polaritních paramterů. Jak je z této tabulky vidět, k nejvýraznějším změnám po přidavku hyaluronanu 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 hyaluronanu s různou molekulovou hmotností, kdy vysokomolekulární Hya snižuje CMC nepatrně více než nízkomolekulární. Pokud jde o hAMK s jedním řetězcem v $0,15 \text{ M NaCl}$, zde se pak vliv přidavku hyaluronanu 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 hydrofobitě dvou desetihlíkatých 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 přidavku hyaluronanu k mírnému zvýšení CMC, což je opačný trend než u jednořetězcových AMK. 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.

Jak je tedy vidět z výsledků, hydrofobně modifikované aminokyseliny 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.

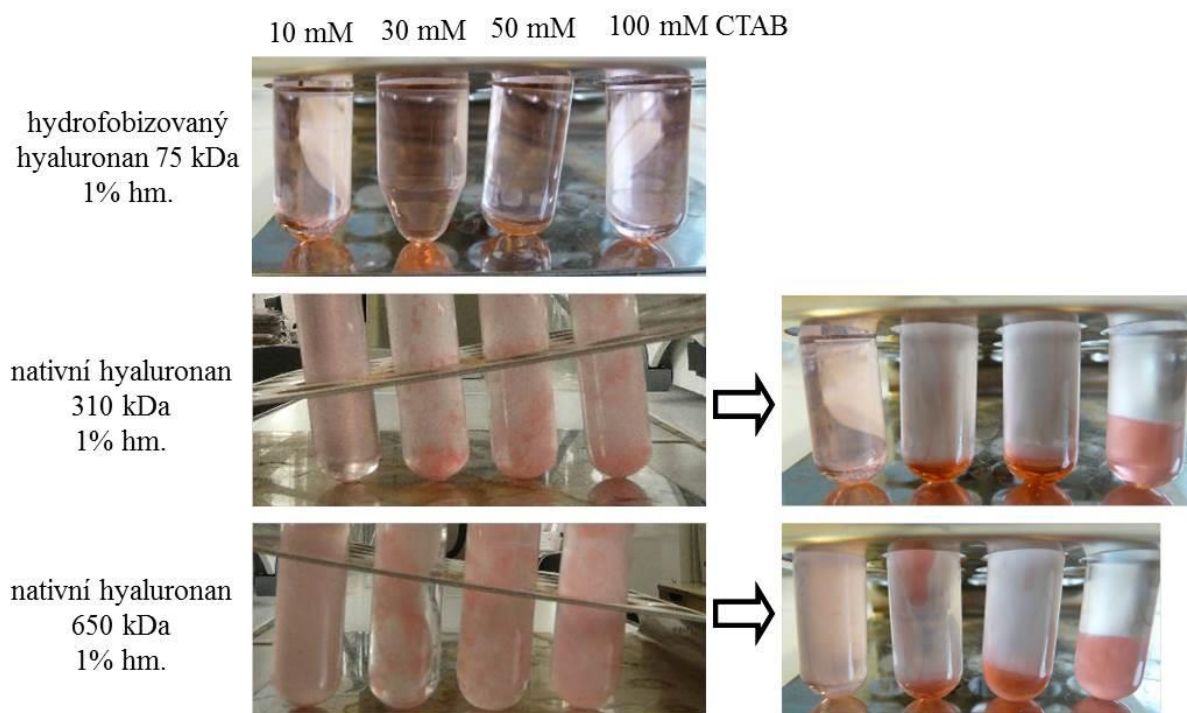
Tab. 10: Hodnoty CMC pro systém hydrofobně modifikovaných aminokyselin s přidavkem a bez přidavku hyaluronanu ve dvou prostředích – ve vodě a v 0,15 M NaCl. Koncentrace hyaluronanu byla 0,1% hm. Hodnoty pro Glu-C₁₀ nejsou uvedeny, protože v případě této hAMK nebylo až do limitu jeho rozpustnosti CMC dosaženo.

hAMK		stanovená CMC (mmol.dm ⁻³)					
		voda	Hya 106 kDa, voda	Hya 1,36 MDa, voda	0,15 M NaCl	Hya 106 kDa, 0,15 M NaCl	Hya 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

6.2 Gelové systémy hyaluronan – tenzid

6.2.1 Prvotní charakterizace

Jak je uvedeno v kapitole 6.1.2 ve vzorcích obsahujících systémy hyaluronanu a CTAB v roztoku 0,15 M NaCl byla zjištěna tvorba gelové fáze. Tato se tvořila od dané hraniční koncentrace tenzidu. Tyto gelové fáze byly poté připravovány cíleně a provedena sada experimentů, jejichž výsledky měly přinést povšechnou představu o vlastnostech a chování těchto koncentrovaných fází.



Obr. 63: Tvorba gelu a jeho vizualizace súdánovou červení

Na **obr. 63** můžeme vidět vzorky s rostoucí koncentrací tenzidu v řadě, přičemž bylo použito jak hydrofobně modifikovaného hyaluronanu, tak nativního hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech. Koncentrace hyaluronanu byla ve všech vzorcích konstantní a to 1% hm. V levém sloupci pak můžeme vidět vzorky ihned po smíchání a protřepání na vortexu, kdy je zřejmé, že vzniká sraženina, která je zřetelně více barevná než zbylý roztok. V pravém sloupci můžeme vidět vzorky po 24 hodinovém stání při laboratorních podmínkách. Jak je patrné na těchto fotkách, sraženina vzniklá po smíchání mění svoje vlastnosti a přechází na gelovitou fázi, která v sobě navíc uzavřela většinu hydrofobního barviva. Bylo zjištěno, že rychlost přechodu sraženiny na gel je závislá na koncentraci komponent. Čím vyšší je koncentrace tenzidu i hyaluronanu, tím rychleji přechází sraženina na gel.

Obrázek ilustruje, že při použití hydrofobně modifikovaného hyaluronanu k fázovému přechodu nedochází a to i za předpokladu, že hydrofobní interakce zastoupené zakomponováním hydrofobního řetězce navázaného na hyaluronanu do jádra micely by měly posílit elektrostatickou interakci mezi kladným kvarterním dusíkem CTAB a záporně nabitou disociovanou karboxylovou skupinou na řetězci hyaluronanu. Tyto elektrostatické interakce jsou podstatou vázání tenzidu na polyelektrolyt. K fázové přeměně ve zmíněném systému

nedochází pravděpodobně z důvodu nízké molekulové hmotnosti řetězce hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Při použití nativního hyaluronanu s vyšší molekulovou hmotností již k fázové změně dochází. Ve vzorcích Hya 310 kDa a Hya 650 kDa je s rostoucí koncentrací tenzidu patrné rostoucí množství gelové fáze. Již na první pohled je také patrné, že u gelových fází s různým složením se mění reologické vlastnosti, které jsou ovlivněny molekulovou hmotností hyaluronanu, protože gel Hya 650 kDa je na pohled tužší a pomaleji teče.

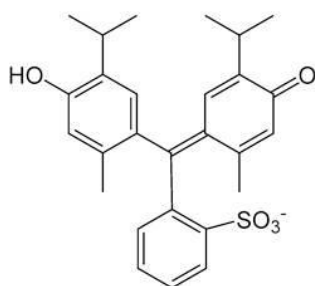
Důležitým faktem zjištěným při těchto pokusech je, že gelové fáze jsou během vzniku schopny inkorporovat hydrofobní látku, což v sobě nese důkaz o existenci hydrofobních domén uvnitř gelu. Ty jsou tvořeny uvnitř gelu zachycenými agregáty tenzidu, které zároveň slouží k fyzikálnímu síťování. Schopnost inkorporovat hydrofobní látku je jedna z důležitých podmínek pro nosičový systém. V souvislosti s cílem použít tyto systémy jako nosičové byly provedeny následující zkoumání s cílem zjistit jejich další vlastnosti. Jednalo se hlavně o stabilitu gelu, a zda ji inkorporovaná látka ovlivňuje, fyzikální vlastnosti gelu, zda v něm probíhají difúzní procesy a zda je hydrofobní látka schopna difundovat do „prázdného“ gelu a také látky jakých vlastností je gel schopen inkorporovat.

6.2.2 Solubilizační testy

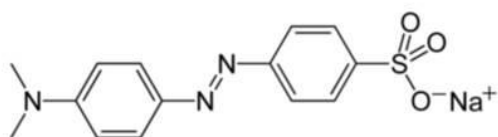
Byly provedeny solubilizační testy, při nichž byly vybrány modelové látky různé fyzikální povahy. Schématická tabulka na **obr. 64** ukazuje použité modelové látky a zároveň výsledky experimentů. Jak je vidět použity byly látky čistě hydrofobní, hydrofilní i nespecificky rozpustné, navíc byly použity i kapaliny s různou viskozitou. Mezi modelové látky patří barviva (súdánová červeň, merocyanin), acidobazické indikátory (metyloranž, thymolová modř), fluorescenční sondy (prodan, bysipyrenylpropan, nilská červeň, ANS, akridinová oranž), dále pak modelové látky ze skupiny vitamínů (α -tokoferol, což je vitamín E, riboflavin, což je vitamín B₂ a menadion, což je vitamín K₃), alkoholů (D-mannitol, glycerol) a také přímo používané chemoterapeutika (diclofenac nebo paclitaxel). Navíc byly připraveny i gely obsahující směsi dvou různých látek (α -tokoferol + menadion, súdánová červeň + chloroform).

Z těchto testů se gel nevytvořil pouze za přítomnosti jediné látky, která měla vysokou viskozitu a hustotu nižší než voda, což byl minerální olej. Můžeme tedy konstatovat, že gel se tvoří za přítomnosti většiny použitých modelových látek bez ohledu na jejich strukturní rozdíly a potažmo rozdílné vlastnosti, jako je například rozpustnost ve vodě nebo viskozita. Fakt, že jsme do systému schopni zakomponovat širokou škálu modelových látek různých vlastností, je důležitý nejen pro budoucí aplikace, ale hraje také významnou roli z hlediska charakterizace systému, protože molekuly jako například fluorescenční sondy nebo acidobazické indikátory nám pomohou charakterizovat systémy z hlediska vnitřního prostředí.

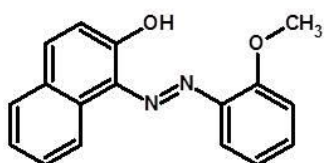
**thymolová
modř**



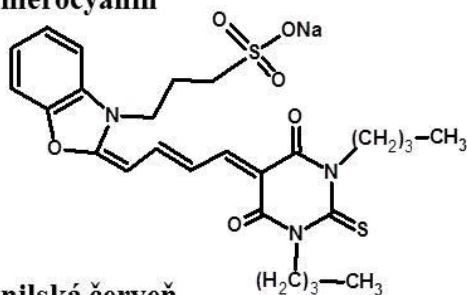
metyloranž



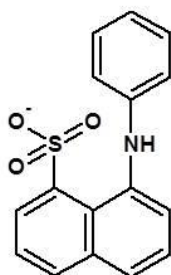
súdánová červeně



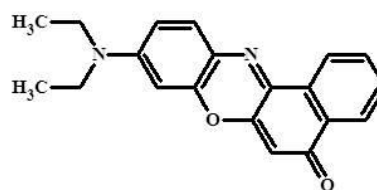
merocyanin



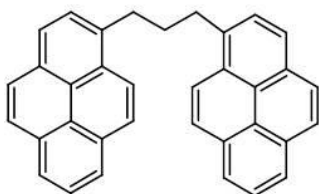
ANS



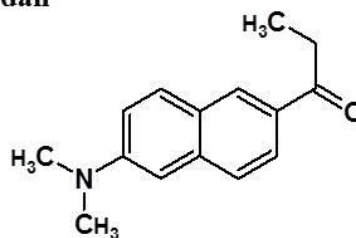
nilská červeně



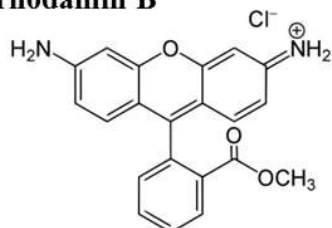
bispyrenylpropan



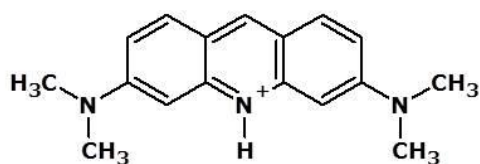
prodan



rhodamin B

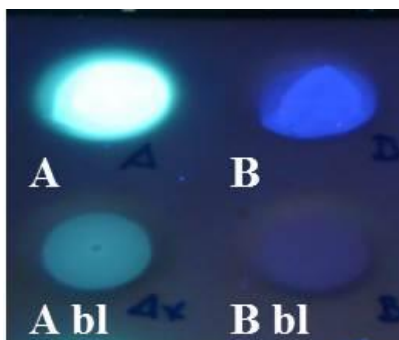


akridinová oranž



6.2.3 Fluorescenční sondy

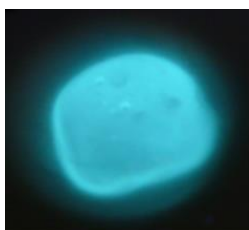
Jak již bylo uvedeno, například pomocí sond reagujících na mikroviskozitu (P3P) nebo mikropolaritu (prodan, pyren) jsme schopni částečně charakterizovat mikrodomény obsažené v gelu.



Obr. 65: Gely obsahující P3P (A vlevo) a pyren (B vpravo) a k nim příslušející blanky, tj. roztoky tenzidu se sondou bez přidavku hyaluronanu

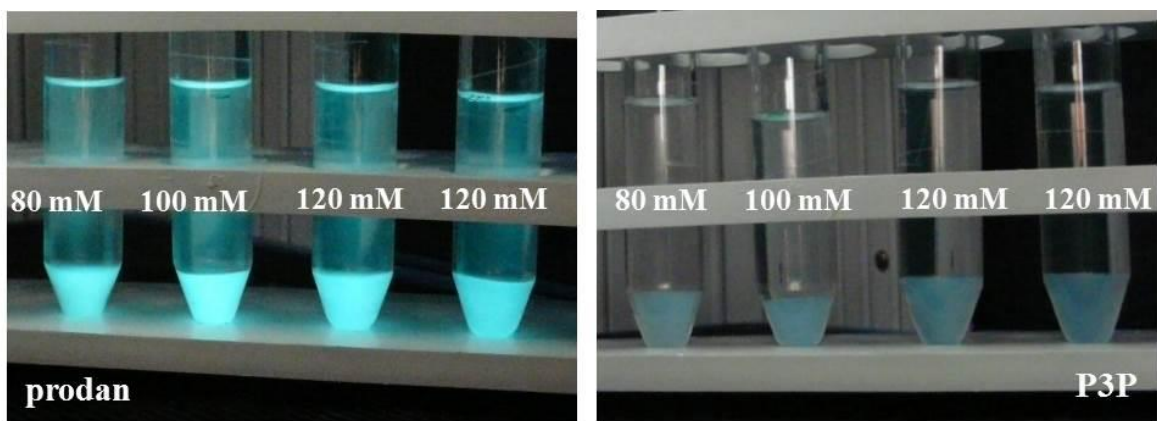
Jak je uvedeno v teoretické části sondy pyren a P3P jsou schopny tvořit excimer vyznačující se maximem emise při 470 nm, což odpovídá tyrkysové barvě. U obou sond je však tvorba excimeru řízena jinými pochody. V případě pyrenu je nutno jeho lokální zakoncentrování v systému, kdežto P3P tvoří excimer „automaticky“ a je nutno velmi rigidní prostředí, aby této tvorbě bylo zabráněno.

Tyrkysová fluorescence P3P v gelu A (obr. 65) tedy znamená, že v prostředí se tvoří excitovaný dimer a že mikroprostředí, ve kterém se sonda nachází, je dostatečně fluidní a není schopno tvorbě excimeru zabránit. Tento fakt výrazně odporuje vlastnostem makroprostředí, které tvoří dosti tuhý gel. Ve vzorku B obsahujícím pyren odpovídá tmavě modrá barva fluorescenci monomeru, což ukazuje na fakt, že v mikroprostředí se naopak excimer netvoří nebo je jeho tvorba minoritní. Nedochozí zde tedy k lokálnímu zakoncentrování sondy, které tvorbě excimeru předchází a dá se usuzovat, že mikroprostředí je buď spojitě, nebo tvořené hydrofobními doménami velkých rozměrů, kde je pravděpodobnost setkání excitované molekuly pyrenu s jinou neexcitovanou molekulou velmi malá.

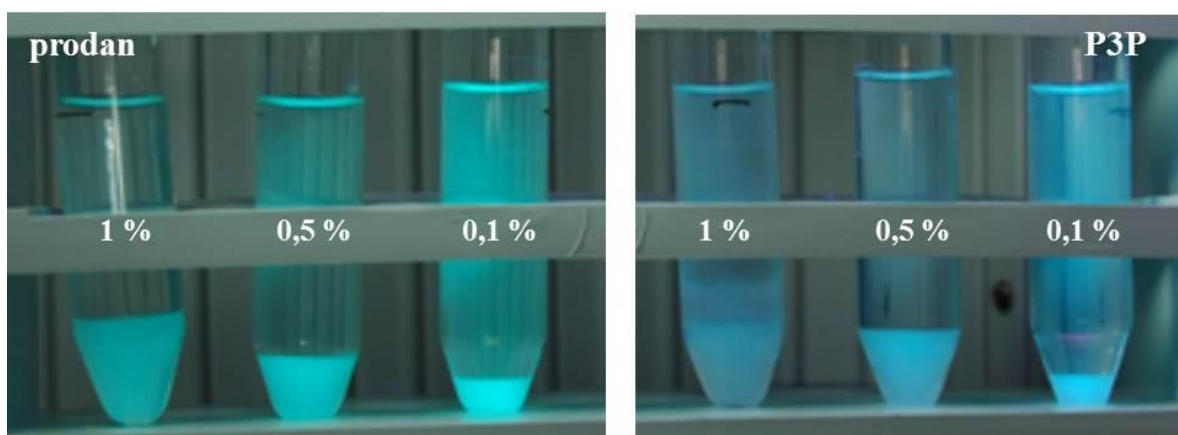


Obr. 66: Vzorek gelu obsahujícího prodan, jako sondu reagující na mikropolaritu.

Tyrkysová fluorescence vzorku (obr. 66) naznačuje nepolární prostředí mikrodomén a v podstatě je tvořena superpozicí emise z vodné a nepolární fáze. Pro porovnání vlastností gelů lišících se složením byly použity dvě z výše uvedených sond a to prodan, jako sonda reagující na mikropolaritu prostředí, a P3P, jako sonda reagující na mikroviskozitu prostředí. Tyto experimenty sloužili k vizuálnímu zmapování případných rozdílů hydrofobních domén v gelech s proměnným množstvím tenzidu i hyaluronanu.



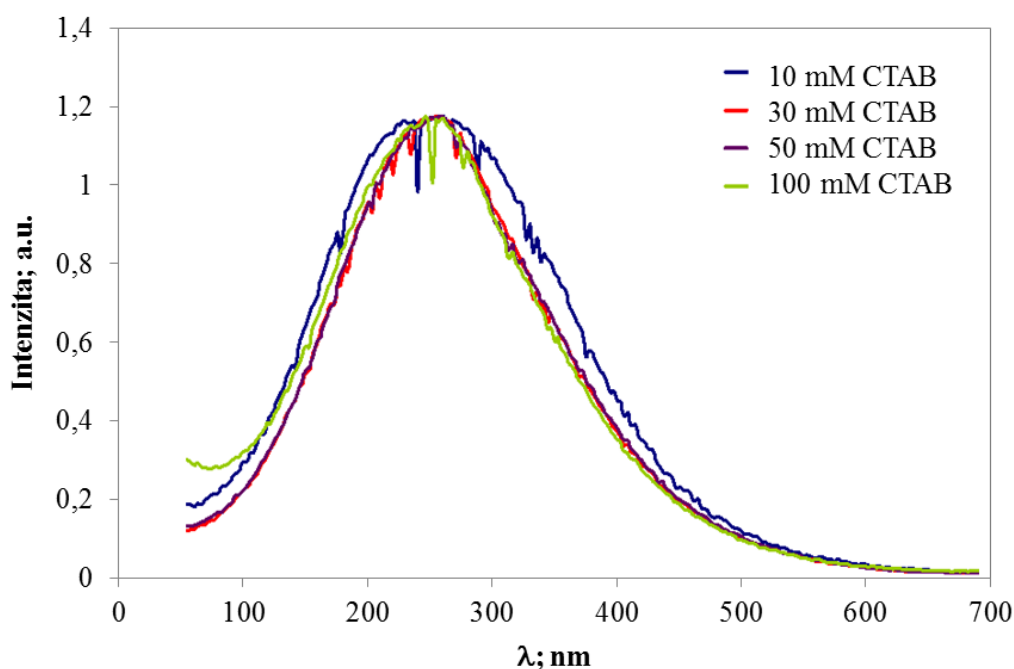
Obr. 67: Gely s konstantním obsahem hyaluronanu (Hya 650 kDa, 0,5 % hm.) a měnícím se obsahem tenzidu CTAB. Zleva doprava roste koncentrace CTAB v řadě 80, 100, 120 a 150 mmol.dm⁻³. V levé části obrázku jsou gely s obsahem prodanu, v pravé části s obsahem P3P.



Obr. 68: Gely s konstantním obsahem CTAB (100 mmol.dm⁻³) a měnícím se obsahem hyaluronanu (Hya 650 kDa). Zleva doprava klesá koncentrace Hya v řadě 1, 0,5 a 0,1 % hm. V levé části obrázku jsou gely s obsahem prodanu, v pravé části s obsahem P3P.

Na **obrázcích 67** a **68** můžeme vidět, že barva fluorescence se pro jednotlivé sondy nemění v závislosti na měnící se koncentraci jak hyaluronanu tak tenzidu. Můžeme tedy konstatovat, že složení gelu nemá vliv na vlastnosti jeho mikroprostředí jak z hlediska mikropolarity, tak z hlediska mikroviskozity.

Při pokusu ověřit toto tvrzení měřeními a porovnáním fluorescenčních spekter však nastaly potíže. Použití nástavce na pevné vzorky bylo vyloučeno, protože gely v tak tenké vrstvě velmi rychle vysychají, což znehodnocuje signál. Použití klasické měření v křemenné kyvetě také nebylo možné z důvodu příliš vysoké rigidity gelu a také nevhodnosti měření, protože toto uspořádání by vyžadovalo obrovské množství vzorku. Pro měření nakonec přece jen byla použita křemenná kyveta, ale tato obsahovala napříč křemenné septum, na kterém byla nanесena tenká vrstva gelu a do kyvety byl napipetován fyziologický roztok zabraňující vysychání gelu. Takto byla naměřena spektra prodanu (viz **obr. 69**) pro vzorky s proměnnou koncentrací tenzidu, z nichž je patrné, že emisní maximum se při měnící koncentraci tenzidu neposunuje. To potvrzuje výše uvedené závěry.



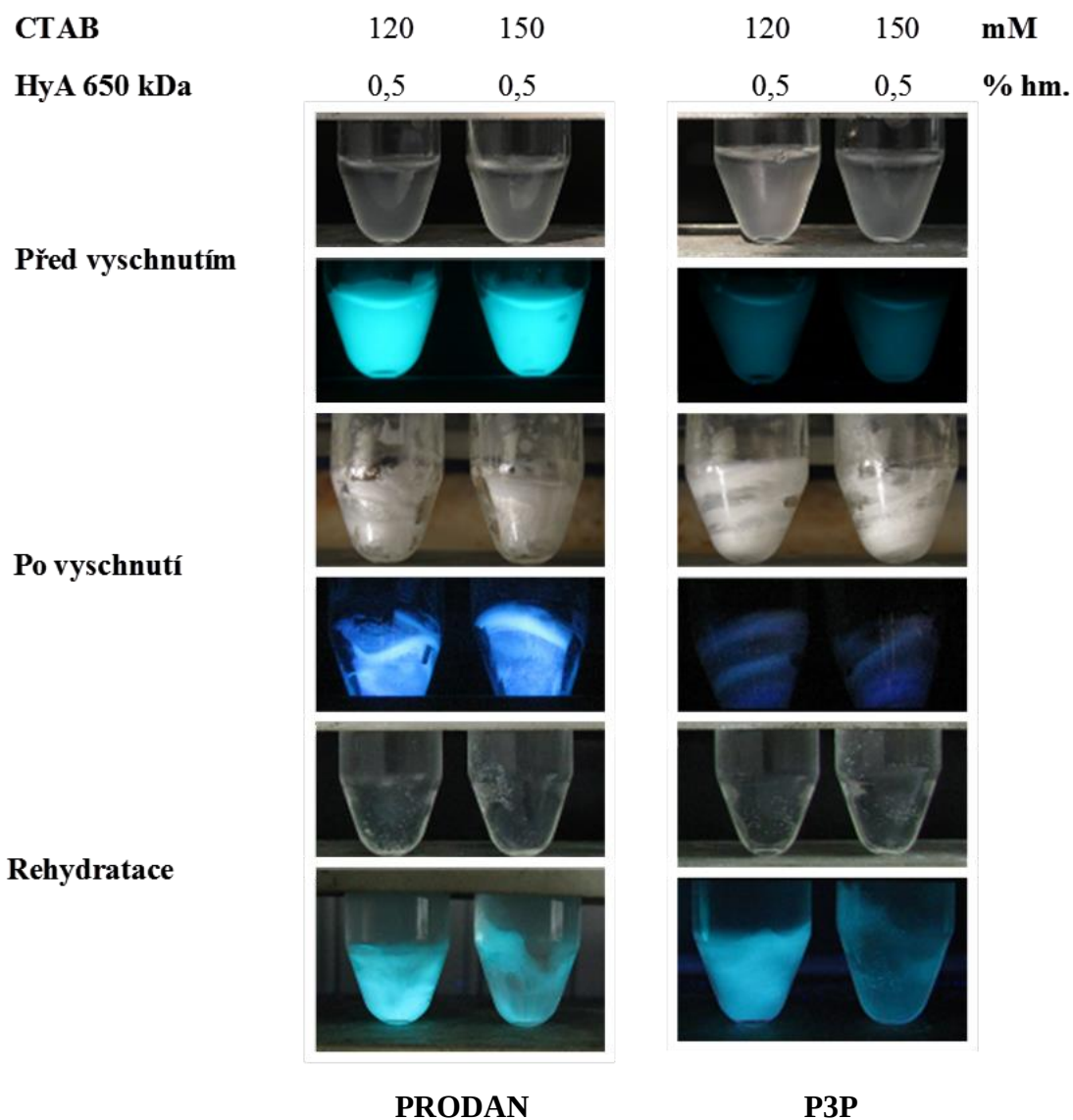
Obr. 69: Emisní spektra prodanu vyjádřená závislostí normované intenzity fluorescence na vlnové délce pro vzorky s proměnnou koncentrací tenzidu

6.2.3.1 Vysychání

Jak bylo při měření fluorescenčních spekter na nástavci pro tuhé vzorky zjištěno, gely v tenké vrstvě poměrně rychle vysychají a signál fluorescenční sondy se poté mění. Gelové fáze obsahující výše uvedené fluorescenční sondy byly tedy ponechány vyschnout a bylo zjišťováno, zda jsou schopny rehydratace a návratu do původního stavu z hlediska vlastností jejich hydrofobních domén. Výsledky jsou ukázány na **obr. 70**.

Jak je z obrázku patrné, vykazují vzorky před vyschnutím barvu fluorescence typickou pro hydrofobní vnitřní prostředí (přesněji pro směs signálů z hydrofobního a hydrofilního prostředí, tento signál však potvrzuje přítomnost hydrofobních domén), které je navíc poměrně fluidní. Po vyschnutí ovšem nastává změna. U obou sond přechází tyrkysová barva fluorescence na modrou, což u každé sondy indikuje jinou změnu. U prodanu je tato modrá barva zapříčiněna vymizením fluorescence této sondy z vodného prostředí, která je zelená. Zůstává tedy čistě modrá fluorescence z nepolárního prostředí a nedochází už k součtu signálu z obou prostředí. U P3P to znamená, že je zastavena tvorba excimeru, která je ve fluidním prostředí preferována, což může být zapříčiněno jediným důvodem a to změnou rigidity prostředí. Jednodušeji řečeno, vyschlý gel je natolik rigidní, že tvorbu excimeru nedovoluje.

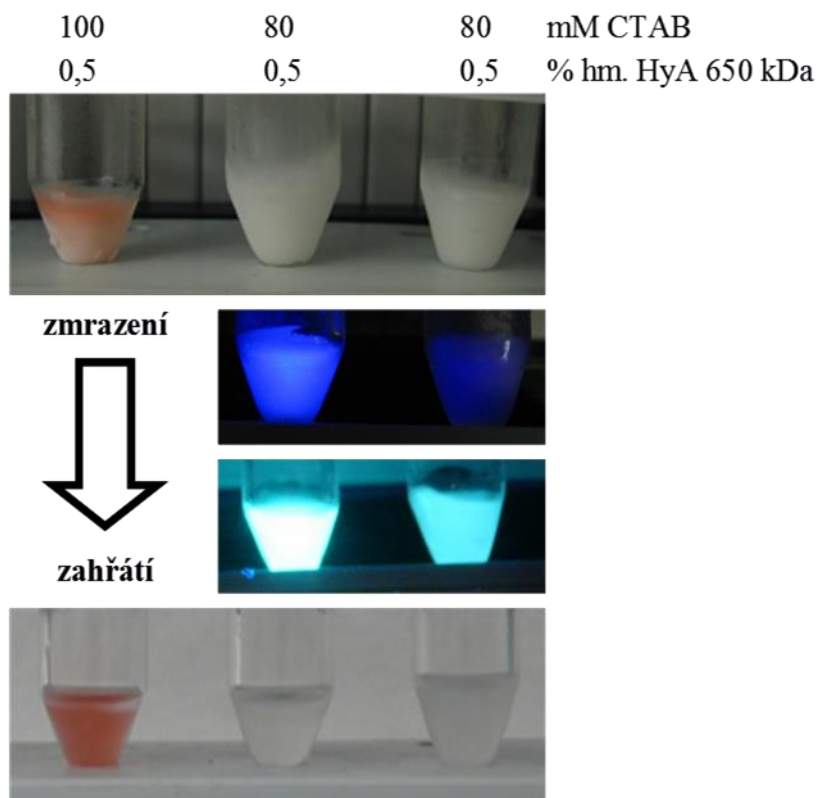
Velmi zajímavým zjištěním, které je důležité hlavně pro aplikaci budoucího použití systému, je fakt, že gel je schopen rehydratace. A nejen to, jak je z obrázku patrné, po rehydrataci vykazují fluorescenční sondy stejný signál jako před ní, což znamená, že hydrofobní domény obsažené v gelu se vrací do původního stavu. Právě tato vlastnost by mohla být výhodou pro praktické použití gelů založených na tomto modelovém systému.



Obr. 70: Vysychání gelů obsahujících fluorescenční sondy reagující na mikropolaritu a mikroviskozitu. Vzorky v levém sloupci obsahují sondu *prodan*, v pravém sloupci pak můžeme vidět vzorky obsahující sondu *P3P*.

6.2.3.2 Zmrazení

Okrajově byly provedeny také experimenty ověřující chování a stabilitu gelu při jeho zmrazení. Na **obr. 71** můžeme vidět fotodokumentaci tohoto experimentu. S ohledem na předchozí kapitolu zde znovu nebudou uváděny podrobnosti chování fluorescenčních sond a spokojíme se s pouhým konstatováním, že po rozmrazení se gel opět vrací do původního stavu a to jak z makroskopického hlediska, tak z hlediska hydrofobních domén.

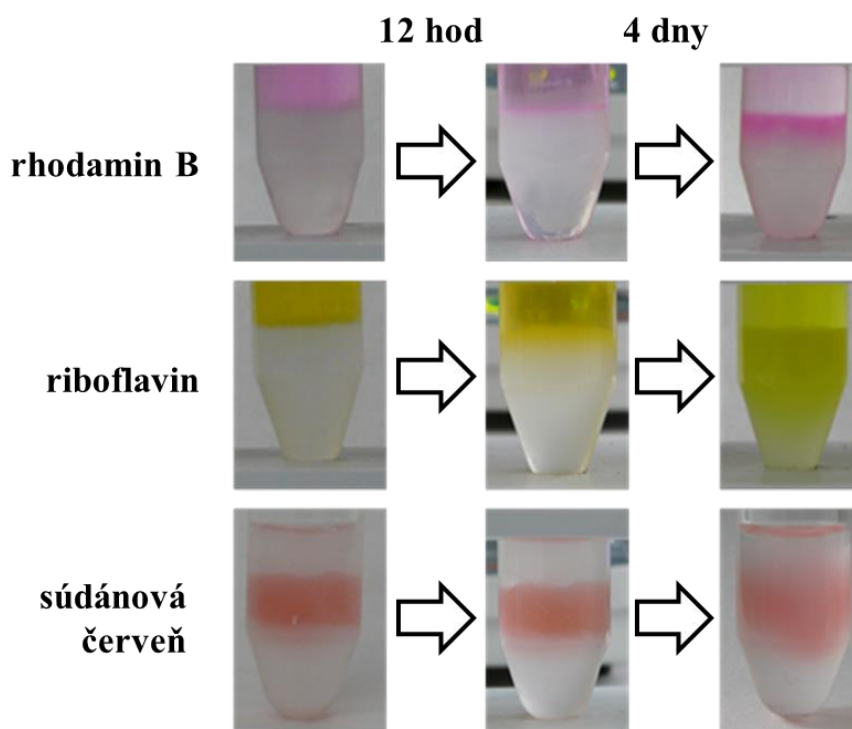


Obr. 71: Zmrazení a zahřátí gelu

6.2.4 Difúzní procesy

Jednoduchým způsobem byly také prozkoumány difúzní procesy v gelech. Byly připraveny „čisté“ gely bez inkorporované modelové látky, ta byla ke gelu přidána jako roztok. Použit byl částečně hydrofobní rhodamin B a hydrofilní riboflavin. Dále byl také připraven gel s inkorporovanou čistě hydrofobní látkou súdánovou červení. Do zkumavky byl poté postupně navrstven čistý gel, gel s barvivem a opět čistý gel.

Tyto systémy pak byly sledovány po určitých časových intervalech, což můžete vidět na **obr. 72**. Jak je na těchto fotkách patrné, do gelu pronikají obě látky, jak hydrofilní Riboflavin, tak částečně hydrofobní rhodamin. Rozdíl je však v rychlosti difúze, která u hydrofilní látky probíhá mnohem rychleji. Během čtyř dnů se Riboflavin dostává téměř do celého objemu gelu, zatímco rhodamin pouze do jeho povrchové vrstvy. I mezi navrstvenými gely dochází na základě difúzního potenciálu k přechodu hydrofobního barviva do vrstev čistého gelu. Po čtyřech dnech pozorování se hranice mezi bezbarvým a barevným gelem jasně rozmývají.



Obr. 72: Vizualizace difúzních procesů v gelech

6.2.5 Vliv pH

Inkorporováním pH indikátorů do gelů a jejich umístěním do silně kyselého (HCl, pH 1,5) a silně zásaditého (NaOH, pH 12,3) roztoku, jsme také prozkoumali stabilitu gelů při takto extrémních acidobazických podmínkách. Díky změně barvy indikátorů (metyloranž a tymolová modř) bylo vidět, jak rozpouštědlo postupně difunduje dovnitř gelu. V zásaditém roztoku se pak povrch gelu zakalil, ale gel pak zůstal stabilní. Naopak v kyselém roztoku začalo docházet zřejmě ke kyselé hydrolyze a gel se začal rozpadat, až se rozložil úplně. Prvními experimenty tedy bylo stanoveno, že gel je v silně zásaditém prostředí stabilní, zatímco v silně kyselém prostředí se rozkládá.

6.2.6 Termogravimetrie

Gelovité fáze tvořené interagujícím hyaluronanem a CTAB byly termogravimetricky testovány. V TG spektrech se u všech vzorků objevuje dvouzlomová křivka, což znamená, že na křivce derivované podle teploty pak všechny naměřené závislosti vykazují dvě maxima. První pík, jehož maximum se nachází okolo 100 °C, odpovídá vysušení vody ze vzorku, druhé maximum nacházející se obvykle okolo 225 °C přísluší tepelné degradaci komponent a jejich spálení. Konkrétní hodnoty stanovovaných parametrů jsou uvedeny v **tab. 11**.

Tab. 11: Shrnutí výsledků termogravimetrických měření

složení			první maximum			druhé maximum		
			$t_{poč1}; ^\circ\text{C}$	$t_{inf1}; ^\circ\text{C}$	$m_{suš},$ % hm.	$t_{poč2}; ^\circ\text{C}$	$t_{inf2}; ^\circ\text{C}$	$m_{pop},$ % 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

Jak již bylo uvedeno v experimentální části, hodnoty parametru $t_{poč1}$ jsou způsobeny spíše uspořádáním měření, protože křivka závislosti hmotnosti na teplotě u všech vzorků začíná klesat prakticky ihned po zahájení měření, tudíž derivované hodnoty rostou. Bez lineární části křivky, která by předcházela tomuto poklesu, respektive nárůstu, je velmi obtížné stanovit opravdu reálnou hodnotu teploty počátku vysušování. Parametr $t_{poč1}$ je tedy pouze orientační a upozorňuje na fakt, že vysoušení vody z gelových fází začíná již při nízkých hodnotách teplot, což je užitečná informace spíše pro budoucí použití. V případě, že bude potřeba udržet gelovou fázi stejných vlastností, bude ji třeba skladovat pod vrstvou supernatantu.

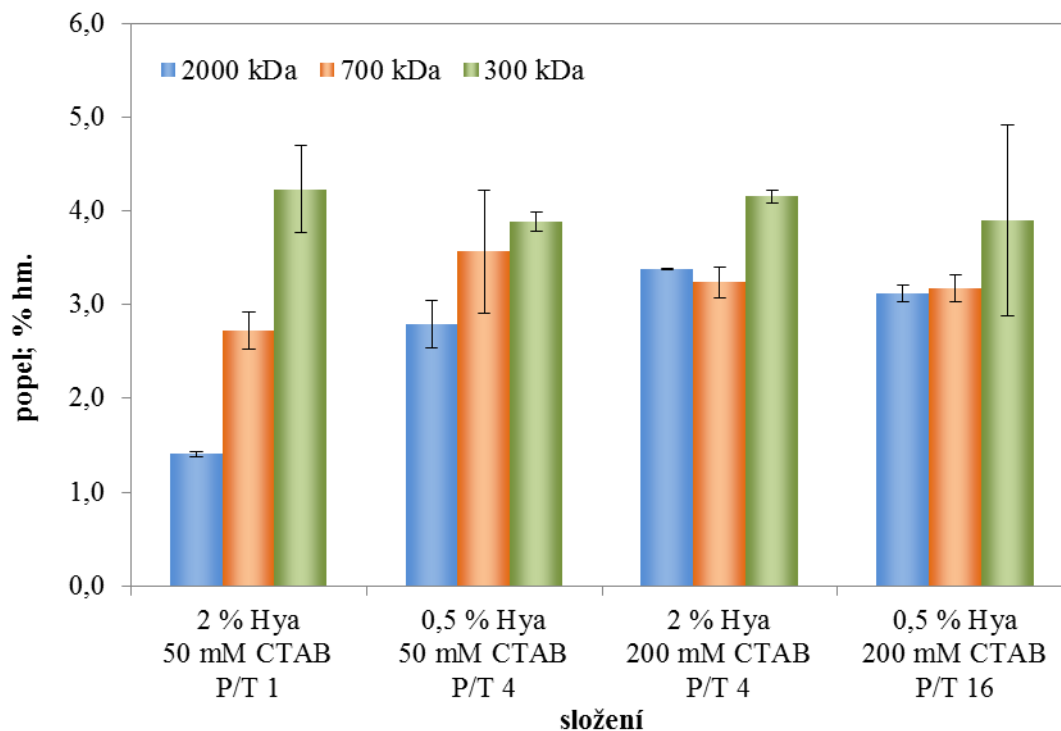
Teplota t_{inf1} je naopak spolehlivým parametrem, protože zlomy nutné k jejímu stanovení jsou na křivkách ostře vykresleny. Tato hodnota udává teplotu, při které je ze vzorku vysušena většina vody, a proto je logické, že její hodnoty se blíží hodnotě varu vody. U všech zkoumaných vzorků se teplota t_{inf1} pohybovala okolo 95 °C. Snížení hodnot oproti teplotě varu vody za standardních podmínek je pravděpodobně způsobeno průtokem vzduchu tvořícího oxidativní atmosféru v měřící cele.

Pro přímou charakterizaci systému tvořeného interagujícím hyaluronanem a CTAB jsou však užitečnější zbylé parametry. Jedním z nich je hodnota sušiny udávaná v hmotnostních a procentech. Jak je vidět z **tab. 11**, souhrně pro všechny vzorky se sušiny pohybují v rozmezí od 29 % hm. do 2 % hm., což znamená, že v krajních případech je systém tvořen interagujícím polyelektrolytem a tensidem schopen pojmout od 71 % hm. až do 98 % hm. vody. V druhém případě je tedy sušina (vzorek s 2 % hm. Hya 2000 kDa a 50 mmol.dm⁻³ CTAB) schopna pojmout do svojí struktury 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.

Teplota, při které dochází k počátku oxidativní destrukce komponent ($t_{poč2}$) se u všech vzorků pohybuje okolo 180 °C. Tato teplota by se dala považovat za hranici tepelné stability systémů. Při jejím překročení totiž dochází ve vzorku k nevratným oxidativním změnám. K degradaci největší části komponent pak dochází při teplotě t_{inf2} . Tato teplota se pohybuje v rozmezí od 221 °C do 234 °C. V tomto ohledu získané výsledky korespondují i s měřeními, které provedli **Zhang J. a spol.** [130], kteří mikroemulzní metodou připravovali nanokrystaly CeO₂ a používali přitom CTAB. Provedli jeho TG analýzu ve vzduchové atmosféře a zjistili, že jeho dekompozice a oxidace probíhá při 250 °C. Získané výsledky jsou ve shodě také s článkem **Tolentina A. a spol.** [131], který se zabývá iontovými komplexy kyseliny hyaluronové a alkyltrimetylamoniových tensidů, se zaměřením na tensidy s délkou řetězce 18, 20 a 22 uhlíkových atomů. Na těchto systémech provedli TG měření a zjistili, že jejich tepelná dekompozice nastává od 225 °C do 260 °C.

Posledním zjišťovaným parametrem byla hodnota popela v hmotnostních procentech. Obsah popela se v jednotlivých vzorcích až tak výrazně neliší, jak by se dalo očekávat z odlišností v hodnotách sušin. Jeho hodnoty nalezneme v rozmezí od 1,4 % hm. do 4,2 % hm. Pokud budeme hodnoty popela porovnávat z hlediska složení vzorku a molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu (viz **obr. 73**) vidíme, že trendy změn nejsou jednotné. Jednoznačně dochází k nárůstu množství popela s klesající molekulovou hmotností hyaluronanu pouze v případě použití CTAB 50 mmol.dm⁻³ a 2% hm. Hya (P/T 1). V ostatních případech není tento trend patrný nebo není v rámci chybových úseček prokazatelný. V případě složení 0,5% hm. Hya a 200 mmol.dm⁻³ CTAB (P/T 16) se množství

popela v rámci chybových úseček nemění. Ve zbylých dvou případech, jejichž poměr P/T je teoreticky shodný je vidět chování odlišné, a to jak mezi nimi samotnými, tak i mezi krajními vzorky s jiným poměrem P/T. Ve vzorku s 0,5% hm. Hya a 50 mmol.dm⁻³ je množství popela nižší pouze v případě použití Hya 2000 kDa, jinak se množství popela v rámci chybových úseček nemění. Naopak při složení 2% hm. Hya a 200 mmol.dm⁻³ je hodnota popela vyšší pouze při nejnížší použité molekulové hmotnosti 300 kDa a při ostatních dvou použitých molekulových hmotnostech se množství popela nemění.

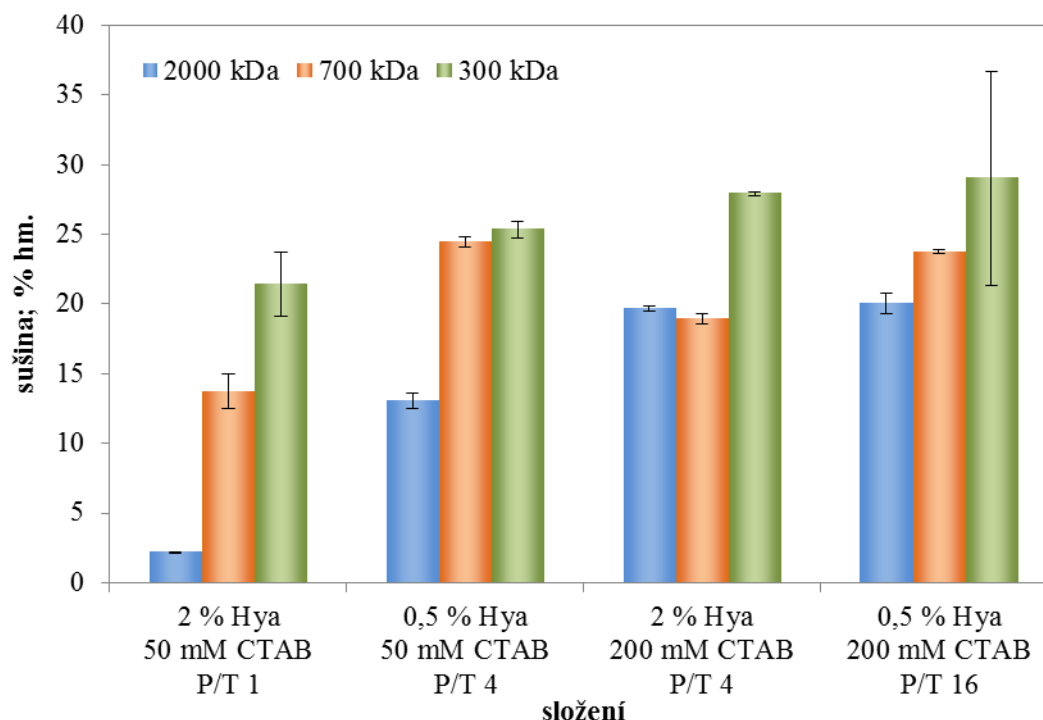


Obr. 73: Hodnoty termogravimetricky stanoveného popela

Velmi podobné chování nalezneme i pro hodnoty sušiny vzorků stanovených také v hmotnostních procentech viz **obr. 74**. Při poměru P/T 1 dochází opět s poklesem molekulové hmotnosti k nárůstu obsahu sušiny ve vzorcích, kdežto u poměru P/T 16 je chování odlišné. Dochází zde k poklesu množství sušiny při nejvyšší molekulové hmotnosti, při zbylých nižších molekulových hmotnostech se množství sušiny v rámci chybových úseček nemění. Chování vzorků se stejným P/T 4 je opět odlišné. U s 0,5% hm. Hya a 50 mmol.dm⁻³ je pokles při nejvyšší molekulové hmotnosti a pro 2% hm. Hya a 200 mmol.dm⁻³ je nárůst při nejnížší molekulové hmotnosti.

Rozdíly v hodnotách sušiny mohou být způsobeny různým zbytkovým obsahem vody, která je ve struktuře interagujícího hyaluronanu a tenzidu vázána tak pevně, že ji ani při vyšších teplotách nelze ze sušiny odstranit. Rozdíly v trendech a hodnotách množství popela mohou způsobeny mechanismem vzniku gelu. Gely jsou totiž připravovány smícháním roztoků obou komponent ve vysoké koncentraci, překotně pak vzniká sraženina, která teprve do druhého dne přechází na čistou koncentrovanou gelovitou formu. Všechny vzorky byly před měřením TG ponechány 48 hod stát, ale i tak je možné, že gelové vzorky obsahovaly jistou frakci CTAB, jež nebyla vázána v gelu elektrostaticky, ale stericky. Tato frakce se v různých případech může lišit, protože jak je vidět z grafů na interakci má velký vliv koncentrace použitého zásobního roztoku hyaluronanu. Polymer bude mít totiž při různé

koncentraci různou konformací a bude také různě disociován, což ovlivní strukturu vznikajícího gelu. To podporuje i fakt, že můžeme vidět rozdílné chování u dvou vzorků, jejichž poměr P/T je shodný a tudíž, by tedy měly interagovat stejně. Poměr P/T počítaný pro ideální případ, kdy se předpokládá 100% disociovaných karboxylových skupin na hyaluronanu, je tedy nutno brát pouze jako orientační parametr, protože díky různé konformaci řetězce zřejmě nejsou všechna vazná místa přístupná pro interakci s tenzidem.



Obr. 74: Hodnoty termogravimetricky stanovených sušin

6.2.7 Relogie

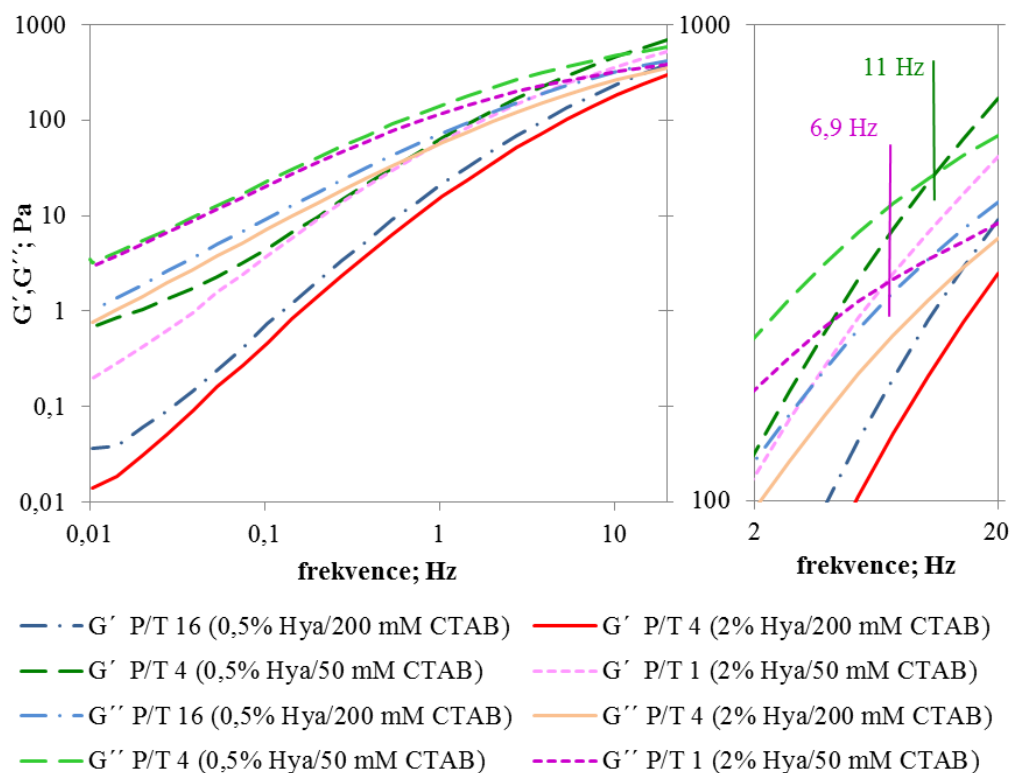
Při reologickém testování byly provedeny dva druhy měření. Měřeny byly oscilační testy a tokové testy. Tyto charakterizace byly provedeny pro série gelových vzorků (viz kapitola 5.2.5) s použitím hyaluronanu o třech molekulových hmotnostech (300 kDa, 700 kDa a 2000 kDa). Výsledky jsou shrnuty také v článku připraveném k publikaci (příloha 4).

6.2.7.1 Oscilační testy

Na **obrázku 75** jsou uvedena data naměřená pro různá složení gelových fází s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 300 kDa. Jak je na první pohled patrné v tomto případě se překřížení vyskytovalo pouze u dvou vzorků se složením Hya 2 % hm. a CTAB 50 mmol.dm⁻³ (P/T 1) a Hya 0,5 % hm. a CTAB 50 mmol.dm⁻³ (P/T 4), přičemž v druhém případě je posunut k vyšší hodnotě frekvence a nabývá také vyšší hodnoty modulů.

U ostatních dvou vzorků se v měřeném rozsahu frekvencí paměťový a ztrátový modul neprotnuly, i když z průběhu jejich závislostí lze předpokládat, že by k tomu došlo již u frekvencí jen mírně převyšujících měřený rozsah. U těchto vzorků v celém měřeném rozsahu je ztrátový modul vyšší než paměťový, což znamená převyšující viskózní chování nad elastickým. Pokud se na výsledky podíváme z hlediska poměru P/T, tak v případě, že by jeho hodnota byla řídící pro interakci a strukturu vznikajícího gelu, pak vzorky se stejným

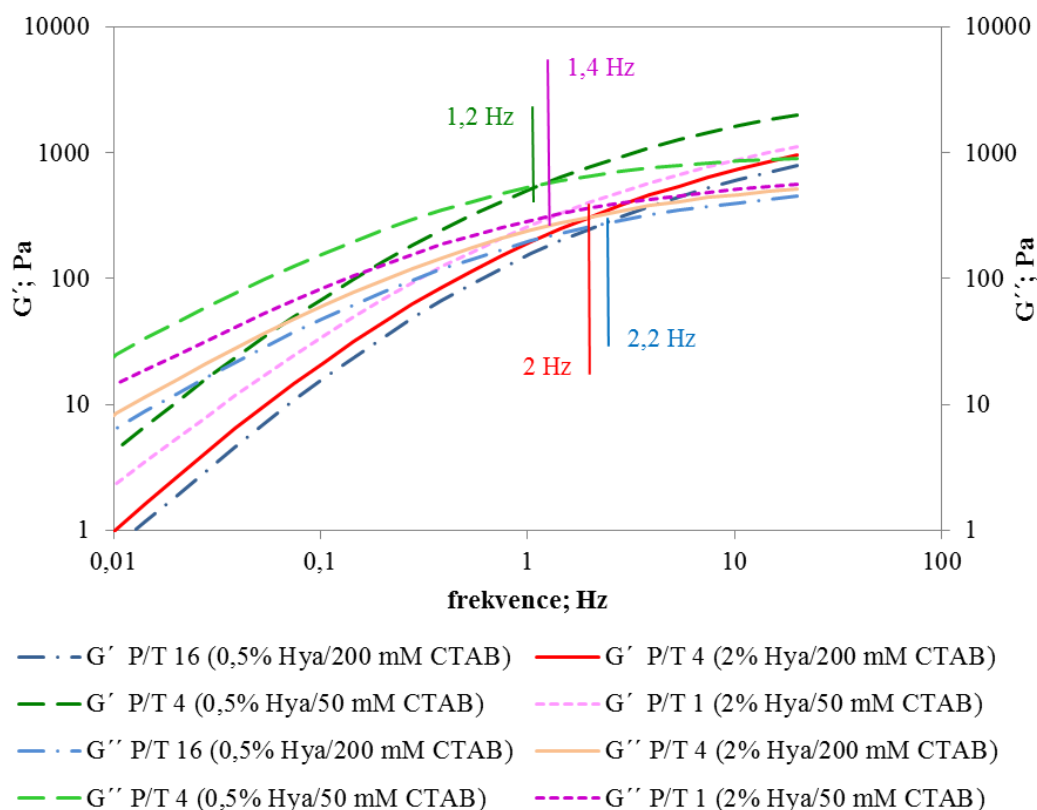
poměrem měly vykazovat podobné chování. Jak je vidět, tento předpoklad neplatí, naopak podobně se chovají dvojice vzorků připravených se stejnou koncentrací zásobního roztoku CTAB. Překřížení se vyskytuje při použití koncentrace $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, gely z něj připravené jsou elastičtější.



Obr. 75: Závislosti ztrátového a pamětového modulu na frekvenci pro koncentrované fáze vzorků různého složení obsahujících hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa.

Obr. 76 znázorňuje vzorky připravené s použitím hyaluronanu o molekulové hmotnosti 700 kDa. Jak je vidět oproti předchozímu grafu v tomto případě se už překřížení vyskytuje u všech naměřených závislostí. Je zde vidět chování analogické s nižší molekulovou hmotností, to jest podobné chování vzorků namíchaných s použitím jedné koncentrace zásobního roztoku CTAB. Překřížení se posunuje k vyšším hodnotám frekvence v řadě Hya 0,5 % hm. a CTAB 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (P/T 4) – Hya 2 % hm. a CTAB 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (P/T 1) – Hya 2 % hm. a CTAB 200 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (P/T 4) – Hya 0,5 % hm. a CTAB 200 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (P/T 16), zatímco hodnota modulů jak při překřížení tak hodnoty modulů při ostatních frekvencích ve stejné řadě klesají.

Pokud jde o hodnoty modulů při různých frekvencích, pak je chování analogické s nižší použitou molekulovou hmotností 300 kDa. Trend poklesu hodnot v rámci jedné použité molekulové hmotnosti je stejný, obecně jsou však hodnoty naměřených modulů vyšší pro Hya 700 kDa a nižší pro 300 kDa, což znamená, že gel připravený z hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti je tužší a mechanicky odolnější. Opět se trend změn ve vlastnostech vzorku nemění podle změn poměru P/T a vzorky se stejným poměrem nemají stejné vlastnosti. Zároveň se oproti Hya 300 kDa mění tvar naměřených křivek, kdy závislosti ztrátových modulů, zejména pak pro vzorek Hya 0,5 % hm. a CTAB 50 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (P/T 4) vykazují při vyšších hodnotách frekvencí blíží se plató.

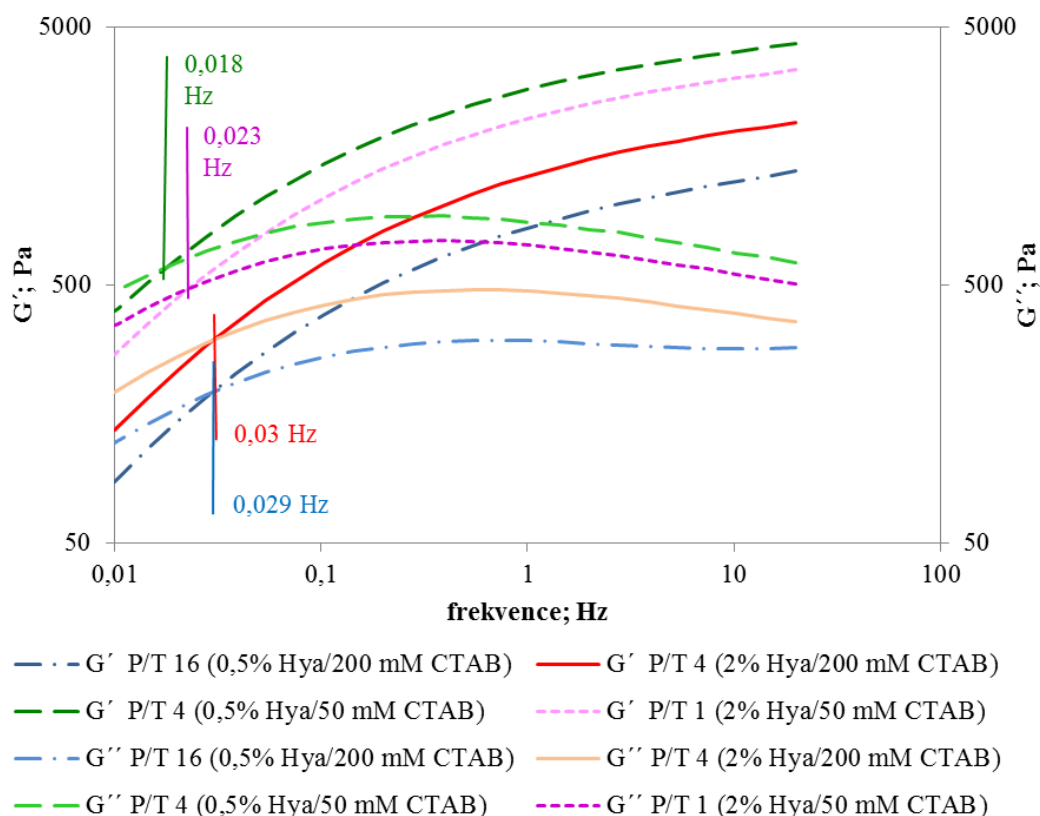


Obr. 76: Závislosti ztrátového a paměťového modulu na frekvenci pro koncentrované fáze vzorků různého složení obsahujících hyaluronan o molekulové hmotnosti 700 kDa.

Pro nejvyšší použitou molekulovou hmotnost hyaluronanu 2000 kDa jsou křivky znázorněny na **obr. 77**. Překřížení se opět objevuje u všech vzorků, ale tentokrát nastává už při nízkých frekvencích, což znamená, že ve většině měřeného rozsahu frekvencí převyšuje paměťový modul nad ztrátovým, takže v chování vzorku převažuje elastická složka. Hodnota modulů při překřížení vykazuje stejný trend jako ve vzorcích s Hya 700 kDa, stejně tak jako hodnoty modulů při ostatních frekvencích. Ty klesají ve stejné řadě u všech použitých molekulových hmotností. Co se týče frekvence při překřížení ta roste v řadě Hya 0,5 % hm. a CTAB 50 mmol.dm⁻³ (P/T 4) – Hya 2 % hm. a CTAB 50 mmol.dm⁻³ (P/T 1) – Hya 0,5 % hm. a CTAB 200 mmol.dm⁻³ (P/T 16) – Hya 2 % hm. a CTAB 200 mmol.dm⁻³ (P/T 4), přičemž u posledních dvou zmiňovaných složení je prakticky totožná.

Co se týče porovnání hodnot obou modulů při různých frekvencích, pak tyto hodnoty rostou s rostoucí molekulovou hmotností a jsou tedy u vzorků s Hya 2000 kDa nejvyšší. V tomto případě tedy vzniká gel s nejvyšší mechanickou odolností. Oproti předchozím grafům opět dochází ke změně ve tvaru naměřených křivek. Jak je vidět na **obr. 77** při vysokých hodnotách frekvence je na závislosti ztrátového modulu u vzorku Hya 0,5 % hm. a CTAB 200 mmol.dm⁻³ (P/T 16) vidět již jasně patrné plató a u ostatních vzorků je na této závislosti patrné ploché maximum při frekvencích okolo 0,1 Hz následované poklesem závislosti.

Z hlediska vlivu molekulové hmotnosti na vlastnosti vznikajícího gelu lze říci, že s její rostoucí hodnotou při daném složení rostou hodnoty obou modulů. Gely jsou tedy při vyšší molekulové hmotnosti Hya tužší a převládá jejich elastická odezva, zatímco gely připravené s nižší molekulovou hmotností jsou tekutější a chovají se více jako viskózní kapalina.



Obr. 77: Závislosti G' a G'' na frekvenci pro vzorky obsahujících Hya 2000 kDa.

Tomu odpovídá i **tab. 12**, která shrnuje naměřené hodnoty pro G' a G'' při vybraných frekvencích, a také uvádí frekvenci, při které se nachází překřížení a hodnotu shodných modulů tomuto bodu příslušející. Jak je vidět hodnoty G' při frekvenci 10 Hz se pro všechny vzorky pohybují v řádu od stovek do tisíců Pa, zatímco G'' jsou v řádu stovek Pa a paměťové moduly převyšují pouze při použití Hya 300 kDa. Tyto vzorky jsou tedy nejviskóznější. Pro HyA 300 kDa v celém rozsahu měřených frekvencí se hodnoty paměťového modulu mění od desetin jednotek po stovky, zatímco ztrátový modul nabývá hodnot od jednotek po stovky Pa. Největší rozdíly hodnot obou modulů mezi jednotlivými použitými molekulovými hmotnostmi jsou pak vidět při frekvenci 0,1 Hz, kdy se například paměťový modul mění od desetin jednotek Pa (Hya 300 kDa), přes desítky Pa (700 kDa) až po tisíce Pa (2000 kDa).

Dále jsou v **tab. 12** charakteristiky překřížení. Posun jeho polohy k vyšším frekvencím s vyšší použitou M_w je patrný již při porovnávání grafů. Zároveň se také mění hodnota modulů v tomto bodě. V rámci Hya 300 kDa, kde se překřížení vyskytuje pouze při koncentraci CTAB $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, je hodnota modulu vyšší při nižší použité koncentraci hyaluronanu. Stejný trend se u dané koncentrace tenzidu objevuje i pro Hya 700 kDa. V tomto případě bylo překřížení i na křivkách pro koncentraci CTAB $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, zde ale shodná hodnota obou modulů mírně roste s rostoucí použitou koncentrací hyaluronanu. Stejné chování, co se týče trendu změn pro jednotlivé koncentrace tenzidu, vykazuje i nejvyšší molekulová hmotnost Hya 2000 kDa. Co se týče hodnoty modulů při překřížení, jsou porovnatelné následující vzorky Hya 300 kDa 2 % hm., CTAB $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a Hya 700 kDa 0,5 % hm., CTAB $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, dále pak Hya 300 kDa 0,5 % hm., CTAB $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a Hya 2000 kDa 2 % hm., CTAB $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nakonec Hya 700 kDa 2 % hm., CTAB $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a Hya 2000 kDa 2 % hm., CTAB $200 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tab. 12: Naměřené hodnoty paměťového a ztrátového modulu pro vybrané hodnoty frekvence a charakteristiky pro překřížení

složení			10 Hz		1 Hz		0,1 Hz		překřížení	
			G'; Pa	G''; Pa	G'; Pa	G''; Pa	G'; Pa	G''; Pa	G', G''; Pa	frekvence; Hz
300 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	367	323	61	118	3,8	20,8	285	6,85
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	468	476	65	145	4,5	22,9	485	10,96
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	184	264	16	58	0,5	7,2	-	-
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	240	322	22	74	0,7	9,4	-	-
700 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	883	513	268	292	35,2	84,2	233	1,39
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	1629	863	514	533	70,7	159,0	554	1,16
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	736	486	198	242	21,5	61,1	311	1,99
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	609	402	157	199	16,1	48,5	270	2,24
2000 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	3166	551	2222	713	1086,0	689,2	484	0,023
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	4025	666	2878	875	1468,0	874,8	587	0,018
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	1977	388	1334	472	607,9	418,1	305	0,030
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	1263	282	840	303	384,5	264,1	191	0,029

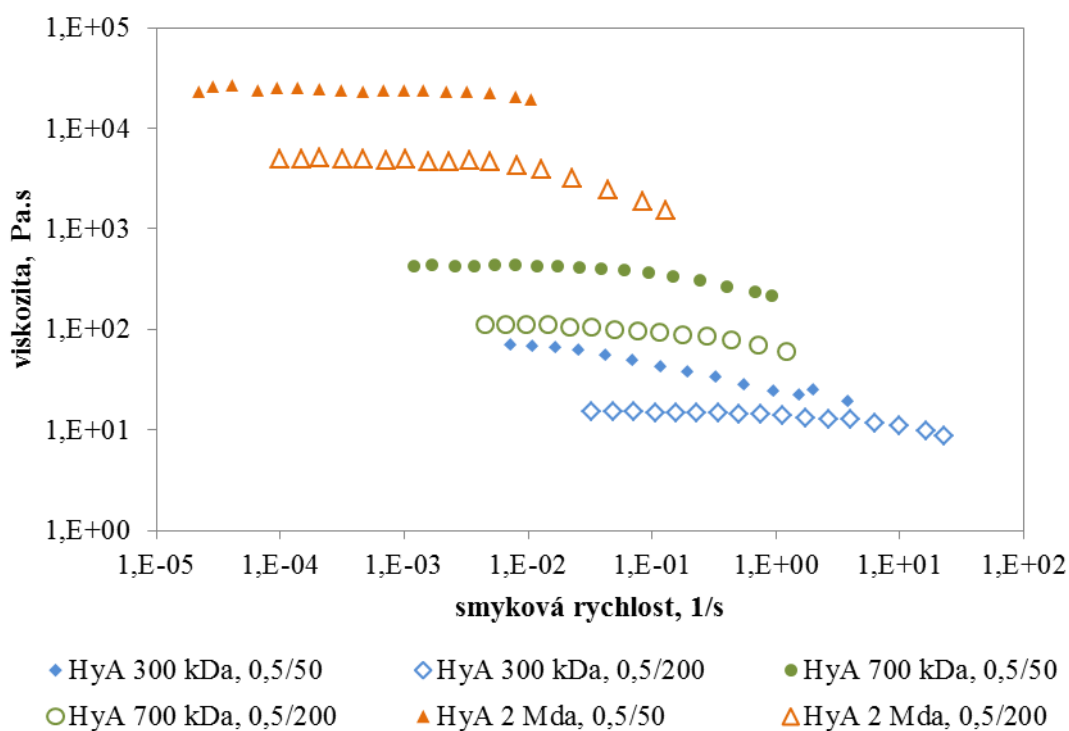
Tab. 13: Parametry pro jednotlivé prvky generalizovaného Maxwellova modelu

složení			prvek 1		prvek 2		prvek 3		prvek 4		prvek 5	
			G ₁ ; Pa	λ ₁ ; s	G ₂ ; Pa	λ ₂ ; s	G ₃ ; Pa	λ ₃ ; s	G ₄ ; Pa	λ ₄ ; s	G ₅ ; Pa	λ ₅ ; s
300 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	278	0,22	72	1,20	0,36	77	775	0,03	6,76	7,19
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	338	0,22	70	1,20	1,12	105	1173	0,03	6,05	7,67
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	156	0,18	18	1,07	0,01	799	904	0,02	0,50	7,83
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	206	0,17	29	0,95	0,03	720	1002	0,02	1,26	6,13
700 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	491	0,30	232	1,64	5,86	64	975	0,04	51	9,17
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	886	0,34	402	1,85	10,25	65	1511	0,05	89	10,15
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	426	0,31	167	1,69	2,45	61	907	0,04	30	9,32
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	355	0,30	133	1,67	1,49	69	798	0,04	22	9,27
2000 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	850	0,51	967	3,34	366	138	814	0,06	764	20,04
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	1038	0,50	1219	3,36	516	150	980	0,06	999	20,86
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	584	0,50	616	3,28	190	132	584	0,06	440	19,64
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	372	0,47	389	3,13	123	130	472	0,05	283	19,15

Tabulka 13 uvádí hodnoty parametrů pro jednotlivé prvky generalizovaného Maxwellova modelu použitého k proložení závislosti paměťového a ztrátového modulu na frekvenci. Jak je vidět, byly použity modely s pěti prvky, což znamená, že byly získány relaxační časy a odpovídající dílčí moduly pro každý z prvků. Relaxační čas prvního prvku se u všech vzorků pohybuje v desetinách sekund a v rámci jedné molekulové hmotnosti se příliš nemění. S rostoucí molekulovou hmotností však roste. Stejný trend platí i pro druhý relaxační čas, ten však dosahuje hodnot v jednotkách sekund. Třetí relaxační čas se v rámci jedné molekulové hmotnosti výrazněji mění pouze v případě Hya 300 kDa, kdy je výrazně nižší pro vzorky s obsahem 50 mmol.dm^{-3} CTAB. Čtvrtý relaxační čas se pak u všech vzorků pohybuje v setinách sekund a výrazněji se nemění ani v rámci jedné molekulové hmotnosti, ani při rostoucí molekulové hmotnosti. V druhém případě jen velmi mírně roste. Změny relaxačního času pátého prvku pak opět vykazují trend podobný prvnímu a druhému prvku. V rámci jedné molekulové hmotnosti se příliš nemění, ale mírně rostou s rostoucí použitou molekulovou hmotností.

Všechny dílčí moduly 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 (viz níže).

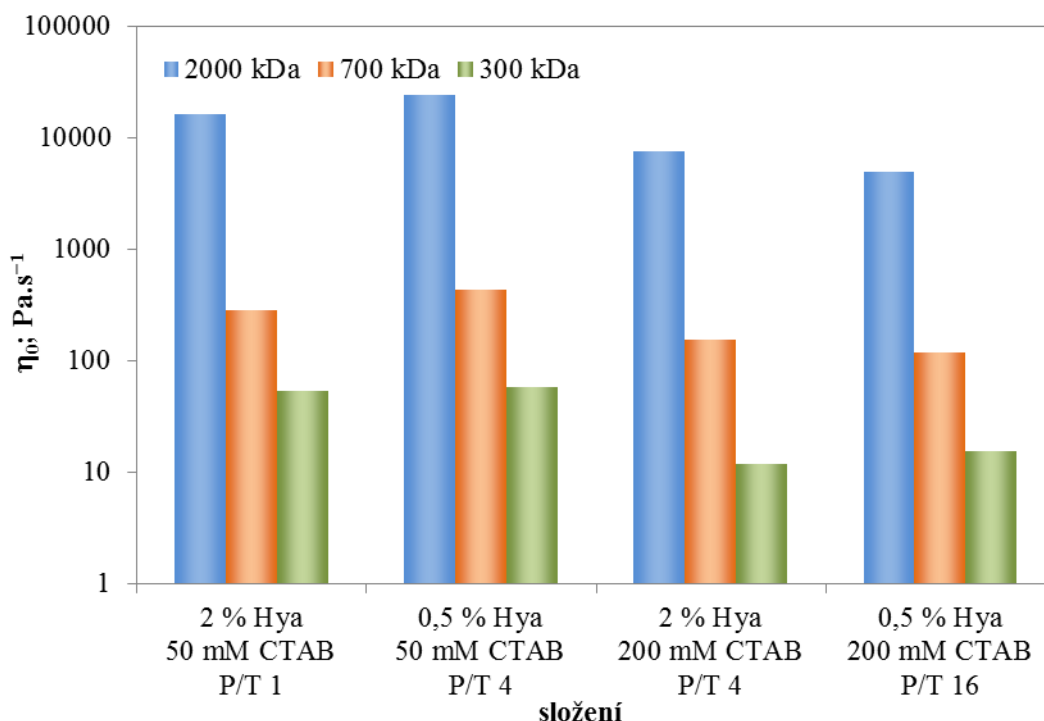
6.2.7.2 Tokové testy



Obr. 78: Tokové křivky vybraných vzorků

Na **obr. 78** jsou znázorněny tokové křivky pro vybrané vzorky o složení Hya 0,5 % hm., CTAB 50 mmol.dm⁻³ a Hya 0,5 % hm., CTAB 200 mmol.dm⁻³ a to pro všechny použité molekulové hmotnosti. Jak je vidět z jejich tvaru, měřené smykové rychlosti byly většinou v první Newtonské oblasti, u všech je pak vidět při vyšších smykových rychlostech pokles hodnot viskozity, což odpovídá pseudoplastickému chování typickému pro roztoky polymerů. U některých je tento pokles mírný u jiných výraznější. Do druhé Newtonské oblasti nezasahuje žádná z křivek.

Hodnoty viskozity při smykových rychlostech blízcích se k nule pro všechny měřené vzorky jsou uvedeny v **tab. 14** a trendy jejich změn v závislosti na složení a molekulové hmotnosti hyaluronanu ilustruje **obr. 79**. Jak je vidět, parametr η_0 se nejvíce mění v závislosti na použité molekulové hmotnosti, kdy pro Hya 300 kDa se jeho hodnota pohybuje v řádu desítek Pa.s⁻¹, pro Hya 700 kDa jsou už hodnoty řádově vyšší a pro nejvyšší použitou molekulovou hmotnost Hya 2000 kDa dosahují dokonce řádu tisíců až desetitisíců. Viskozita tedy s rostoucí molekulovou hmotností významně roste a zároveň klesá tekutost vzorku.



Obr. 79: Závislost parametru η_0 na složení systému a použité molekulové hmotnosti hyaluronanu

Co se týče vlivu poměru P/T je zde opět patrný nesoulad v jeho hodnotách a chování vzorků. Naopak se zde opět vyskytuje vliv koncentrace výchozího roztoku CTAB, kdy vzorky se stejnou výchozí koncentrací tenzidu vykazují podobné chování a to hlavně při nejnižší použité molekulové hmotnosti hyaluronanu, kdy jsou hodnoty viskozity pro danou koncentraci tenzidu velmi podobné, zatímco s rostoucí koncentrací tenzidu, klesá hodnota parametru η_0 . U Hya 700 kDa se v rámci této molekulové hmotnosti projevuje její větší vliv na hodnoty η_0 , než v předchozím případě. Při jedné koncentraci tenzidu už se totiž hodnoty η_0 liší. V rámci 200 mmol.dm⁻³ CTAB jen mírně, kdy s rostoucí koncentrací Hya se mírně zvýší i η_0 . Pro 50 mmol.dm⁻³ CTAB už je změna markantnější a také vykazuje opačný trend, kdy

s rostoucí koncentrací Hya hodnota η_0 klesne téměř na polovinu. Při použití nejvyšší molekulové hmotnosti HyA 2000 kDa se projeví také nejvýraznější vliv právě tohoto parametru, kdy jsou vidět stejné trendy změn jako u Hya 700 kDa, ale markantnější změny v hodnotách parametru η_0 . Při koncentraci 200 mmol.dm⁻³ CTAB opět roste hodnota η_0 s rostoucí použitou koncentrací Hya a to téměř dvojnásobně, zatímco v rámci 50 mmol.dm⁻³ CTAB parametr η_0 s rostoucí koncentrací Hya klesá opět téměř na polovinu, ale změny se pohybují v řádu desetitisíců Pa.s⁻¹. Trendy změn v hodnotách parametru η_0 v rámci jedné molekulové hmotnosti korespondují se změnami shodné hodnoty paměťového a ztrátového modulu v bodě jejich protnutí.

Tab. 14: Hodnoty η_0 stanovené pomocí Crossova modelu

složení			η_0 ; Pa.s ⁻¹
300 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	53,4
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	58,2
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	11,7
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	15,3
700 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	283,3
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	435,8
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	154,4
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	116,4
2000 kDa	2 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	16185
	0,5 % Hya	50 mmol.dm ⁻³ CTAB	24357
	2 % Hya,	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	7441
	0,5 % Hya	200 mmol.dm ⁻³ CTAB	4965

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 molekulové hmotnosti hyaluronanu roste právě s rostoucí hodnotou tohoto parametru. Delší řetězce hyaluronanu 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 zkoumané „gely“ chovají spíše jako viskoelastická kapalina. Gely je tedy lze nazývat pouze z hlediska jejich struktury, kdy jsou řetězce hyaluronanu 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. Potom je na tyto systémy vzniklé interakcí hyaluronanu a opačně nabitého tenzidu možné pohlížet jako na gel i v případě, že reologická měření ukazují, že podle vlastností by měly být hodnoceny spíše jako viskoelastické kapaliny.

7 ZÁVĚR

Souhrnným 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. Cesta k jeho splnění vedla přes několik dílčích úkolů. Prvním z nich bylo zpracování rešerše na dané téma, dále pak na jejím základě navržení a provedení experimentů. Koncovým úkolem bylo vyhodnocení dat a zhodnocení výsledků z hlediska cílených nosičů léčiv.

Dle zadání byla provedena literární rešerše na téma cílená distribuce léčiv a ve spojení s tímto tématem pak zaměřená na interakce polyelektrolyt tenzid obecně, potažmo pak užší zaměření na systémy obsahující hyaluronan.

Z rešerše poté vyplývá, že při navrhování cílených nosičů léčiv je z hlediska pasivního cílení klíčová velikost nosiče, konkrétně zde důležitou roli hraje polymerní povaha nosiče nebo jeho komponenty. Při využití hyaluronanu jako jednoho ze stavebních kamenů je pak tato vlastnost splněna. Navíc molekula hyaluronanu zakomponovaná do nosiče s sebou nese i jinou výhodu a ta spočívá právě ve specifické vazbě této molekuly na receptor CD 44 zajišťující aktivní cílení. Obecně jsou systémy nekovalentně interagujícího polyelektrolytu a opačně nabitého tenzidu potenciálně vhodnými kandidáty pro cílenou distribuci léčiv. Právě fyzikální vázání totiž představuje minimální zásahy do struktury jednotlivých komponent, což s sebou nese výhodu zachování původní biokompatibility a biodegradability jednotlivých složek. Z rešerše také plyne, že důležitou roli hraje právě podrobné prozkoumání interakcí v takovýchto systémech. Neméně důležitou informací je také to, že jako potencionální cílené nosiče léčiv mohou sloužit také kondenzované systémy, které často při určitých koncentracích vznikají v systémech polyelektrolyt - tenzid. Tyto pak ve vhodné formě, například částic nanoskopických rozměrů, poskytnou také výhodu prodlouženého uvolňování aktivní látky.

Na základě provedené rešerše byly provedeny testy interakce hyaluronanu s tenzidy různé povahy a různého chemického složení (kapitola 6.1.1) a to za použití metody fluorescenční sondy. Z těchto výsledků bylo zjištěno, že ve vybraných systémech dochází vlivem přídavku hyaluronanu 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 právě CTAB u něhož byla v prostředí vody i $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 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. Bylo zjištěno, že ve fosfátovém pufru jsou interakce obou komponent v podstatě potlačeny pravděpodobně vysokou iontovou silou a hyaluronan v těchto vzorcích agregaci tenzidu neovlivňuje (kapitola 6.1.3.1).

Ve vodném prostředí však byly výsledky zcela odlišné (kapitola 6.1.3.2). Při těchto testech provedených pomocí metody fluorescenční sondy (pyren) byl použit hyaluronan o různých koncentracích a s různou molekulovou hmotností. Doplnkově byl sledován také vliv koncentrace fluorescenční sondy.

Při nejnižší koncentraci Hya 700 kDa ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) byly na závislostech EmPI a ExPI objeveny dva zlomy. První z nich přísluší CAC tenzidu a tedy vzniku hyaluronanem indukovaných vázaných micel. Druhý zlom charakterizuje CMC, tedy vznik volných micel

tenzidu v roztoku. CAC byla oproti CMC posunuta zhruba o dva řády k nižším hodnotám koncentrace tenzidu, což platilo i pro ostatní systémy. V systému byla navíc zaznamenána oblast fázové separace a to v regionu koncentrací za CAC, kdy se na stěnách vialů usazovala čirá gelovitá fáze. Taková závislost pro daný systém nebyla dosud naměřena.

Při vyšší koncentraci hyaluroanu byla agregace tenzidu ovlivněna ještě více. Nejmarkantnější změnou bylo objevení druhého regionu fázové separace, ve kterém vznikala sraženina. V hodnotách CAC a CMC však s různou koncentrací Hya k příliš velkým změnám nedošlo a ani molekulová hmotnost hyaluronanu neměla na jejich hodnoty vliv.

Výsledky tedy naznačují, že přítomnost Hya díky elektrostatické interakci způsobí změny v agregacním 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 determinujících jejich chování, v tomto systému nemá avizovaný 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 (kapitola 6.1.3.3).

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 [67] 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.

Pro roztoky Hya-tenzid byly také dodavatelsky provedeny prvotní testy hodnotící cytotoxicitu (kapitola 6.1.3.4). Při nich bylo zjištěno, že úmrtnost buněk se příliš nelišila ve vzorcích bez přídavku i s přídavkem hyaluronanu. Hya tedy cytotoxicitu CTAB téměř neovlivňuje, což odpovídá předpokladu o nezměněných vlastnostech fyzikálně vázaných komponent v systému a vyvrací očekávání snížené toxicity tenzidu díky vazbě na Hya. V tomto směru je však nutné provést další navazující testování.

S ohledem na sporné použití CTAB v aplikovaných nosičích léčiv byly provedeny experimenty s hydrofobně modifikovanými aminokyselinami, které měly sloužit jako náhrada CTAB (kapitola 6.1.4). Výsledky ukázaly, že takto modifikované aminokyseliny se do jisté míry chovají stejně jako tenzidy, myšleno z hlediska samovolné agregace v roztoku a schopnosti solubilizovat hydrofobní látky, ale jejich interakce s hyaluronanem 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. Tyto experimenty by mohly být pokračováním této práce.

Samostatným poměrně rozsáhlým celkem se pak stala část mapující vlastnosti kondenzovaných systémů vznikajících interakcí Hya-CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$. Jako

první byly provedeny experimenty charakterizující podmínky jejich vzniku (kapitola 6.1.2) a některé jejich vlastnosti důležité z hlediska cílených nosičů léčiv. S tím bylo spojeno hlavně provedení solubilizačních testů (kapitola 6.2.2). 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 (kapitola 6.2.6) 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 (kapitola 6.2.7) 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 vlastností 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.

8 LITERATURA

- [1] Rabišková, M.: Od Galéna k lékovým systémům. *Remedia*, 2006, č. 4, s. 427-431
- [2] Moss, J. D., Langer, R.: Drug delivery mechanisms. *Principles of Pharmacology*, 2004, vyd. Golan DE, Tashian AH, et al. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia-Baltimore-New York-London, s. 781-787
- [3] Oficiální stránky Světové zdravotnické organizace; údaje o úmrtnosti na rakovinu, dostupné z <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.A864>>, cit. 26.8.2013
- [4] Kněžková, B.: *Moderní protinádorová léčiva*. Brno, 2007. 39 s., Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, katedra biochemie. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
- [5] Gaucher, G., Dufresne, M., Sant, V., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J.: Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2005, č. 109, s. 69-188
- [6] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K.: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, 2000, č. 65, s. 271-284
- [7] Hrubý, M., Kučka, J., Kozempel, J., Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 2006, č. 100, s. 10-16
- [8] Rabišková, M.: Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*, 2007, č. 17, s. 495-501
- [9] Hadašová, E.: Liposomální lékové formy. *Remedia*, 2006, č. 16, s. 433-437
- [10] Jones, M., Leroux, J.: Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1999, č. 48, s. 101-111
- [11] Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, Ch., Stscherbina, D.: *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser/Gardner Publications, Inc, 1994, str. 1-3, ISBN 3-446-17127-3
- [12] Dobrynin, A., Rubinstein, M.: Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 2005, č. 30, s. 1049-1118
- [13] Radeva, T.: *Physical chemistry of polyelectrolytes*. Marcel Dekker, Inc. 2001, s. 794-796, ISBN 0-8247-0463-0
- [14] Kogej, K., Evmenenko, G., Theunissen, E., Berghmans, H., Reynares, H.: Investigation of Structures in Polyelectrolyte/Surfactant Complexes by X-ray Scattering. *Lagmuir*, 2001, č. 17, s. 3175-3184
- [15] Cabane B.: Structure of some polymer–detergent aggregates in water. *Journal of Physical Chemistry*, 1977; č. 81, s. 1639-1645.
- [16] Skerjanc, J., Dolar, D.: Thermodynamic properties of a polyelectrolyte solution containing a mixture of counterions differing in charge. *Journal of Physical Chemistry*, 1989; č. 91, s. 6290–6294.
- [17] Cowman, K. M., Matsuoka, S.: Experimental approaches to Hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 2005, č. 340, s. 791-809
- [18] Hascall, C. V., Laurent, C. T.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 26. 8. 2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>

- [19] Jacoboni, I., Valdre, U., Mori, G., Quaglino, D. Jr., Pasqualli-Ronchetti, I.: Hyaluronic acid by Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology*, 1999, č. 126, s. 52-58
- [20] Scott, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 26.8.2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [21] Lee, J. Y., Spicer, P. A.: Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current opinion in structural biology*, 2000, č. 12, s. 581-586
- [22] Day, A. J., Sheenan, J. K.: Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current opinion in structural biology*, 2001, č. 11, s. 617-622
- [23] Hascall, C. V., Laurent, C. T. Dr.: Hyaluronan: structure and physical properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 26. 8. 2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [24] Weigel, P. H.: Bacterial Hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 26. 8. 2013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [25] Mohanambe, L., Vasudevan, S.: Aromatic molecules in restricted geometries: Pyrene excimer formation in an anchored bilayer. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, č. 110, s. 14354-14354
- [26] Atkins, P. W., Friedman R. S.: *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press, 1999. ISBN 0-19-855947-X.
- [27] Condon, E.: A theory of intensity distribution in band systems. *Physical Review*, 1926, č. 28, s. 1182-1201
- [28] Beranová, L., Humpolíčková, J., Hof, M.: Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*, 2009, č. 103, s. 125-129
- [29] Macosko, Ch. W.: *Rheology: Principles, measurements, and applications*. Wiley-vch, 1994, ISBN: I-56081-579-5
- [30] Morrison, A. F.: *Understanding Rheology*. Oxford University Press, 2001, ISBN 0-19-514166-0.
- [31] Barnes, H. A., Hutton, J. F., Walters, K.: *An introduction to rheology*. Elsevier, rheology series, 1989, ISBN: 0-444087140-3
- [32] Cross, M. M.: Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*, 1965, č. 20, s. 417-437
- [33] Carreau, J. P., MacDonald, I. F., Byron Bird, R.: A nonlinear viscoelastic model for polymer solutions and melts-II. *Chemical Engineering Science*, 1968, č. 23, s. 901-911
- [34] 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
- [35] Petrak, K.: Essential properties of drug-targeting delivery system. *Drug discovery today*, 2005, č. 10, s. 1667-1673
- [36] 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

- [37] Prestwich, G. D.: Biomaterials from chemically-modified Hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2001, [cit. 26. 8. 20013], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [38] 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
- [39] Pure, E., Cuff, A. C.: A crucial role of CD 44 in inflammation. *Trends in molecular medicine*, 2001, č. 7, s. 213-221
- [40] Rousseau, V. O.: CD 44, a therapeutic target for matastasing tumors. *European journal of cancer*, 2010, č. 46, s. 1271-1277
- [41] 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
- [42] Isacke, M. C., Yarwood, H.: The hyaluronan receptor CD 44. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, č. 34, s. 718-721
- [43] 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
- [44] Knudson, W., Chow, G., Knudson, Ch. B.: CD-44 mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*, 2002, č. 21, s. 15-23
- [45] Naor, D., Wallach-Dayana, 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
- [46] 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
- [47] Brown, T.: The development of Hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, č. 9, s. 253-260
- [48] Bro Cai, S., Xie, Y., Bagby, T., Cohen, M., Forrest, M.: Intralymphatic chemotherapy using a Hyaluronan-cisplatin conjugate. *Journal of surgical research*, 2008, č. 147, s. 247-252
- [49] Li, S., Howell, S.: CD44-Targeted microparticles for delivery of cisplatin to peritoneal metastases. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, č. 7, s. 280-290
- [50] Kafedjiiski, K., Jeti, R., Föger, F., Hoyer, H., Werle, M., Hoffer, M., Schnürch, A.: Synthesis and in vitro evaluation of thiolated Hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 2007, č. 343, s. 48-58
- [51] Esposito, E., Menegatti, E., Cortesi, R.: Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *International journal of pharmaceutics*, 2005, č. 288, s. 35-49
- [52] Jiang, G., Park, K., Kim, J., Kim, K., Hahn, S.: Target specific intracellular delivery of SiRNA/PEI-HA complex by receptor mediated endocytosis. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, č. 6, s. 727-737

- [53] Lee, H., Lee, K., Park, T.: Hyaluronic acid-Paclitaxel conjugate micelles: Synthesis, characterization and antitumor activity. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, č. 19, s. 1319-1325
- [54] Luo, Y., Prestwich, D.: Synthesis and selective cytotoxicity of a Hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, č. 10, s. 755-763
- [55] Yim, H., Na, K.: Polycationic Nanodrug Covered with Hyaluronic Acid for Treatment of P-Glycoprotein Overexpressing Cancer Cells. *Biomacromolecules*, 2010, č. 11, s. 2387-2393
- [56] 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
- [57] 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
- [58] 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
- [59] 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
- [60] 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
- [61] Vermonden, T., Censi, R., Hennik, W. E.: Hydrogels for protein delivery. *Chemical Reviews*, 2012, č. 112, s. 2853-2888
- [62] 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
- [63] 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
- [64] 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
- [65] 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
- [66] 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

- [67] 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
- [68] 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
- [69] Kizilay, E., Maccarrone, S., Foun, E., Dinsmore, A. D., Dubin, P. L.: Cluster formation in polyelectrolyte–micelle complex coacervation. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, č. 115, s. 7256-7263
- [70] Quemeneur, F., Rinaudo, M., Donat, B.: Influence of polyelectrolyte chemical structure on their interaction with lipid membrane and zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules*, 2008, č. 9, s. 2237-2243
- [71] Ronchetti, Y., Quaglino, D., Mori, G., Bacchelli, B.: Hyaluronan-phospholipid interactions. *Journal of structural Biology*, 1997, č. 120, s. 1-10
- [72] Crescenzi, V., Taglienti, A., Ronchetti, I.: Supramolecular structures prevailing in aqueous Hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004, č. 245, s. 133-135
- [73] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between Hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478 1483
- [74] Thalberg, K., Lindman, B.: Gel formation in aqueous system of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*, 1991, č. 7, s. 277 283
- [75] 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
- [76] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide Hyaluronan water. *Journal of Physical Chemistry*, 1990, č. 94, s. 4289 4295
- [77] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370 3376
- [78] 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
- [79] 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
- [80] De, S., Girigoswami, A., Das, S.: Fluorescence probing of albi-mun-surfactant interaction. *Journal of colloid and interface science*, 2005, č. 285, s. 562-573
- [81] 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

- [82] 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
- [83] 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
- [84] 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
- [85] 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
- [86] 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 -cyclodextrin. *Langmuir*, 2013, č. 29, s. 3188-3194
- [87] Liao, X., Higgins, D. A.: Scanning probe microscopy studies of mesostructured nonstoichiometric polyelectrolyte-surfactant complexes. *Langmuir*, 2002, č. 18, s. 6259-6265
- [88] 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
- [89] 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
- [90] Kim, S. A., Schwille, P.: Intracellular applications of fluorescence correlation spectroscopy: prospects for neuroscience. *Current opinion in neurobiology*, 2003, č. 13, s. 583-590
- [91] Riegler, R.: Fluorescence and single molecule analysis in cell biology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, č. 396, s. 170-175
- [92] Chiantia, S., Ries, J., Schwille, P.: Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2009, č. 1788, s. 225-233
- [93] 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
- [94] 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
- [95] 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

- [96] 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
- [97] 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
- [98] Meunier, F., Wilkinson, J. K.: Nonperturbing fluorescent labeling of polysaccharides. *Biomacromolecules*, 2002, č. 3, s. 857-864
- [99] 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
- [100] 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
- [101] 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
- [102] 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
- [103] 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
- [104] 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
- [105] 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
- [106] 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
- [107] 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
- [108] 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
- [109] 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

- [110] 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
- [111] 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
- [112] 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
- [113] Rinaudo M.: Rheological investigation on hyaluronan-fibrinogen interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, č. 43, s. 444-450
- [114] Fukada, K., Suzuki, E., Seimiya, T.: Rheological properties of sodium hyaluronate in decyltrimethylammonium bromide aqueous solutions. *Langmuir*, 1999, č. 15, s. 4217-4221
- [115] 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
- [116] 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
- [117] 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
- [118] 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
- [119] Oficiální stránky výrobce hyaluronanu Contipro Group dostupné z <<http://www.contipro.com/sodium-rhodaminylamino-hyaluronate-detail>>, cit. 9.3.2013
- [120] Klán, K. P.: *Organická fotochemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-2102526-3.
- [121] 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
- [122] Schnitzler, F., Sequaris, J.: Sorption properties of hydrophobically modified poly(acrylic acid) as natural organic matter model substances to pyrene. *Colloids and Surfaces A: Physiochem . Eng. Aspects*, 2005, č. 260, s. 199-128
- [123] Wolszczak, M., Miller, J.: Characterization of non-ionic surfactant aggregates by fluorimetric techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002, č. 147, s. 45-54

- [124] Pi, Y., Shang, Y., Liu, H. et al.: Salt effect on the interactions between gemini surfactant and oppositely charged polyelectrolyte in aqueous solution. *Jornal of Colloid and Interface Science*, 2007, č. 306, s. 405 – 410
- [125] Ghoneim, N.: Photophysics of nile red in solution. Steady state spectroscopy. *Spectrochimica acta*, 2000, č. 56, s. 1003-1010
- [126] Dutta, A., Kamada, K., Ohta, K.: Spectroscopic studies of nile red in organic solvents and polymers. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 1996, č. 93, s. 57-64
- [127] 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
- [128] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, ISBN: 3-527-60024-8
- [129] 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
- [130] 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
- [131] 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

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ADH	dihydrazid adipové kyseliny
BCS	β -kasein
CAC	kritická agregační koncentrace
catHEC	kationicky modifikovaná hydroxyetyl celulóza
CD 44	specifický receptor pro hyaluronan
CMC	kritická micelární koncentrace
C _n TAB	alkyltrimetylamonium bromid s n počtem uhlíků v alkylovém řetězci
CTAT	cetyltrimetylamonium <i>p</i> -toluensulfonát
Cys	cystein
C ₁₂ DMPO	dodecyldimetylfosfin
DE	[2-(2,3-didodecyloxypropyl)hydroxyetyl] amonium bromid
DOPE	dioleoylfosfatidyletanolamin
DoTAB	dodecyltrimetylamonium bromid
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholinu
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitací polaritní index
Ex:Mo	poměr intenzity pásu monomeru ku pásu excimeru
excimer	excitovaný dimer
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FLCS	časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie
HAS, HAS2, HAS3	hyaluronansyntázy
HDI	hexametylen-1,6-diisokyanát
HRA	konjugát kyseliny retinové a hyaluronanu
Hya	hyaluronan
MSD	střední kvadratický posun částice
M _w	molekulová hmotnost
NaPA	polyakrylát sodný
NaPSS	polystyrensulfonát sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDADMAC	polydiallyldimetylamonium chlorid
PEI	polyetylenimin
PF 127	Pluronic F127
PVA	polyvinylalkohol
rhHya	rhodaminovaný hylauronan
SDS	dodecylsulfát sodný
TTAB	tetradecyltrimetylamonium bromid
TX100	Triton X100

9.2 Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
A	plocha
A_1	horní limita Boltzmannova modelu
A_2	spodní limita Boltzmannova modelu
C	lokální koncentrace částic (kapitola 2.3.2.1)
D	difúzní koeficient
dt	časová prodleva
E	modul pružnosti
F	smyková síla (kapitola 2.4.1)
$F(t)$	intenzita fluorescence (kapitola 2.3.2.1)
G	modul pružnosti ve smyku (kapitola 2.4.1)
$G(\tau)$	autokorelační funkce (kapitola 2.3.2.1)
G'	paměťový modul
G''	ztrátový modul
G_i	modul pružnosti ve smyku pro j -tý prvek
G_{inf}	posunutí FCS křivky v nekonečném čase
j	počet jednoduchých Maxwellových prvků
K	konzistence
M	krouticí moment
m	rychlostní index
$m_{suš}$	hodnota sušiny v hmotnostních procentech označena
m_{pop}	ustálená hmotnost popela
N	počet částic v detekčním objemu
N_A	Avogadrovo číslo
n_{Dif}	počet nezávisle difundujících částic
P/T	poměr počtu vazných míst na polyelektrolytu při jeho úplné disociaci (P) a počtu jednolivých molekul tenzidu (T)
r	poloha vrstvy vzorku
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T	celkový čas (kapitola 2.3.2.1)
T_f	tmavá (tripletní) frakce molekul
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
T_2	druhý excitovaný tripletový stav molekuly
t_{inf1}	teplota při které je ze vzorku odpařena většina vody
$t_{poč1}$	teplota při které se voda ze vzorku začíná uvolňovat
t_{inf2}	teplota charakterizující spálení většiny vzorku
$t_{poč2}$	teplota charakterizující počátek degradace
v	rychlost
V_{ef}	efektivní detekční objem
w_0	charakteristický rozměr detekčního objemu v ohniskové rovině objektivu
Δx	sklon Boltzmannova modelu
x	inflex Boltzmannova modelu
z_0	charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu

α	koeficient anomální difúze (kapitola 5.3.2.3)
α	úhel který svírá kužel s deskou (kapitola 5.3.5)
γ	smykový úhel
γ_{xy}	smyková rychlost nebo také rychlost smykové deformace
δ	okamžitá odchylka signálu od jeho průměrné hodnoty
η	newtonská neboli limitní viskozita
η_0	asymptotická hodnota viskozity při velmi nízkých smykových rychlostech
η_∞	asymptotická hodnota viskozity při velmi vysokých smykových rychlostech
λ	vlnová délka
λ	relaxační čas (kapitola 2.4.3.1)
λ_i	relaxační čas pro j -tý prvek
κ	poměr délky z_0 a laterálního poloměru w_0 efektivního excitačního objemu V_{ef}
ρ_i	příspěvek i -té složky k celkovému zastoupení difúzních časů
σ	smykové napětí
τ	smykové neboli tečné napětí
τ_{Dif}	difúzní čas
τ_{Trip}	doba života tripletního stavu
Ω	úhlová rychlost
$[]$	koncentrace
$\langle \rangle$	průměrná hodnota v čase

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1: Zpráva shrnující výsledky testů cytotoxicity

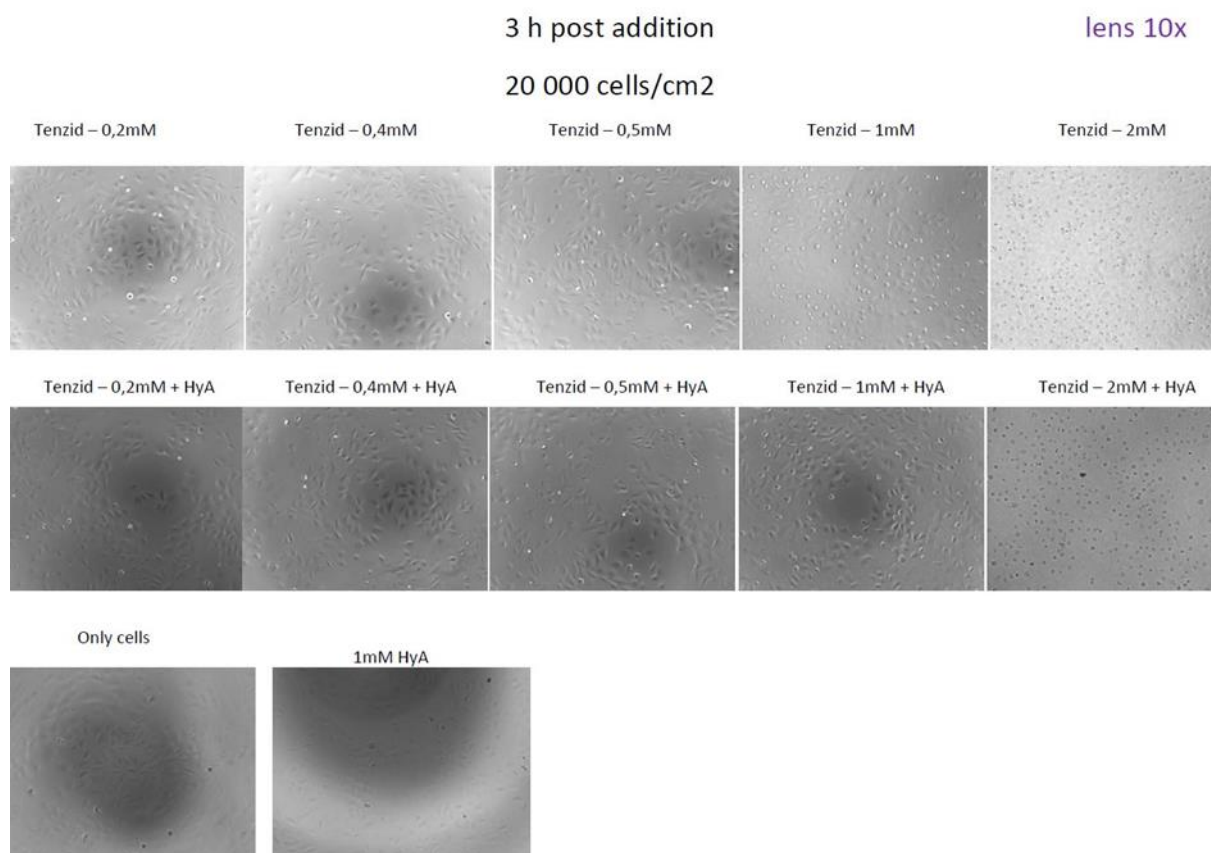
HyA 01

Date: 29.7.2012
Cells: SAOS-2 – 20 000 cells/cm²
– 40 000 cells/cm²

Procedure: Cell were seeded in two concentrations. Next day was added tenzid and HyA:
- 3 h and 5 h incubation in McCoy's + 15% FBS + tenzid (+HyA)
- 24 h incubation in McCoy's + 15% FBS + tenzid (+HyA)

Staining: - Live/dead kit (Molecular Probes) – 5 h and 24 h pa (post adding)
- MTS (Promega) – 24 h pa

Variables: presence of tenzid – CTAB – concentrations – 0.2, 0.4, 0.5, 1 and 2 mM
presence of Hyaluronic acid – concentration – 1g/l (alone or with tenzid)



HyA01, 31.7.12, MK, MV

24 h post addition

lens 10x

20 000 cells/cm²

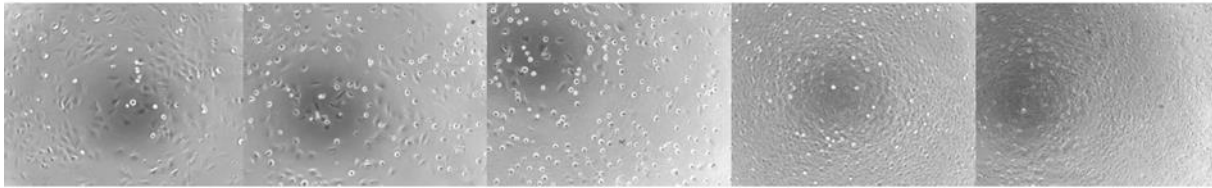
Tenzid – 0,2mM

Tenzid – 0,4mM

Tenzid – 0,5mM

Tenzid – 1mM

Tenzid – 2mM



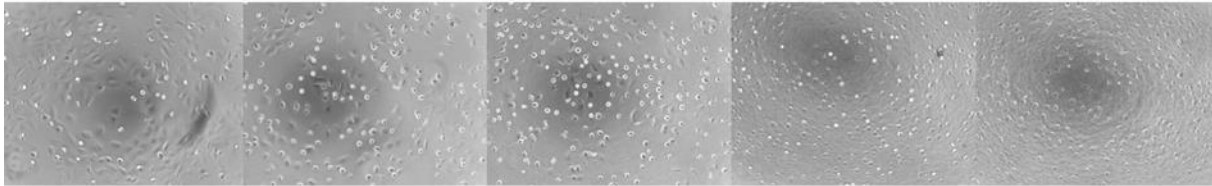
Tenzid – 0,2mM + HyA

Tenzid – 0,4mM + HyA

Tenzid – 0,5mM + HyA

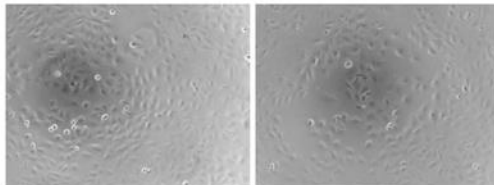
Tenzid – 1mM + HyA

Tenzid – 2mM + HyA



Only cells

1mM HyA



24 h post addition

lens 10x

40 000 cells/cm²

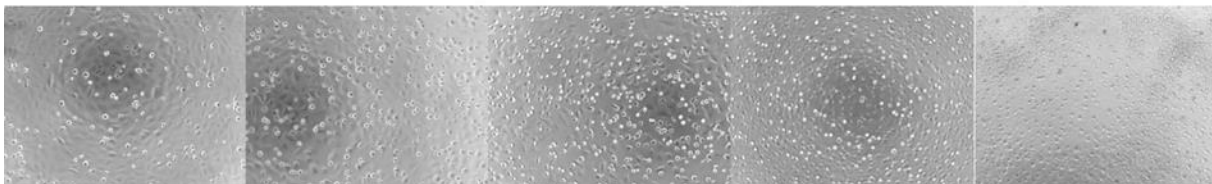
Tenzid – 0,2mM

Tenzid – 0,4mM

Tenzid – 0,5mM

Tenzid – 1mM

Tenzid – 2mM



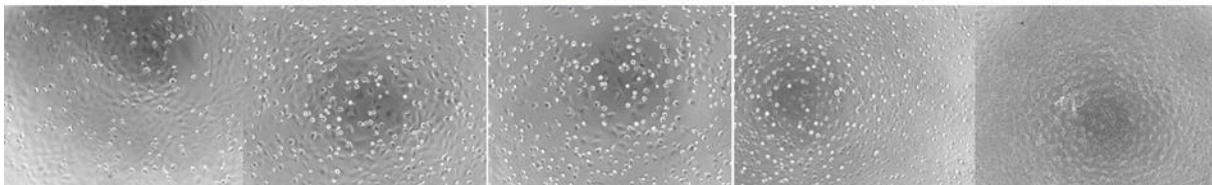
Tenzid – 0,2mM + HyA

Tenzid – 0,4mM + HyA

Tenzid – 0,5mM + HyA

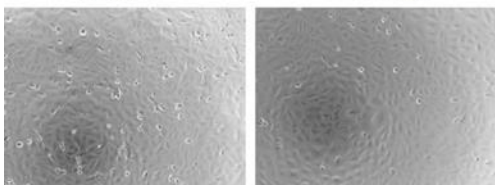
Tenzid – 1mM + HyA

Tenzid – 2mM + HyA



Only cells

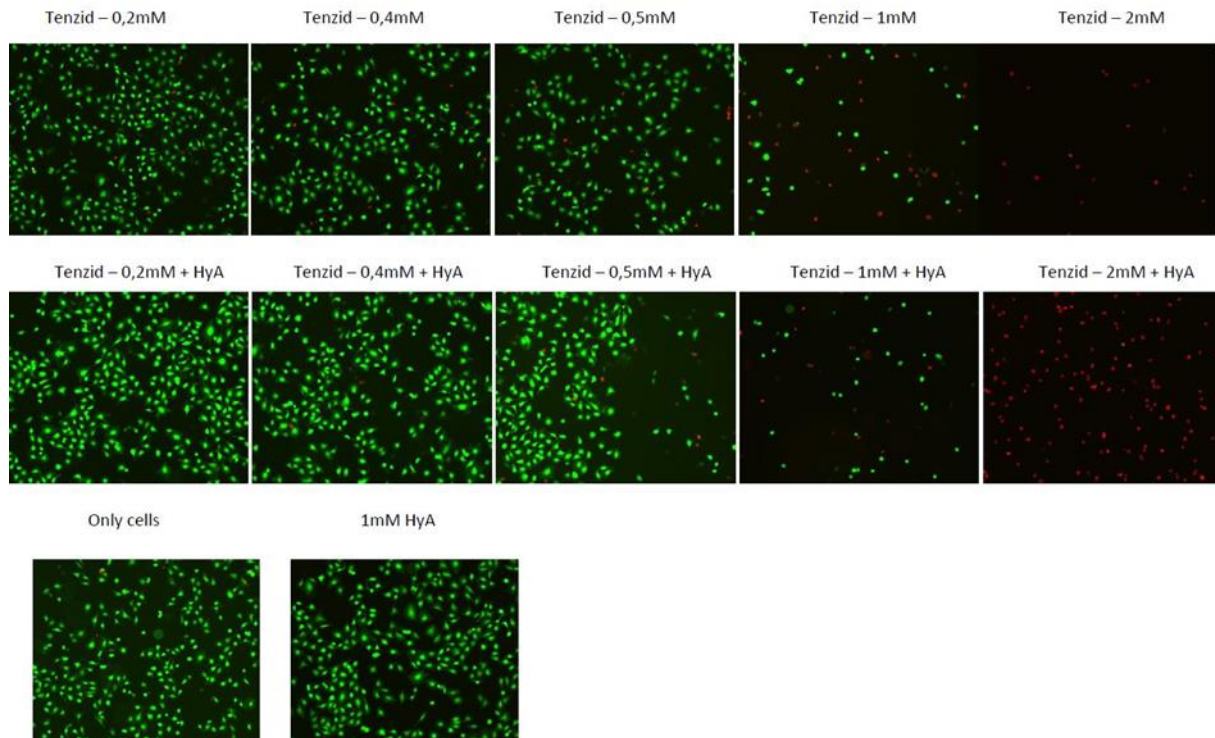
1mM HyA



5 h post addition – Live/dead kit

lens 10x

20 000 cells/cm²

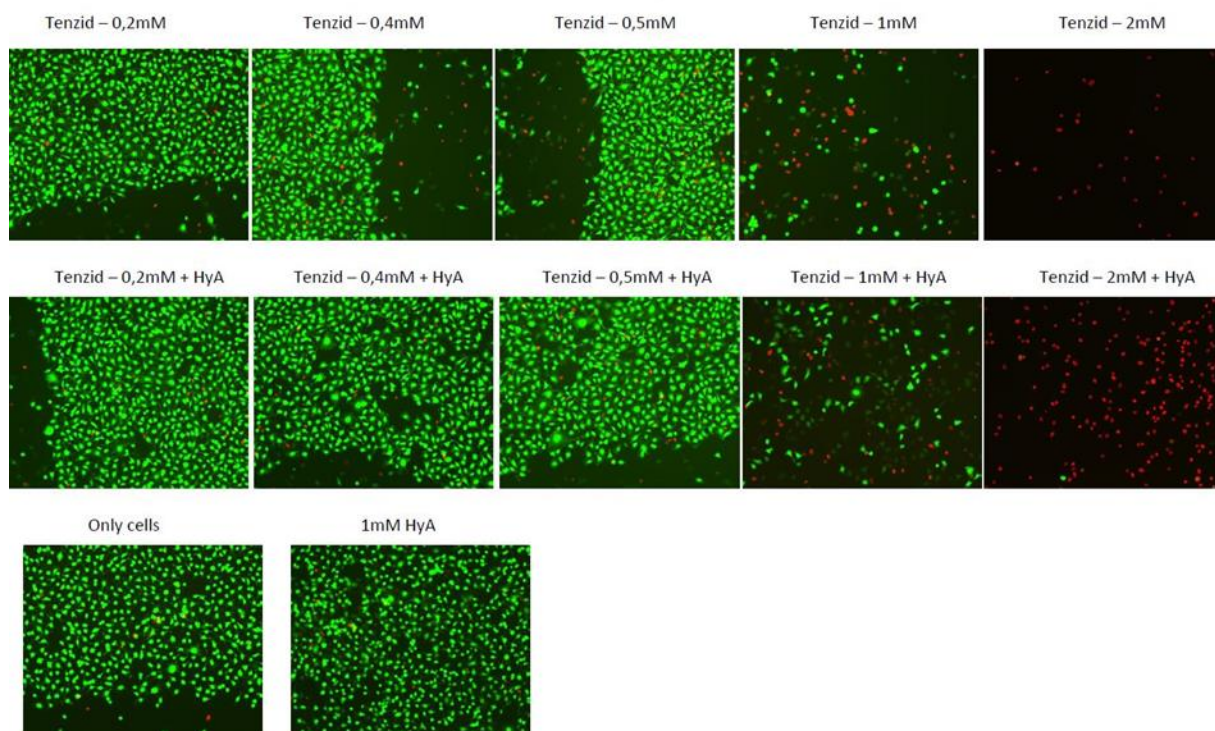


HyA01, 31.7.12, MK, MV

5 h post addition – Live/dead kit

lens 10x

40 000 cells/cm²

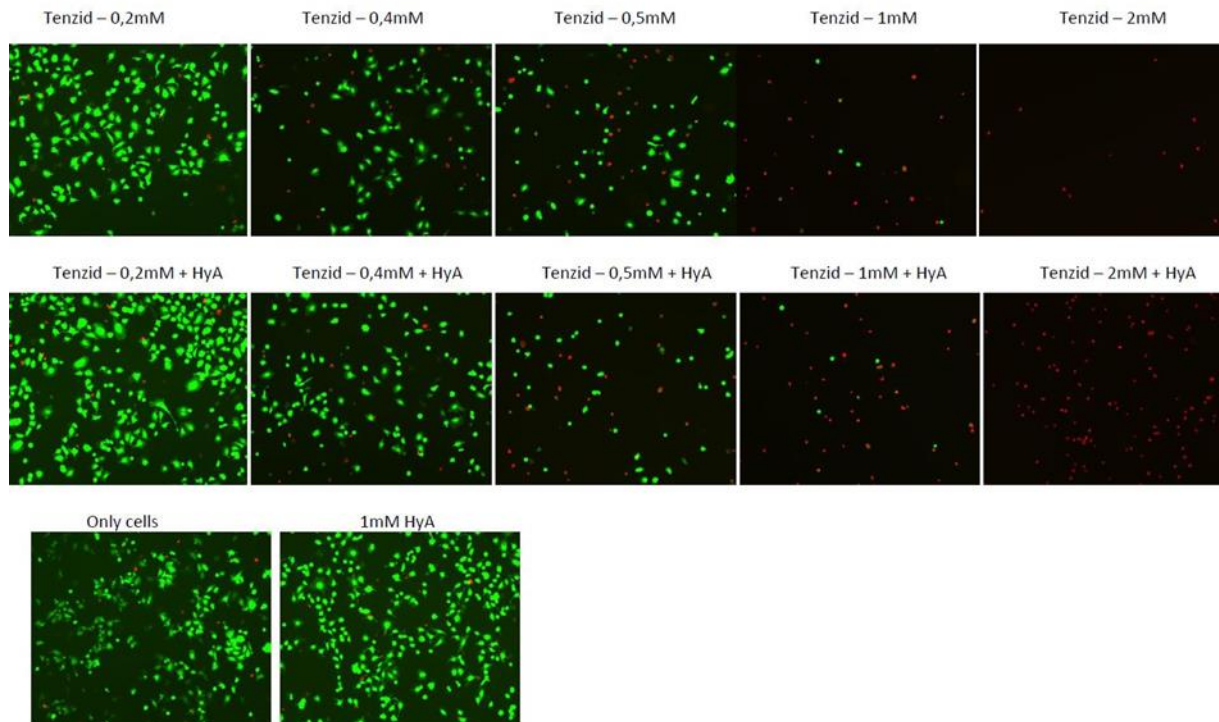


HyA01, 31.7.12, MK, MV

24 h post addition – Live/dead kit

lens 10x

20 000 cells/cm²

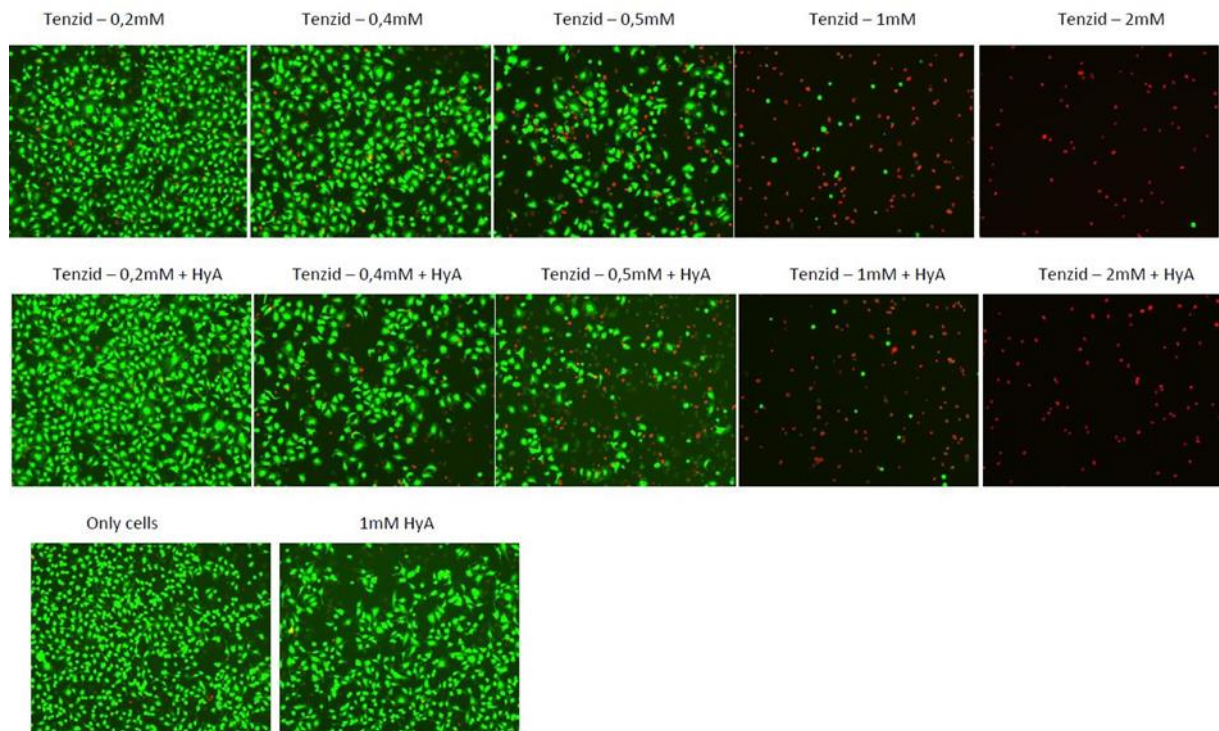


HyA01, 31.7.12, MK, MV

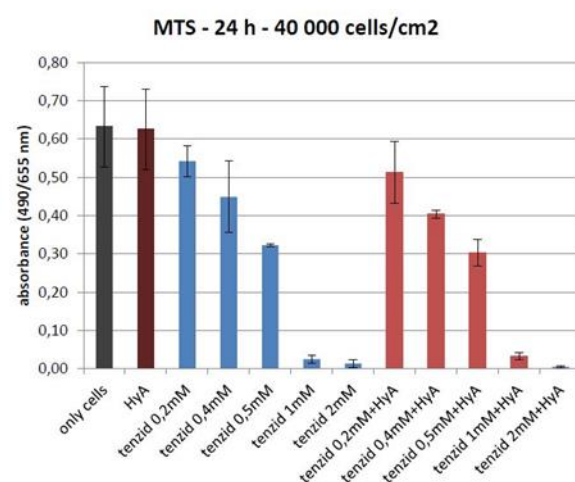
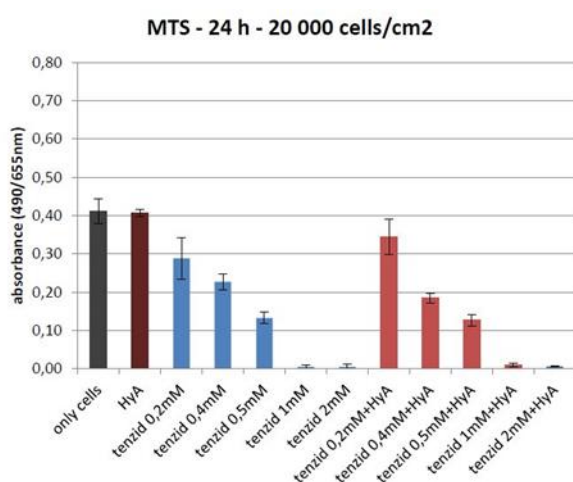
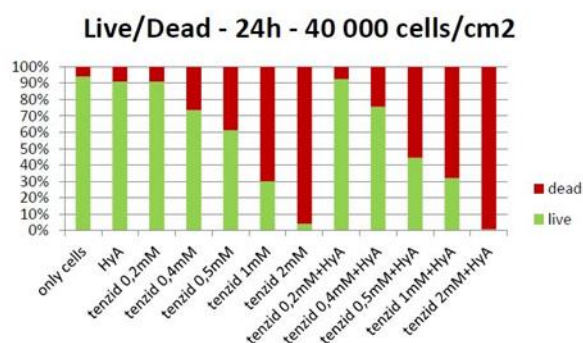
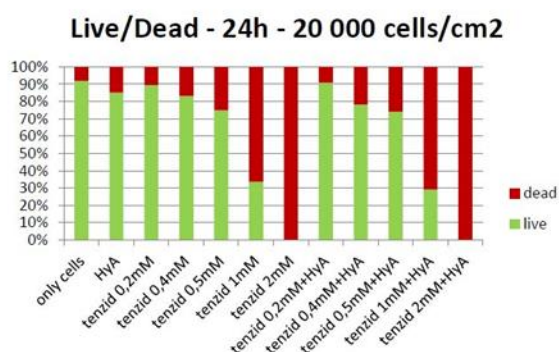
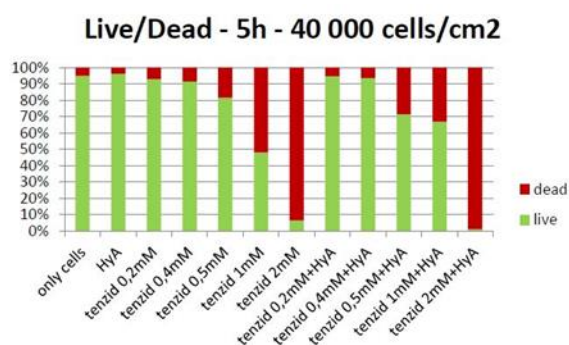
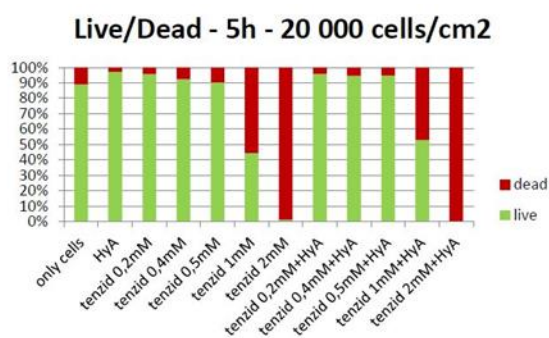
24 h post addition – Live/dead kit

lens 10x

40 000 cells/cm²



HyA01, 31.7.12, MK, MV



Conclusion:

2mM CTAB is cytotoxic (toxic for cells) already after 5h (almost 100% dead cells). The same situation is in presence of HyA with tenzid.

0,2mM CTAB is not cytotoxic after 5h and 24h.

0,4mM CTAB is not cytotoxic after 5h but after 24h is slightly cytotoxic.

Cytotoxic effect of 0,5mM and 1mM CTAB is bigger after 24h than after 5h.

Various concentrated cells behaved similarly (Live/Dead).

HyA alone has similar values (MTS, Live/Dead) as positive control (only cells) – HyA does not have cytotoxic effect.

It seems that presence of HyA (together with tenzid) does not have any effect.

10.2 Příloha 2: Článek kapitola 6.1.1

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 391 (2011) 25–31



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

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



Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques

T. Halasová, J. Krouská, F. Mravec, M. Pekař*

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Centre for Materials Research CZ.1.05/2.1.00/01.0012, Purkyňova 118, Brno CZ-61200, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2011

Received in revised form 16 May 2011

Accepted 18 May 2011

Available online 27 May 2011

Keywords:

Fluorescence probes

Hyaluronan

Polyelectrolyte-surfactant interactions

Surfactants

ABSTRACT

Interactions of hyaluronan of two molecular weights with surfactants of different types were studied in NaCl solution. Results showed that although the presence of NaCl may suppress interactions between oppositely charged polyelectrolyte and surfactant, the interactions are still present in some hyaluronan-surfactant systems regardless the surfactant ionic nature. These interactions were demonstrated mainly by fluorescence probe techniques whereas tensiometry detected only minor effects. Fluorescence data showed that formation of aggregates (micelles) occurs rather in a certain interval of surfactant concentrations than in a single point, especially in the presence of hyaluronan. The greatest influence of hyaluronan was observed on nonionic Tween 20 and cationic cetyl trimethylammonium bromide.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hyaluronan is a naturally occurring polysaccharide, commonly found in connective tissues in the body such as vitreous, umbilical cord and joint fluid [1]. As a component of the extracellular matrix, hyaluronan plays an important role in lubrication, water sorption, water retention, and a number of cellular functions such as attachment, migration, and proliferation [2–6]. Hyaluronan is therefore an attractive building block for new biocompatible and biodegradable polymers that have applications in drug delivery, tissue engineering, and viscosupplementation [7–9]. It is a negatively charged monotonic co-polymer with repeating disaccharide unit composed of D-glucuronate and N-acetyl-D-glucosamine residues linked by $\beta(1\text{--}4)$ and $\beta(1\text{--}3)$ bonds, which are connected to unbranched chains [10].

Hyaluronan is a unique molecule not only from the view of physical properties but also from the view of its biological properties. It is of great interest that such a simple molecule that hyaluronan can exercise so many biological functions. In tissues, hyaluronan is mostly found as a high-molecular compound. In addition to these macromolecules there are also products of hyaluronan degradation in tissues, fragments with much lower molecular weight. Just in different molecular weights of hyaluronan lies the diversity of its biological functions [4,5].

Cells possess several specific receptors recognizing hyaluronan, among them CD44 is probably the most important, which further enhances its potential for application in targeted drug delivery systems. Hyaluronan is highly hydrophilic biopolymer with massive hydration shell and cannot be directly used to carry nonpolar substances. Because many efficient drugs, e.g. for fighting cancer, are hydrophobic, hyaluronan has been chemically modified, hydrophobized, to induce micelle-like properties or directly conjugated with hydrophobic biologically active molecules (drugs). Besides chemical modifications which could change also biological activity or compatibility of hyaluronan, physical interactions with suitable molecular partner may be another way to solubilize hydrophobes in the presence of hyaluronan. For example, combination of hyaluronan with surfactant may lead to formation of associates in which the surfactant hydrophobic domains solubilize hydrophobes and hyaluronan plays a role of biocompatible carrier and targeting agent.

Hyaluronan-surfactant interactions were subject of several previous studies. Because of negative hyaluronan charge almost all of them used cationic surfactants. Only Yin et al. [11] reported some results obtained with anionic and nonionic surfactants. Hyaluronan interactions with cationic surfactants were studied as a specific case of general polyelectrolyte-surfactant interactions to elucidate their phase behavior and physical causes of their interactions including the effect of electrolytes. Little is still known about solubilization in hyaluronan-surfactant associates, especially at physiological ionic conditions.

Detailed study on phase behavior of systems containing water, hyaluronan, alkyl trimethylammonium bromides (tetradecyl derivative was the most studied type) and salt (mostly NaBr)

* Corresponding author. Tel.: +420 541149330; fax: +420 541149398.

E-mail addresses: xchlasova@fch.vutbr.cz

(T. Halasová), xckrouska@fch.vutbr.cz (J. Krouská), mravec@fch.vutbr.cz (F. Mravec), pekar@fch.vutbr.cz (M. Pekař).

was published in a series of papers by Swedish researchers [12–18]. They found that there is a certain cationic surfactant concentration below which only general electrostatic interactions take place and only above it marked formation of hyaluronan-surfactant complexes can be observed. Their results indicated strong cooperativity of surfactant binding on hyaluronan macromolecule resulting in binding in the form of micelle-like clusters in which both hyaluronan carboxylates and background electrolyte anions participate as counterions. Increasing electrolyte (salt) concentration disfavored formation of hyaluronan-bound micelles in comparison to free micelles. The authors constructed phase diagrams for studied systems which essentially contain an area of homogeneous single phase surrounding two-phase region. Phase separation was observed as formation of precipitate or gel-like phase upon increasing surfactant concentration. Increasing concentration of added salt reduced the two-phase area unless the salt concentration was very high when phase separation occurred again. Binding of surfactant to hyaluronan was detected for surfactants with alkyl chain consisting from at least ten carbon atoms. The longer the surfactant alkyl chain the larger two-phase region was observed.

Yin et al. [11] used pyrene fluorescence to investigate interactions of (high molecular weight) hyaluronan with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) and nonionic Cremophor EL and Tween 80 in water. Practically no interactions between hyaluronan and nonionics were detected whereas certain decrease of SDS critical micellar concentration was observed. Hyaluronan in SDS solutions thus acts similarly as low molecular weight electrolyte as demonstrated by similar experiments with surfactant solutions free of hyaluronan but containing sodium chloride. This was explained by interactions of SDS polar heads with domains formed by hyaluronan hydroxyls.

The aim of this work was to obtain additional information on hyaluronan-surfactant interactions in solutions with physiological salt concentration by tensiometry and fluorescence probe techniques. Tensiometry gives information primarily on the solution surface layers and interactions therein and indirectly information on the bulk solution, especially on micellization (aggregation). Fluorescence probe informs on its local environment in solution, on domains where it can be dissolved or solubilized in solution. From this information deductions on aggregation in solution can be also made and on solubilizing properties of domains formed by aggregates. All this information is a base for design of hyaluronan-surfactant systems for targeted delivery of nonpolar biologically active substances (e.g., drugs). Fluorescence technique is not limited here to pyrene, perhaps the most popular probe for aggregation studies and determining critical micellar concentrations. Nile red was used as an additional, comparative probe that can also provide additional information on solubilizing hydrophobic domains [19–21]. Though pyrene is considered to be nonpolar its limited solubility in water is still high enough to produce remarkable fluorescence signal. Nile red fluorescence is quenched by water [22,23] therefore only those molecules give sufficient fluorescence intensity that is in the water-free domains. Pyrene as well as nile red can interact with charged parts of ionic surfactants. This means that both probes are located in the micellar palisade layer which still contains some water molecules. Whereas pyrene fluorescence occurs also from aqueous environment the nile red fluorescence from the water-rich palisade layer should be quenched. In the case of non-ionic surfactant also hydrogen bond interactions can be expected between nile red and surfactant. Direct interaction of this probe with surfactant can decrease its fluorescence intensity.

2. Materials and methods

Hyaluronan of two molecular weights (90 kDa and 1.4 MDa, i.e. the low and high molecular weight, respectively) was pur-

chased from CPN, Ltd., Czech Republic. Surfactants tetradecyl trimethylammonium bromide (TTAB, cationic), cetyl trimethylammonium bromide (CTAB, cationic), cetyl trimethylammonium p-toluene sulfonate (CTAT, cationic), sucrose monolaurate (non-ionic), octyl- β -D-glucopyranoside, and Tween 20 (nonionic) were from Sigma-Aldrich (Czech Republic); sodium dodecyl sulfate (SDS, anionic) and n-dodecyl- β -D-maltoside (nonionic) were purchased from Fluka (Czech Republic). Zwitterionic betaine surfactants Betadet THC 2 and cetyl betaine were purchased from Chemos (Czech Republic). All surfactants were of the best available quality and used as received without further purification.

Stock solutions of hyaluronan in physiological solution (0.15 mol/l NaCl) were prepared in concentration of 0.5% (w/v) by slowly adding solid hyaluronan to the salt solution under stirring, followed by 24 h stirring in closed vessel to ensure complete dissolution. Hyaluronan stock solution was then used to prepare samples for tensiometry and fluorescence measurements with final constant hyaluronan concentration of 0.1% (w/v).

Samples with varying surfactant concentration and no hyaluronan were prepared by simple diluting surfactant stock solution prepared in 0.15 mol/l NaCl at concentration about ten times higher than its critical micellar concentration in this salt solution. Samples with varying surfactant concentration and containing hyaluronan (0.1%, w/v) were prepared by mixing hyaluronan (10 ml) and surfactant stock solutions and diluting with the physiological solution to the final volume of 15 ml (no phase separation was observed). The samples with hyaluronan were stabilized with NaN_3 (0.05%, w/v) and stirred overnight.

Surface tension measurement was performed with a platinum/iridium Du Noüy ring (diameter 9.545 mm) on tensiometer KSV Sigma 701 at room temperature.

Aggregation and solubilization properties were studied by means of two fluorescence probes – pyrene and nile red. Stock solutions of both fluorescence probes were prepared in volatile solvent – acetone (10^{-4} mol/l). An amount of stock solution to obtain final concentration of pyrene or nile red in samples equal to 10^{-6} mol/l was added to glass vial and acetone was evaporated under reduced pressure. Then 3 ml of hyaluronan or hyaluronan-surfactant solution was added to vial with fluorescent probe and incubated for 24 h at laboratory temperature.

Fluorescence emission spectra were recorded on AMINCO Bowman Series 2 fluorescence spectrometer. In the case of pyrene the excitation wavelength was 336 nm and emission scan was acquired in the range from 360 to 540 nm. Nile red was excited at 550 nm and emission spectra were recorded from 610 to 700 nm.

All measurements were done in duplicates, at least. Confidence intervals in table and error bars (shown when not smaller than the symbols) in figures represent the standard deviation.

Pyrene experiments were evaluated by plotting the intensity ratio I_1/I_2 (the pyrene polarity index or the ratio of fluorescence intensities at 373 and 383 nm) against surfactant concentration [24]. Typical sigmoidal curve was obtained indicating formation of nonpolar domains (micelles with hydrophobic cores) solubilizing pyrene molecules. Ideally, a sharp step change would be observed at the critical micellar concentration. However, the change was usually more or less broadened indicating micellization (aggregation) region (concentration range within which the polarity index decreases) rather than single point. Curves were fitted by Boltzmann equation and inflex point in the micellization region was considered as an estimate of critical micellar concentration. From the Boltzmann equation also points (concentrations) of beginning and end of the micellization region, i.e. the width of this region, can be obtained.

Nile red fluorescence spectra were evaluated by two methods. The first one was plotting normalized values of the total integral of fluorescence intensity (in the wavelength range 610–700 nm)

Table 1

Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on the critical micellar concentration (CMC) as determined by pyrene (upper) and surface tension (bottom) methods.

Surfactant	CMC (mmol/l)		
	no HyA	LMW HyA	HMW HyA
Sucrose monolaurate	0.288 ± 0.006	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.03
	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.3 ± 0.1
n-Dodecyl-β-D-maltoside	0.160 ± 0.001	0.150 ± 0.003	0.160 ± 0.002
	0.149 ± 0.007	0.136 ± 0.006	0.19 ± 0.08
Octyl-β-D-glucopyranoside	20.2 ± 0.1	19.9 ± 0.3	19.9 ± 0.3
	20.6 ± 0.4	19 ± 1	21 ± 2
Tween 20	0.048 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.002
	0.072 ± 0.003	0.053 ± 0.004	0.05 ± 0.02
SDS	1.04 ± 0.01	0.740 ± 0.001	0.80 ± 0.03
	0.87 ± 0.05	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2
TTAB	0.52 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.61 ± 0.01
	0.49 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.5 ± 0.2
CTAB	0.062 ± 0.002	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02
	0.030 ± 0.004	0.025 ± 0.006	0.040 ± 0.001
CTAT	0.056 ± 0.001	0.072 ± 0.001	0.15 ± 0.05
	0.036 ± 0.004	0.099 ± 0.007	0.058 ± 0.008
Cetyl betaine	0.016 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.021 ± 0.005
	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.051 ± 0.003
Betadet THC2	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.100 ± 0.001
	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.27 ± 0.03

against surfactant concentration. The integrals (I_r) were normalized with respect to maximum value which was usually measured for the highest surfactant concentration, i.e. the normalized values ranged from 0 to 1 within each measured system. At low surfactant concentrations the integral intensity is zero or very low and not changing with concentration. At a certain concentration the intensity starts to increase, usually linearly. This is the point of the critical micellar concentration (the intersection of two linear branches). In the second method dependence of the maximum emission wavelength on surfactant concentration was plotted giving similar sigmoidal curve as the pyrene polarity index – mathematical treatment was then similar as for this index.

3. Results and discussion

3.1. Surface tension

Measurement of surface tension detects, in fact, surfactant accumulation on the liquid surface (adsorption). Indirectly it provides information on surfactant behavior in solution, specifically on its micellization which is supposed to start when the sharp drop of surface tension with increasing surfactant concentration stops. Measurements with hyaluronan solutions confirmed no hyaluronan surface activity [25] up to the concentration of about 2 g/l which is consistent with findings of Riberio et al. [26]. All measured data for the dependence of the surface tension on surfactant concentration in physiological solution showed no or small effect of hyaluronan (of any molecular weight) on surface activity and particularly on micellization, i.e. the value of the critical micellar concentration as determined by tensiometry was practically not affected by the addition of hyaluronan, see Table 1. Examples of tensiometry results are given in Fig. 1 for sucrose monolaurate and CTAB. In the case of sucrose monolaurate all three data curves are practically identical and are typical examples of most measured surface tension data. Thus from the point of view of tensiometry there are no specific interactions between hyaluronan and sucrose monolaurate (and most of the other surfactants) and the surface and micellization behavior of this surfactant is not influenced by the presence of hyaluronan chains. CTAB is oppositely charged than hyaluronan therefore some electrostatic interactions could be expected. Fig. 1b shows that hyaluronan of both molecular weights seems to slightly decrease the surface tension of CTAB physiological

solutions in the premicellar region. However, the value of the critical micellar concentration (CMC), as determined by tensiometry, is not affected. Tensiometry thus indicates that hyaluronan influences only the interactions within the CTAB surface layer and does not intervene in the micellization process. No effect on micellization is a result of screening the electrostatic interactions between hyaluronan and CTAB by the presence of NaCl in physiological solution which seems to be more effective in the bulk solution than in

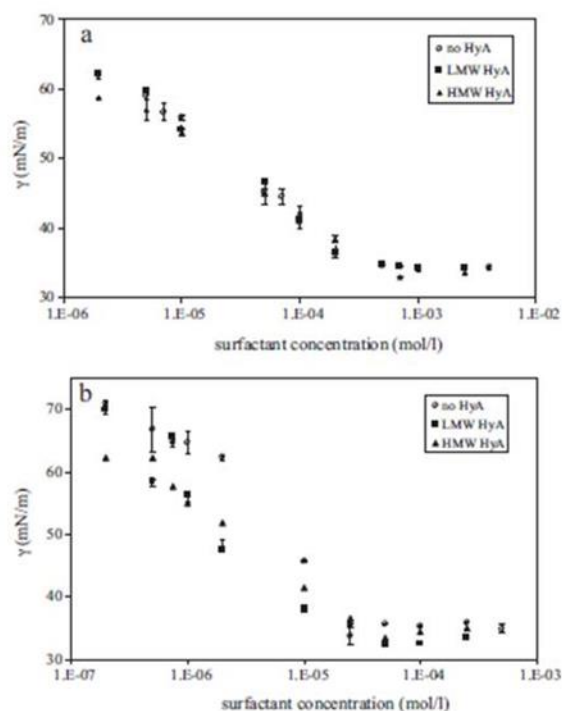


Fig. 1. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on surface tension of sucrose monolaurate (a) and CTAB (b) solutions.

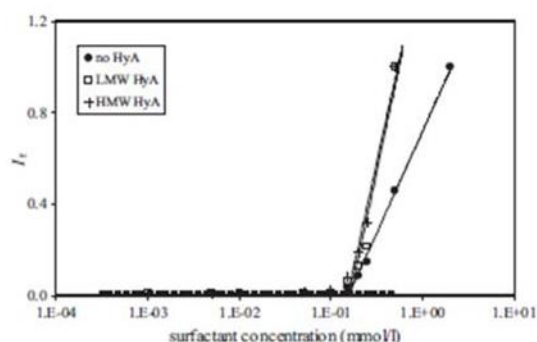


Fig. 2. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on Nile red integral intensity dependence on dodecyl maltoside concentration.

its surface layers. Because the CMC value, as determined by tensiometry, was not influenced by hyaluronan, it probably does not change the amount of CTAB on the solution surface in the premicellar region but changes only interactions in this layer which are the cause of (lowered) surface tension. The lower surface tension may be also caused by larger binding of sodium from the added salt to hyaluronan as counterions. Similar decrease of surface tension in premicellar region was observed also for SDS and for TTAB in the presence of high molecular weight hyaluronan. Specific results obtained for Tween 20 are discussed below.

3.2. Fluorescence probes – nonionic surfactants

Fluorescence probes, in contrast to tensiometry, provide information directly from the bulk solution or even directly from the formed micelles or from their close vicinity. Pyrene is considered to be insoluble in water. However, it has some though limited solubility in water and its location in water is detected by the high value of the pyrene polarity index. Fluorescence of Nile red is quenched in water and its emission maximum wavelength decreases with decreasing polarity.

Critical micellar concentrations determined by the pyrene probe method are summarized in Table 1 and data obtained by all three different fluorescence approaches can be seen in Table S1 (Supplementary material) but the whole measured curves (concentration dependences) are more convenient for discussion of results.

First, the results for nonionic surfactants will be discussed. Data for dodecyl maltoside measured with pyrene and for the Nile red emission maximum showed no effect of hyaluronans. Nile red integral intensity detected no change in critical micellar concentration but revealed increased slope of intensity dependence on concentration after formation of micelles (see Fig. 2). Increased fluorescence intensity is supposed to be caused by increased number of solubilized Nile red molecules. Hyaluronan thus influences the solubilization capacity of dodecyl maltoside probably through the influence on shape, size or number of its micelles.

Pyrene and Nile red curves measured for sucrose monolaurate showed no differences when hyaluronans were added.

Pyrene data for octyl glucopyranoside showed slight broadening of micellization region and slight increase of CMC upon addition of hyaluronan with no specific effect of its molecular weight. The CMC increase was observed also on the Nile red emission maximum curve but here the effect of the high molecular weight hyaluronan was more distinct. Nile red intensity data showed increasing CMC value in the order of solutions with: no hyaluronan < low < high molecular weight hyaluronan. Hyaluronan also slightly increased slope of intensity dependence on concentration

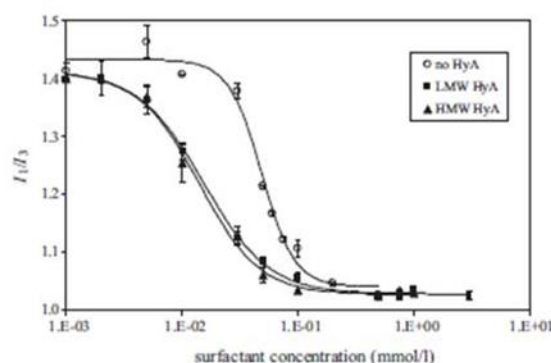


Fig. 3. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on pyrene polarity index dependence on Tween 20 concentration. Solid lines show fits by Boltzmann curve.

in post micellar region. Octyl glucopyranoside is relatively small molecule (monosaccharide with relatively short alkyl) what probably facilitates interactions of single surfactant molecules with hyaluronan through their hydroxyl groups disturbing thus the micellization process.

Pyrene data for Tween 20 revealed significant effects of hyaluronan of both molecular weights on the behavior of this surfactant in physiological solution (see Fig. 3). In the presence of hyaluronans, the CMC was substantially decreased and the concentration interval where micellization occurs was significantly broadened. Very similar results were obtained also for the Nile red emission maximum measurements (the curves are not shown – their shapes are very similar to those for pyrene in Fig. 3). On contrary, the Nile red integral intensity showed increased CMC upon addition of hyaluronans; this increase was a little bit higher for the low molecular weight hyaluronan. The latter also gave somewhat smaller slope of intensity dependence on concentration in post micellar region, i.e. decreased solubilization. The apparently contradictory results can be explained by different photophysical basis of detection by the two different fluorescence probes quoted in introduction. Pyrene polarity index in the region of its decrease from the value corresponding to aqueous medium to the value corresponding to low polarity environment is composed from signals coming from pyrene molecules located in the formed micelles, from free pyrene molecules in water, and probably also from (“pre-micellar”) aggregates formed by hyaluronan-surfactant interactions which consist of domains of higher polarity (higher water contents) than regular Tween micelles. Similarly, the Nile red emission maximum measures the polarity of environment within which the Nile red molecules are located or solubilized; the shift of this maximum is detectable even when the fluorescence intensity is very low, i.e. when most Nile red molecules are surrounded by water that quenches their fluorescence. On contrary, the Nile red fluorescence intensity is principally determined by the number of Nile red molecules located in non-aqueous environment, i.e. solubilized within the nonpolar aggregates or micelles. Sufficient number of solubilized molecules, i.e. of micelles with the true non-aqueous interior, is formed in the presence of hyaluronan only at sufficiently high surfactant concentration. This probably occurs when interactions between Tween 20 and hyaluronan are “saturated”, formation of hyaluronan-surfactant premicellar aggregates (of higher polarity than standard Tween micelles) is essentially completed and free Tween micelles start to be formed.

In contrast to the other used sugar-based surfactants, Tween 20 has relatively bulky polar head with several end hydroxyl groups on oligoethylene glycol chains, projecting from the head like

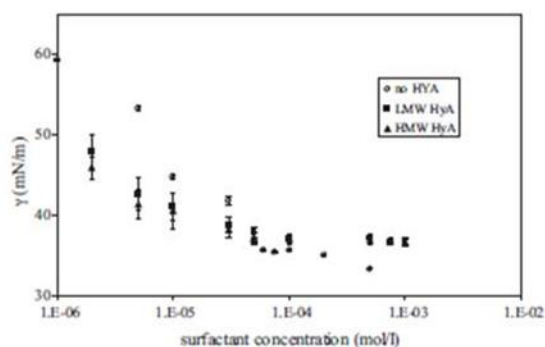


Fig. 4. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on surface tension of Tween 20 solutions.

"antennas". One cause for formation of aggregates in the presence of hyaluronan may thus be steric exclusion by voluminous hyaluronan coils. Further, Tween "antenna" hydroxyl groups may participate in hydrogen bonding with hyaluronan hydroxyls or even carboxyls. Molecular modeling of hyaluronan hydration demonstrated numerous hydrogen bonds between hyaluronan disaccharide units and water molecules – some of them even form water bridges between adjacent hydroxyls of monosaccharide subunits [27,28]. Water thus can participate in the premicellar aggregate formation or can be entrapped within their structure. Formation of premicellar aggregates is not reflected in the value of critical micellar concentration as determined by surface tension but some effect of hyaluronan on the surface tension of Tween 20 physiological solutions can be seen (Fig. 4). Below the regular CMC value the solution surface tension is lower in the presence of hyaluronans which could confirm the hypothesis on hydrogen bonding between hyaluronan and surfactant which occurs also in the surface layers and decreases the surface energy. Constant and higher surface tension behind the regular CMC in the presence of hyaluronans could point to steric exclusion by hyaluronan of additional surfactant molecules to enter the surface layer and forcing them to form free micelles only.

Yin et al. [11] reported no interactions of hyaluronan with similar nonionic surfactant, Tween 80. However, this refers to experiments carried out in water. Sensitivity of hyaluronan conformation to ionic strength is well documented, e.g., by rheological properties of its solutions [29,30]. Also the hydration of hyaluronan chain and hydrogen bonds formed between hyaluronan functional groups and water molecules are influenced by the presence of added electrolyte ions [28]. Even Yin et al. [11] present influence of NaCl on the pyrene I_1/I_3 ratio in the presence of hyaluronan but give it only for five selected surfactant concentrations and do not show the whole curve. Nevertheless, the trends observed by Yin et al. upon addition of NaCl correspond to those seen in Fig. 3. Presence of NaCl thus influences interactions between hyaluronan and Tween surfactants despite of their nonionic nature.

3.3. Fluorescence probes – anionic surfactants

Representative data of pyrene polarity index measured for ionic surfactants can be seen in Figs. S1–S3 (Supplementary material). SDS was the only one anionic surfactant tested. Pyrene curves measured for SDS showed slight broadening of micellization region and slight decrease of CMC in the presence of hyaluronan. Yet more expressive broadening and CMC decrease was indicated by Nile red emission maximum (Fig. 5). Nile red integral intensity showed almost no change of CMC but a change of the shape of its dependency on surfactant concentration in post micellar region. Solutions

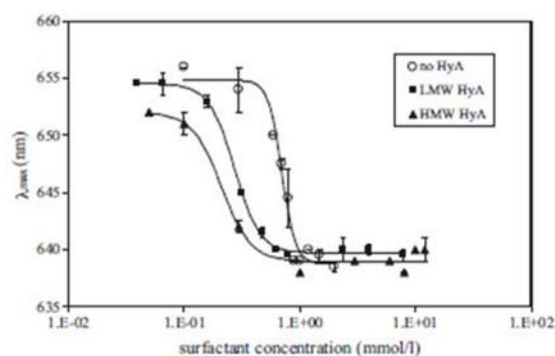


Fig. 5. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (HyA) on dependence of Nile red emission maximum wavelength on SDS concentration. Solid lines show fits by Boltzmann curve.

without hyaluronan had usual linear shape while in the presence of hyaluronans S-shape appeared indicating some saturation of Nile red solubilization. Decreased CMC is consistent with findings of Yin et al. [11] where aqueous solutions (no added salt) were studied; because there was the added salt in our case the results seem to confirm hypothesis on hydrogen bonding nature of the CMC decrease [11]. The saturation of Nile red solubilization probably points to formation of smaller micelles in the presence of hyaluronan with limited space to dissolve relatively large Nile red molecule.

3.4. Fluorescence probes – cationic surfactants

Three cationic surfactants were included in this study. Pyrene polarity index curves measured for TTAB in the presence of hyaluronan were close to that obtained when no hyaluronan was present. Similar results were obtained from the Nile red emission maximum curves, except somewhat broadened micellization region found especially when the high molecular weight hyaluronan was present. Nile red integral intensity data were also close for all three systems except slightly increased slope in the postmicellar region in the presence of the low molecular weight hyaluronan. Hyaluronan is known to induce aggregation in aqueous TTAB solutions at lower surfactant concentrations than is the CMC which is explained by surfactant cooperative binding on the biopolymer backbone and forming micelle-like aggregates. Salts are known to depress these interactions. Pyrene data thus show that the added salt probably completely screened interactions and the formed aggregates are free micelles of (non-bound) TTAB in saline solution. In other words, no solubilization was detected at surfactant concentrations below the CMC in physiological solution. Similar conclusions can be drawn from the Nile red intensity data. Broadening of dependencies measured for the Nile red emission maxima show that the probe molecules may be located in environments of different polarity. Whereas pyrene is a "pure" hydrocarbon of limited solubility in water, Nile red is a heterocyclic compound containing also nitrogen atoms and in the solution can interact with heteroatoms of the other components also when it is not solubilized in nonpolar domains.

In the case of CTAB, hyaluronan of both molecular weights increased the critical micellar concentration detected by the inflex point on the pyrene polarity index curve. Also the micellization region was broadened especially in the case of the high molecular weight preparation (Fig. 6). Similar results were obtained from the Nile red emission maximum. Increased CMC was also demonstrated by the Nile red integral intensity data but here no differences were detected between the two hyaluronans. Interactions between

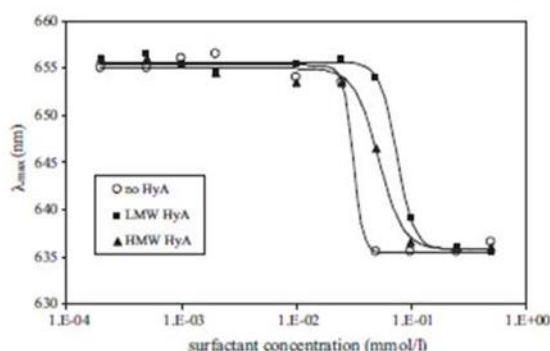


Fig. 6. Effect of low (LMW) and high (HMW) molecular weight hyaluronan (Hya) on dependence of Nile red emission maximum wavelength on CTAB concentration. Solid lines show fits by Boltzmann curve.

hyaluronan and CTAB are demonstrated by increased CMC and broadening of micellization regions as detected by the pyrene and Nile red sigmoidal curves. Aggregation of CTAB, in comparison with TTAB, is much more affected by the presence of hyaluronan which could be attributed to the longer surfactant alkyl chain. Increased CMC of CTAB in the presence of hyaluronan can be caused by stronger hydrophobic interactions between longer cetyl chain and hydrophobic patches on hyaluronan backbone [31,32]. Hydrophobic interactions are supposed not to be screened by the added salt as much as is the case of electrostatic interactions. Hydrophobically bound surfactant molecules are then not able to participate in micelles formation.

Pyrene polarity index curves measured for CTAT only and for CTAT with the low molecular weight hyaluronan are similar except slightly higher value of this index for the former in the premicellar region. Presence of the high molecular weight hyaluronan again shifted the inflex point to higher surfactant concentrations and broadened the micellization region. Nile red emission maximum showed increased CMC values for both hyaluronans, higher for the low molecular weight preparation; the high molecular weight type gave very narrow micellization region. The Nile red integral intensity showed the same and increased CMC in the presence of both hyaluronans. CTAT results are thus somewhere between the results for TTAB and CTAB. Introducing different types of polar head (aromatic, with sulfate counterion) into cationic surfactant did not substantially change its interactions with hyaluronan and solubilization properties of formed aggregates.

3.5. Fluorescence probes – zwitterionic surfactants

Finally, two amphoteric surfactants were tested. Nile red data obtained for cetyl betaine were similar regardless the presence of hyaluronan. Only pyrene polarity index showed a minor decrease of CMC in the presence of the low molecular weight hyaluronan. Thus no significant hyaluronan–cetyl betaine interactions were observed in physiological solution. In the case of Betadex THC 2 Nile red intensity showed certain difference – increased CMC in the presence of both hyaluronan samples. Betadex is a commercial cosmetic product based on disodium cocoamphodiacetate with unspecified additional ingredients. Hyaluronans added to this composition thus did not intervene its interactions too much except changing the number or size of aggregates capable to solubilize Nile red.

4. Conclusions

Although the presence of NaCl may suppress interactions between oppositely charged polyelectrolyte and surfactant results

of this work showed that they are still present in some hyaluronan–surfactant systems regardless the surfactant ionic nature. These interactions were demonstrated mainly by fluorescence probe techniques whereas tensiometry detected only minor effects. Fluorescence data demonstrated that formation of aggregates (micelles) occurs rather in a certain interval of surfactant concentrations than in a single point. It is thus more appropriate to speak about micellization (aggregation) region than single critical micellar (aggregation) concentration, especially in the presence of hyaluronan because its main effect on fluorescence data was broadening of concentration interval in which the fluorescence probe starts to be and is solubilized in nonpolar domains. Broadening of this interval usually changes the value of its mid-point which can be considered as a point estimate of the critical micellar (aggregation) concentration. Tensiometry did not detect changes in the critical micellar concentration, only in several systems slight decrease of surface tension in the premicellar region was observed in the presence of hyaluronan.

The greatest differences between surfactant physiological solution and surfactant + hyaluronan physiological solution were found for nonionic Tween 20 and cationic CTAB. This was rather surprising for the former, first because of its nonionic nature and second because of no such differences were observed for the other nonionic surfactants. Specificity of Tween 20 was attributed to its structural features – relatively bulky and sugar-based polar head capable of weak physical interactions, preferably hydrogen bonding, with hyaluronan chain. Interactions of hyaluronan with CTAB, an oppositely charged molecule, were expected, however, in contrast to aqueous solution, in physiological solution used here they manifested in increased CMC or, more precisely, they shifted solubilization capability to higher surfactant concentrations. This is probably a result of hydrophobic interactions of sufficiently long surfactant alkyl chain with low-polarity parts of hyaluronan backbone which are promoted in physiological solution where the electrostatic interactions are screened.

Fluorescence data also demonstrated that there can be differences in results obtained with different fluorescence probes which are caused by their different location and solubility in studied system and by differences in the nature of their photophysical behavior. Pyrene seems to be a useful probe to detect the onset of micellization process and the width of concentration interval where this process occurs. Wavelength of the Nile red fluorescence emission maximum can provide similar information whereas its intensity determines when a sufficient number of really hydrophobic domains is formed in studied system.

From the point of view of targeted delivery it is important to note that fluorescence probes demonstrated that solubilization properties of all tested surfactants were retained in the presence of hyaluronan, i.e. eventual hyaluronan–surfactant interactions do not destroy aggregates containing non-polar domains (micelles).

Acknowledgements

This work was supported by the COST action D43 and corresponding Czech project No. OC08004. The Centre for Materials Research at FC BUT is supported by the project No. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 from ERDF.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.

References

- [1] H.G. Garg, C.A. Hales (Eds.), *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Elsevier, Amsterdam, 2004.
- [2] L. Robert, A.M. Robert, G. Renard, Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging, *Pathol. Biol.* 58 (2010) 187–198.
- [3] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltés, Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1718–1745.
- [4] N. Itano, Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan, *J. Biochem.* 144 (2008) 131–137.
- [5] A. Almond, Hyaluronan, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1591–1596.
- [6] K.S. Girish, K. Kemparaju, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview, *Life Sci.* 80 (2007) 1921–1943.
- [7] D.A. Ossipov, Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 681–703.
- [8] K. Beer, N. Solish, Hyaluronics for soft-tissue augmentation: practical considerations and technical recommendations, *J. Drugs Dermatol.* 8 (2009) 1086–1091.
- [9] E.A. Balazs, Therapeutic use of hyaluronan, *Struct. Chem.* 20 (2009) 341–349.
- [10] I. Hargittai, M. Hargittai, Molecular structure of hyaluronan: an introduction, *Struct. Chem.* 19 (2008) 697–717.
- [11] D. Yin, W. Yang, Z. Ge, Y. Yuan, A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 1201–1206.
- [12] K. Thalberg, B. Lindman, Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 1478–1483.
- [13] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 4289–4295.
- [14] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3370–3376.
- [15] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6004–6011.
- [16] K. Thalberg, B. Lindman, Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant, *Langmuir* 7 (1991) 277–283.
- [17] A. Herslöf, L.O. Sundelöf, K. Edsman, Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge. hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 2345–2348.
- [18] M. Björling, A. Herslöf-Björling, P. Stilbs, An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium Bromide, *Macromolecules* 28 (1995) 6970–6975.
- [19] V.J.P. Srivatsavoy, Enhancement of excited state nonradiative deactivation of Nile Red in β -cyclodextrin: evidence for multiple inclusion complexes, *J. Lumin.* 82 (1999) 17–23.
- [20] M.E.C.D.R. Oliveira, G. Hungerford, M. da, G. Miguel, H.D. Burrows, Solvatochromic fluorescent probes in bicontinuous microemulsions, *J. Mol. Struct.* 563–564 (2001) 443–447.
- [21] S. Mukherjee, H. Raghuraman, A. Chattopadhyay, Membrane localization and dynamics of Nile red: effect of cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 59–66.
- [22] P. Greenspan, S.D. Fowler, Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 781–789.
- [23] G. Nagwa, Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A* 56 (2000) 1003–1010.
- [24] J. Aguiar, P. Carpena, J.A. Molina-Bolivar, C.C. Ruiz, On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method, *J. Colloid Interface Sci.* 258 (2003) 116–122.
- [25] M. Chytil, J. Krouská, P. Kulilová, M. Pekař, Maximum bubble pressure and the du Noüy platinum ring method of surface tension measurements of sodium dodecyl sulfate and sodium hyaluronate, *Chem. Listy* 102 (2008) s1139–s1141.
- [26] W. Riberio, J.L. Mata, B. Saramago, Effect of concentration and temperature on surface tension of sodium hyaluronate saline solutions, *Langmuir* 23 (2007) 7014–7017.
- [27] F. Heatley, J.E. Scott, A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan, *Biochem. J.* 254 (1988) 489–493.
- [28] A. Almond, Towards understanding the interaction between oligosaccharides and water molecules, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 907–920.
- [29] E. Fouissac, M. Milas, M. Rinaudo, R. Borsali, Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate, *Macromolecules* 25 (1992) 5613–5617.
- [30] W.E. Krause, E.G. Bellomo, R.H. Colby, Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions, *Biomacromolecules* 2 (2001) 65–69.
- [31] C.S. Sundari, D. Balasubramanian, Hydrophobic surfaces in saccharide chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67 (1997) 183–216.
- [32] J.E. Scott, F. Heatley, Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy, *Biomacromolecules* 3 (2002) 547–553.

10.3 Příloha 3: Článek kapitola 6.1.4

Carbohydrate Polymers 97 (2013) 34–37



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

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



Short communication

The effect of hyaluronan on the aggregation of hydrophobized amino acids—A fluorescence study



T. Halasová, F. Mravec, M. Pekař*

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre, Purkyňova 118, Brno CZ-61200, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2013

Received in revised form 10 April 2013

Accepted 12 April 2013

Available online 24 April 2013

Keywords:

Hydrophobically modified amino acids

Hyaluronan

Aggregation

Interactions

ABSTRACT

The influence of the addition of native hyaluronan of different molecular weights (1.36 MDa and 106 kDa) on the aggregation behavior of hydrophobically modified amino acids in aqueous solution and in 0.15 M NaCl was investigated using pyrene as a solubilization probe. Hyaluronan decreased the critical aggregation concentration in aqueous solution in the case of amino acids modified by a single alkyl chain whereas no change was observed in physiological solution. The aggregation of amino acids modified by two alkyl chains was insensitive to the presence of hyaluronan.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hyaluronan is a naturally occurring polysaccharide with a very simple structure but unusual properties and a variety of functions (Prehm, 2005). It can be viewed as a homopolymer of a basic disaccharide unit consisting of D-glucuronic acid and D-N-acetylglucosamine. The biopolymer occurs mostly as a sodium salt and the name hyaluronan is used to describe both acidic and salt forms. The biological or physiological functions of hyaluronan are mostly determined either by its physical and physico-chemical properties or by interactions with hyaluronan-binding proteins. In synovial fluid, the vitreous humor, or the umbilical cord, it plays a significant mechanical and structural role, while its presence in the extracellular matrix can trigger important responses due to its interactions with receptors or proteins. Hyaluronan is a very hydrophilic polymer surrounded by a massive hydration shell. At physiological pH, the carboxyl groups are predominantly ionized, and hyaluronan behaves like a polyanion, which can interact or associate with cationic counterions to maintain charge neutrality. Because it is a ubiquitous polysaccharidic component of tissues and body fluids, it does not confer immunological reactions and is metabolized in the lysosomes of certain cells. Hyaluronan is an ideal candidate for use as a carrier of drugs. Many drugs are of a hydrophobic nature and are not compatible with hydrophilic hyaluronan. Various strategies are reported to overcome this

problem and can be grouped either as chemical or physical approaches (Liao, Jones, Forbes, Martin, & Brown, 2005; Ossipov, 2010). The physical approach is based on physical interactions between hyaluronan and a suitable partner capable of forming hydrophobic domains. Typical examples are complexes formed by hyaluronan and cationic surfactants (Herslöf, Sundelöf, & Edsman, 1992; Thalberg & Lindman, 1989; Thalberg, Lindman, & Karlström, 1991). Traditional cationic surfactants may be problematic due to their harmful effects on cells and their toxicity in general. The use of amino acids may be a solution to this problem, providing they have a hydrophobic chain and behave like surfactants. Amino acid-based surfactants may be prepared from selected combinations of amino acids or by the hydrophobization (alkylation) of suitable amino acids (Pons, Morán, Infante, Pinazo, & Pérez, 2011; Zhao, 2009). In this work we report on hyaluronan interactions with several new types of alkylated amino acids (Fig. 1) investigated by the fluorescence probe method. All amino acids were prepared as alkyl-esters and converted to hydrochlorides to improve aqueous solubility. Modification was performed with both single alkyl chain (on monocarboxyl amino acid) and double alkyl chains (on dicarboxyl amino acid) to simulate surfactants with one or two nonpolar tails. To the best of our knowledge these systems have been almost completely neglected so far and there is no information on the surfactant-like behavior of investigated amino acid derivatives. Only Niikura, Nambara, Okajima, Matsuo, and Ijiro (2010) used a fluorescence labeled derivative of Glu-C₁₀ in their study of cell membrane permeability, and Ser-C₁₂ was prepared and tested as a transdermal penetration enhancer (Valivety, Gill, & Vulfson, 1998; Vavrova, Hrabalek, Dolezal, Holas, & Zbytovska, 2003).

* Corresponding author. Tel.: +420 541149330; fax: +420 541149398.
E-mail address: pekar@ch.vutbr.cz (M. Pekař).

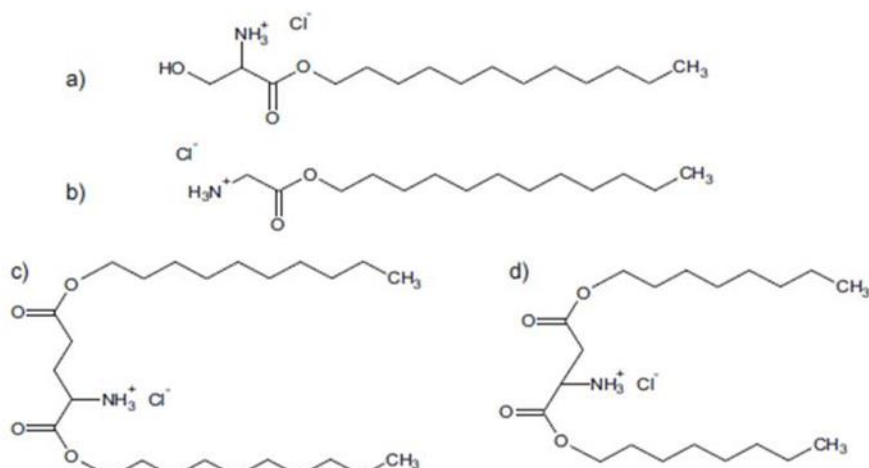


Fig. 1. Structures of amino acids used in this study: (a) serine dodecylester, Ser-C₁₂; (b) glycine dodecylester, Gly-C₁₂; (c) glutamate didecylester, Glu-C₁₀; and (d) aspartate didecylester, Asp-C₈.

2. Material and methods

Native hyaluronan (HyA) of two different molecular weights (1.36 MDa and 106 kDa) and alkylated amino acids (see Fig. 1) were donated by CPN (Czech Republic). Modified amino acids were provided as developmental products of the same company to be tested for their aggregation behavior and their interactions with hyaluronan.

Samples were prepared in glass vials. First, the stock solution of the fluorescence probe (pyrene) in a volatile solvent (acetone) was added to glass vials and the solvent was evaporated. The final concentration of pyrene in the samples was 10^{-6} mol dm⁻³. The stock solutions of relevant components prepared in water or in a model physiological solution (0.15 M NaCl) were then added to these pre-treated vials. The samples were stirred for a minimum of 24 h on a magnetic stirrer.

Fluorescence spectroscopy with pyrene as a probe was used to study the resulting interactions and to determine the critical micellar or aggregation concentrations. This fluorescence probe reacts to the polarity of its microenvironment. The ratio of the first (373 nm) and third (384 nm) vibronic peaks in the emission spectra was used as a polarity parameter, denoted as EmPI (the emission polarity index). The ratio of fluorescence intensities at 333 nm and 338 nm in the excitation spectra of pyrene, denoted as ExPI (the excitation polarity index), was used as a second polarity parameter. Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on an AMINCO Bowman Series 2 luminiscence spectrometer; see Fig. S1 in the supplementary material. The excitation wavelength was 336 nm and during excitation spectra measurement the emission wavelength was set at 392 nm. Measurements were performed at laboratory temperature (25 °C).

Fluorescence data usually show a characteristic sigmoidal behavior, which can be fitted by a Boltzmann curve. Fig. S2 in the supplementary material shows the Boltzmann curve and its parameters. The equation of the Boltzmann curve is

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

where y is the value of EmPI or ExPI, x is the concentration of hydrophobically modified amino acid, A_1 and A_2 are the asymptotic limits of the sigmoidal curve, x_0 is its inflection point, and Δx

is the interval of the parameter x where the decrease in y is found (Aguilar, Carpena, Molina-Bolivar, & Ruiz, 2003).

3. Results and discussion

Gly-C₁₂ and Ser-C₁₂ showed very similar behavior both in water and in 0.15 M NaCl. The pyrene probe confirmed the formation of hydrophobic domains above a certain alkyl amino acid concentration in both media. These domains are believed to be a result of surfactant-like aggregation, i.e. of the formation of micelles or micelle-like aggregates, and the corresponding concentration is called the critical micellar concentration. A representative example of the measured polarity indices for Gly-C₁₂ is presented in Fig. 2; similar results for Ser-C₁₂ are presented in Fig. S3 in the supplementary material. The critical micellar concentration (cmc; see also Table 1) is decreased in the presence of a low molecular weight electrolyte, which corresponds to the standard behavior of ionic surfactants and is the result of the screening of electrostatic repulsions between ionic polar heads of the surfactant by

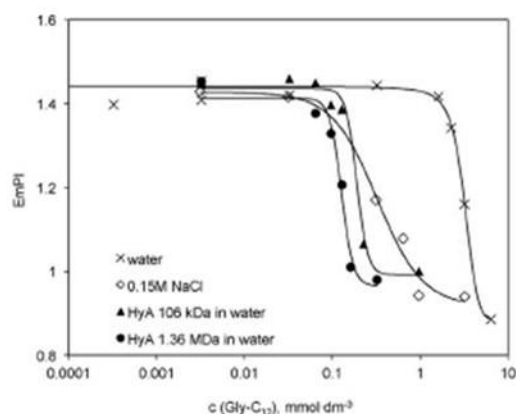


Fig. 2. Dependency of EmPI on the total concentration of Gly-C₁₂ in water and in 0.15 M NaCl. Influence of the addition of hyaluronan of different molecular weights to solutions in water. The concentration of hyaluronan was 0.1% (w/v), the temperature was 25 °C.

Table 1

Values of the cmc or cac for systems of hydrophobically modified amino acids without and with added hyaluronan in water and 0.15 M NaCl. The concentration of hyaluronan was 0.1% (w/v), the temperature was 25 °C. No aggregation of Glu-C₁₀ was detected up to its solubility limit.

Hydrophobically modified amino acid	Method	cmc or cac (mmol dm ⁻³)					
		In water			In 0.15 M NaCl		
		No HyA	HyA 106 kDa	HyA 1.36 MDa	No HyA	HyA 106 kDa	HyA 1.36 MDa
Gly-C ₁₂	EmPI	3.20	0.19	0.13	0.32	0.19	0.19
	ExPI	3.17	0.16	0.13	0.32	0.19	0.19
Ser-C ₁₂	EmPI	2.22	0.14	0.07	0.25	0.29	0.18
	ExPI	2.25	0.11	0.07	0.29	0.29	0.25
Asp-C ₈	EmPI	0.08	0.08	0.13	0.15	0.13	0.20
	ExPI	0.10	0.08	0.13	0.18	0.08	0.20

the action of electrolyte ions. The effect of the addition of hyaluronan is dependent on the solvent composition. In water, hyaluronan decreases the critical micellar concentration in a similar way to low molecular weight electrolyte (see Fig. 2), whereas in 0.15 M NaCl essentially no effect is observed (Fig. S4 in supplementary material). The decrease in surfactant concentration at which surfactant aggregation is observed can be attributed to the standard behavior of surfactants in the presence of an oppositely charged polyelectrolyte (Holmberg, Jönsson, Kronberg, & Lindman, 2007) – the polyelectrolyte induces surfactant aggregation by binding the oppositely charged surfactant molecules on its backbone, and the aggregation is thus promoted at a lower concentration than the surfactant critical micellar concentration; this lower concentration is therefore called the critical aggregation concentration (cac; see Table 1). The molecular weight of hyaluronan has only a moderate effect – the critical aggregation concentration is somewhat lower in the presence of a high molecular weight preparation. The screening of electrostatic interactions in the presence of a low molecular weight electrolyte suppresses interactions between surfactant molecules and polyelectrolyte chains, and no substantial changes can be observed in fluorescence probe solubilization.

Values of cmc for classical C₁₂ surfactants containing an ammonium group are in the range 14–23 mmol dm⁻³ at 25 °C (Mukerjee & Mysels, 1971), i.e. somewhat higher than those determined for Gly-C₁₂ and Ser-C₁₂. For N-dodecyl-β-alanine hydrochloride, a cmc value of 10 mmol dm⁻³ (at 30 °C) is reported (Mukerjee & Mysels, 1971). The addition of 50 mmol dm⁻³ NaCl decreased the cmc of dodecylammonium chloride more than twice (Mukerjee & Mysels, 1971). Data obtained in this study thus accord reasonably with literature.

The molar ratio of modified amino acid to hyaluronan dimer unit (which is the corresponding charge ratio at the same time) at the cac can give an idea of the distribution of amino acid molecules along the hyaluronan chain. For low molecular weight hyaluronan in water, this ratio is around 0.079 for Gly-C₁₂ and about 0.048 for Ser-C₁₂. This means that most hyaluronan dimers that form its basic repeating unit are not in contact with amino acids at the cac, and indicates that amino acids are bound in the form of micelle-like aggregates only to some of the dimers (their carboxyl groups). The ratios calculated for high molecular weight hyaluronan are somewhat lower, viz. 0.057 for Gly-C₁₂ and 0.027 for Ser-C₁₂, which could be attributed to conformational effects – the more coiled longer hyaluronan chains impede access to interacting sites inside the coil. In 0.15 M NaCl the ratios are slightly higher, but because it is not possible to separate the effect of the low molecular weight electrolyte they are not discussed here.

The dependency of the emission polarity index on the total concentration of Asp-C₈ in water and in 0.15 M NaCl is shown in Fig. 3. In this case, the cmc is not decreased by the presence of the electrolyte; on the contrary, a moderate increase in cmc is observed. Estimated values of cmc are given in Table 1.

Hydrophobically modified aspartic acid is structurally different from the two abovementioned amino acid derivatives, mainly in that it has two hydrophobic chains; their length is smaller than in the two previous cases. The presence of two non-polar chains is manifested in much lower cmc compared to Gly-C₁₂ and Ser-C₁₂. These chains probably separate the charged polar heads from mutual contact, and shield their repulsive interactions and, consequently, also the effect of the added salt. Micellization is primarily driven by hydrophobic interactions of alkyl chains which are not affected by the electrolyte. A lower cmc for two-alkyl-chain surfactants in comparison with single alkyl analogs is well known for classical surfactants (Mukerjee & Mysels, 1971; Holmberg et al., 2007).

Octyltrimethylammonium bromide cmc is about 140 mmol dm⁻³ (at 25 °C) and is not affected by the addition of NaCl at a concentration of 100 mmol dm⁻³; the cmc of nonionic octyl-β-D-glucoside is 25 mmol dm⁻³ (Mukerjee & Mysels, 1971). The effect of adding another alkyl chain to the surfactant structure can be estimated from comparison of the cmc values for dodecyl- and didodecyl dimethylammonium chloride – the latter has a cmc lower by more than two orders of magnitude (Mukerjee & Mysels, 1971). The behavior of Asp-C₈ thus also accords with classical surfactants.

The addition of hyaluronan to the Asp-C₈ solution had no significant effect either in water or 0.15 M NaCl (see Fig. 3 for solutions in water). This corresponds to the minor effect of NaCl on the aggregation of pure Asp-C₈ shown also in Fig. 3 and is a result of the

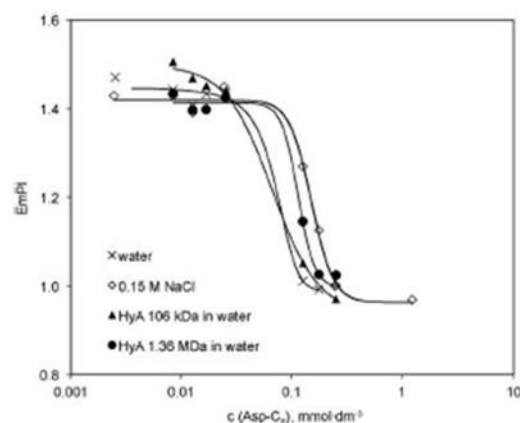


Fig. 3. Dependency of EmPI on the total concentration of Asp-C₈ in water and in 0.15 M NaCl. Influence of the addition of hyaluronan of different molecular weights to solutions in water. The concentration of hyaluronan was 0.1% (w/v), the temperature was 25 °C.

effective screening of electrostatic interactions between hyaluronan and Asp-C₈. C_{ac} values are thus close to the corresponding cmc values (Table 1).

In the case of Glu-C₁₀ we were not able to detect its aggregation by the pyrene method. Polarity indices had a constant value over the whole accessible concentration interval (the solubility of Glu-C₁₀ was determined to be 0.086 mmol dm⁻³ at laboratory temperature, 25 °C), indicating the location of pyrene in the polar environment. In other words, no decrease in polarity indices analogous to that shown in all figures here was observed for Glu-C₁₀, and the same values were measured in water and 0.15 M NaCl in the presence and absence of hyaluronan. This is rather unexpected behavior particularly in comparison with the structurally similar Asp-C₈. The arrangement of alkyl chains in Glu-C₁₀ is probably different, hinders packing into micellar aggregates, and decreases the solubility. The structure of glutamic acid (Metzler, 2001) suggests that the two alkyl chains in Glu-C₁₀ are perpendicular, in contrast to Asp-C₈, where a parallel arrangement can be expected.

4. Conclusions

The aggregation behavior of four hydrophobically modified amino acids with different structures was studied in water and 0.15 M NaCl. In addition, the influence of the addition of low and high molecular weight hyaluronan was tested. Two of the used amino acids, monoalkylated glycine and serine, showed typical aggregation behavior known for most traditional surfactants. Above a certain concentration (the critical micellar concentration), aggregates with a hydrophobic core are formed. These aggregates are able to solubilize a nonpolar fluorescent probe and thus they should also be able to solubilize other nonpolar molecules. The presence of a low molecular weight electrolyte caused a decrease in the critical micellar concentration by about one order of magnitude. This is also typical behavior for ionic surfactants. The addition of hyaluronan caused a similar effect in water, not significantly dependent on the hyaluronan molecular weight. The effect of an electrolyte and hyaluronan can be thus attributed to electrostatic interactions. In 0.15 M NaCl, no change in aggregation behavior was observed after hyaluronan addition, which is because of the presence of the low molecular weight electrolyte that shields electrostatic interactions.

Aspartic acid modified by two alkyl chains also showed typical surfactant aggregation and solubilization behavior, but in this case such behavior was not affected by the presence of the low molecular weight electrolyte or hyaluronan. A similar derivative of glutamic acid was the least soluble preparation and no aggregation was detected by the fluorescence probe method up to the solubility limit.

Acknowledgements

This work was supported by the project "Center for Materials Research at FCH BUT" No. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 from ERDF, project OC08004 (Ministry of Education of the Czech Republic) and COST action CM1101.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.051>.

References

- Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J. A., & Ruiz, C. C. (2003). On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258, 116–122.
- Herslöf, A., Sundelöf, L. O., & Edsman, K. (1992). Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge. Hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *Journal of Physical Chemistry*, 96, 2345–2348.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., & Lindman, B. (2007). *Surfactants and polymers in aqueous solution*. Chichester: Wiley.
- Liao, I. H., Jones, S. A., Forbes, B., Martin, G. P., & Brown, M. B. (2005). Hyaluronan: Pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Delivery*, 12, 327–342.
- Metzler, D. E. (2001). *Biochemistry*. S. Diego: Harcourt/Academic Press.
- Mukerjee, P., & Mysels, K. J. (1971). *Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems*. Washington: NBS.
- Niikura, K., Nambara, K., Okajima, T., Matsuo, Y., & Ijro, K. (2010). Influence of hydrophobic structures on the plasma membrane permeability of lipidlike molecules. *Langmuir*, 26, 9170–9175.
- Ossipov, D. A. (2010). Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 7, 681–703.
- Pons, R., Morán, M. C., Infante, M. R., Pinazo, A., & Pérez, L. (2011). Lysine-based surfactants. In M. Fanun (Ed.), *Colloids in biotechnology* (pp. 125–138). Boca Raton: CRC Press.
- Prehm, P. (2005). Hyaluronan. In A. Steinbüchel, & R. H. Marchessault (Eds.), *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications* (Vol. 2) (pp. 617–644). Weinheim: Wiley-VCH.
- Thalberg, K., & Lindman, B. (1989). Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 93, 1478–1483.
- Thalberg, K., Lindman, B., & Karlström, G. (1991). Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *Journal of Physical Chemistry*, 95, 3370–3376.
- Valivety, R., Gill, I. S., & Vulfson, E. N. (1998). Application of enzymes to the synthesis of amino acid-based bola and gemini surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1, 177–185.
- Vavrova, K., Hrabalek, A., Dolezal, P., Holas, T., & Zbytovska, J. (2003). L-Serine and glycine based ceramide analogs as transdermal permeation enhancers: Polar head size and hydrogen bonding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 2351–2353.
- Zhao, X. (2009). Design of self-assembling surfactant-like peptides and their applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14, 340–348.

10.4 Příloha 4: Článek kapitola 6.2.7

Rheological properties of condensed matter based on the interaction hyaluronan-CTAB

Abstract

The aim of this paper is rheological characterization of concentrated phase, which arises from mixed solution of polyelectrolyte and oppositely charged surfactant, concretely anionic polyelectrolyte sodium hyaluronate (NaHy) with M_w 300 kDa, 700 kDa and 2 MDa and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Oscillatory frequency tests and flow behaviour have been determined for these systems.

Introduction

Sodium hyaluronate (NaHy, hyaluronan) is linear polysaccharide made up from alternating units of glucuronic acid and *N*-acetylglucosamine. In aqueous solution this molecule occurs in form anionic polyelectrolyte. It plays an important role for both mechanical and transport properties in the body and it is found in the extracellular matrix of mammals **O**.

Interaction in system hyaluronan-surfactant was extensively studied by Thalberg et al **O**. Systems of sodium salt of hyaluronan and alkyltrimethylammonium bromides with different chain length (8, 9, 10, 12, 14 and 16 carbon units) have been examined by phase separation method, conductivity measurements, NMR or dye solubilization. Acquired data demonstrated that hyaluronan interacts only with surfactants, which have ten or more carbon units in alkyl chain. For surfactants with shorter alkyl chain formation of ordinary micelle is energetically preferred in front of interaction with polyelectrolyte chain. It has been also determined that in case of hyaluronan the interaction between surfactants and polyelectrolyte chain is weaker than in case of other polyelectrolytes such as alginate or pectate. It originates probably from low charge density on hyaluronan chain. The main result of this work is finding that interaction of hyaluronan and oppositely charged surfactant leads to formation of micelle like aggregates bounded on polyelectrolyte chain. This system is described by simply model so-called pearl necklace model **O**, but this model is valid only for dilute solution. Phase separation and precipitate formation readily occur upon considerable surfactant binding to NaHy.

The phase behaviour of the system tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) and sodium hyaluronate in water has been investigated. The results were summed up in ternary phase diagram, the major feature of which is a droplet-shaped two-phase region, hanging from the water corner of the diagram. The two-phase region is entirely enclosed by one-phase region **O**. Phase separated complex of hyaluronan-surfactant transforms into clear concentrated phase with high content of water.

Rheological characterization is an essential work piece for systems polyelectrolyte-surfactant **O**. Fukada et al. **O** studied the interaction between sodium hyaluronate and decyltrimethylammonium bromide (DTAB) by phase behavior, viscosity and dynamic shear

moduli studies. The influence of four nonionic surfactants (isododecyl and cetyl polyoxyethylene ethers) on aqueous polysaccharide solutions (sodium alginate, guar gum and sodium carboxymethyl guar), applicable for textile printing pastes, were studied via rheological measurements by Fijan et al. **O**. The combined influence of both anionic and nonionic surfactants in sferoglucan solution was examined under continuous and oscillatory shear conditions by Bais et al. **O**

Materials and methods

Commercially manufactured sodium hyaluronate produced by specialized manufacturer CPN, s.r.o. (Czech republic) was used in three molecule weights 300 kDa, 700 kDa and 2 MDa as anionic polyelectrolyte. Cetyltrimethylammonium bromide was supplied by Fluka; ultra 99 % AT as cationic surfactant. All samples and stock solutions were prepared in 0,15 M NaCl (Lachner, p.a.) solution and for preparation was used triple distilled water (Miliphore Academics). Samples were prepared by mixing of stock solutions of NaHy (0,5 %; 2 % wt.) and stock solutions of CTAB (0,05 M; 0,2 M) in the rate of 1:1. Thus, samples were prepared with different ratios of P/S (P- number of binding sites on the polymer and S - number of surfactant molecules). Samples having the following ratios of P/S and designations: 2% wt. NaHy + 50 mM CTAB (P/S 1, **2/50**), 2% wt. NaHy + 200 mM (P/S 4, **2/200**), 0,5% wt. NaHy + 50 mM CTAB (P/S 4, **0,5/50**), 0,5% wt. NaHy + 200 mM CTAB (P/S 16, **0,5/200**). All samples were centrifugated for the duration of 15 min at 4000 turns on rotational centrifuge.

Rheology measurements of concentrated phases were recorded on Rheometer AR-G2, TA instruments using cone and plate geometry with sensor 40 mm; 1° steel cone. The tests were carried out at the controlled temperature 25 °C. Samples of each formulation were allowed to equilibrate for at 15 min prior to analysis. To avoid water evaporation was used sensor with solvent trap. To evaluate the viscoelastic properties of the samples we performed small amplitude oscillatory shear experiments. In particular, the shear storage modulus or elastic modulus (G') and the loss modulus or viscous modulus (G'') were evaluated as function of frequency. The flow behaviour was investigated with steady state flow tests where viscosity was evaluated as a function of shear rate.

Oscillatory tests were fitted with generalized Maxwell model. The equation is as follows

$$G(t) = G_e + \sum_{i=1}^j G_i \cdot e^{-\frac{t}{\lambda_i}}, \quad (1)$$

where j is the number of simple Maxwell elements, G_i and λ_i are parameters belonging i^{th} element, wherein G_i is a relaxing function of the form $G_i = f(\lambda_i)$. For each module in the oscillatory measurements with small amplitude is valid

$$G'(\omega) = \sum_{i=1}^j \frac{G_i \cdot \lambda_i^2 \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2} = \sum_{i=1}^j \frac{\eta_i \cdot \lambda_i \cdot \omega^2}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2}, \quad (2)$$

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^j \frac{G_i \cdot \lambda_i \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2} = \sum_{i=1}^j \frac{\eta_i \cdot \omega}{1 + (\lambda_i \cdot \omega)^2}. \quad (3)$$

For the measured curves was used model with five simple Maxwell elements. The generalized Maxwell model parameters were evaluated for each model element. It was a relaxing time λ_{1-5} and components of each module G'_{1-5} and G''_{1-5} . Further, from the measured dependence of elastic and viscous moduli was also evaluated cross-over position.

To evaluate the flow curves which were plotted the dependence of viscosity on shear rate was used cross equation:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{[1 + (K\dot{\gamma})^m]}. \quad (4)$$

This model has a sigmoidal course and four parameters - limiting viscosity at infinitely small shear rate η_0 , limiting viscosity at a shear rate approaching infinity η_{∞} , the constant K , known as consistency in seconds, and a dimensionless constant m known as the speed index.

Results and discussion

Oscillatory measurements

All data were taken in the region of linear viscoelasticity determined in preliminary experiments. Results showed clear dependence on hyaluronan molecular weight and composition of gels. First, data measured for each molecular weight are discussed. Loss modulus of gels prepared with 300 kDa hyaluronan and 200 mM CTAB was higher than storage modulus in the whole range of measurement frequencies regardless the hyaluronan contents (Fig. 1). In other words, no crossing point of curves representing the dependence of moduli on frequency was observed, the crossing frequency was higher for the lower contents of hyaluronan. Both moduli reflected the composition and increased in the order 0.5/200 < 2/200 < 2/50 < 0.5/50, particularly at higher frequencies.

Gels prepared with the 700 kDa hyaluronan showed crossing of moduli dependences regardless their composition (Fig. 2). The values of modulus and frequency at the crossing point were dependent on composition. The modulus value at the crossing point increased in the order: 0.5/200 < 2/200 < 2/50 < 0.5/50, whereas the crossing frequency in the order: 0.5/50 < 2/50 < 2/200 < 0.5/200, i.e. in the reversed order. Both moduli reflected the composition and increased in the same way and order as those of gels prepared with 300 kDa hyaluronan. The moduli are generally higher for the gels prepared with 700 kDa hyaluronan in comparison to the gels prepared with 300 kDa hyaluronan (at corresponding frequencies). Loss moduli of all samples (particularly of sample 0.5/50) indicates approaching a plateau at high frequencies.

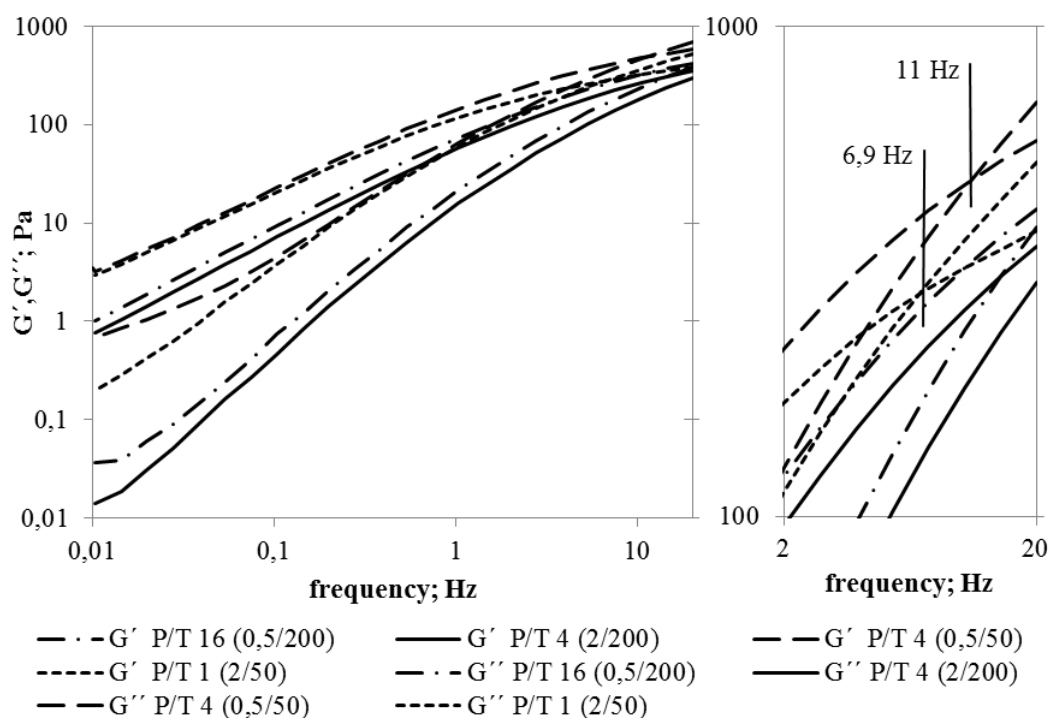


Fig. 1: Dependences of elastic and viscous modulus on frequency for systems with 300 kDa hyaluronan and with different composition during preparing, concretely 0.5 % HyA/ 50 mM or 0.5 % HyA/ 200 mM or 2 % HyA/ 50 mM or 2% HyA/ 200 mM.

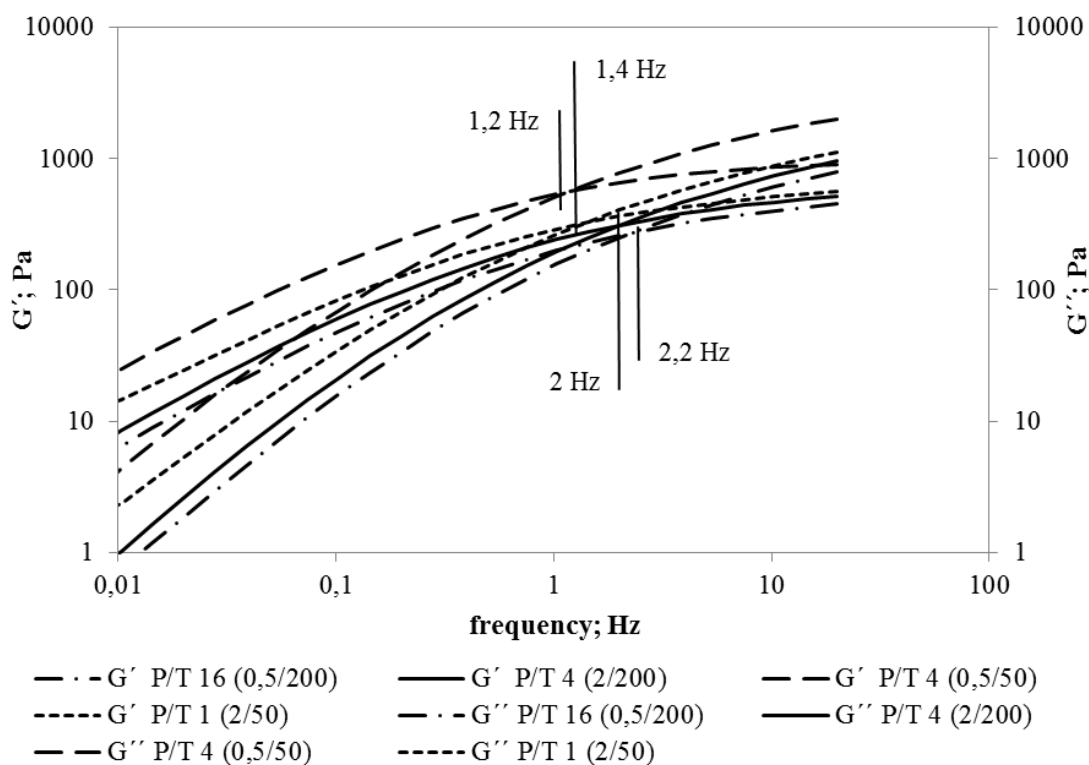


Fig. 2: Dependences of elastic and viscous modulus on frequency for systems with 700 kDa hyaluronan and with different composition during preparing, concretely 0.5 % HyA/ 50 mM or 0.5 % HyA/ 200 mM or 2 % HyA/ 50 mM or 2% HyA/ 200 mM.

Gels prepared with 2 MDa hyaluronan showed the most dominating elastic behavior. Their crossing frequencies were the lowest ones when compared with gels prepared with hyaluronan of lower molecular weights. However the modulus value at the crossing point increased in the same order as given previously. The crossing frequency followed the order $0.5/50 < 2/50 < 0.5/200 \approx 2/200$. Also in this case both moduli were dependent on composition and generally increased analogically as observed for gels prepared with hyaluronan of lower molecular weights. Loss moduli showed clear plateau mostly with a broad maximum. Much lower values of the loss modulus than the storage modulus are typical for crosslinked rubber and showing a local maximum for the former is sometimes also observed for rubbers but is more pronounced in concentrated polymeric liquids (O). The gels prepared with 2 MDa hyaluronan had the highest values of the storage modulus; the values of the loss moduli were comparable to those of gels prepared with 700 kDa hyaluronan.

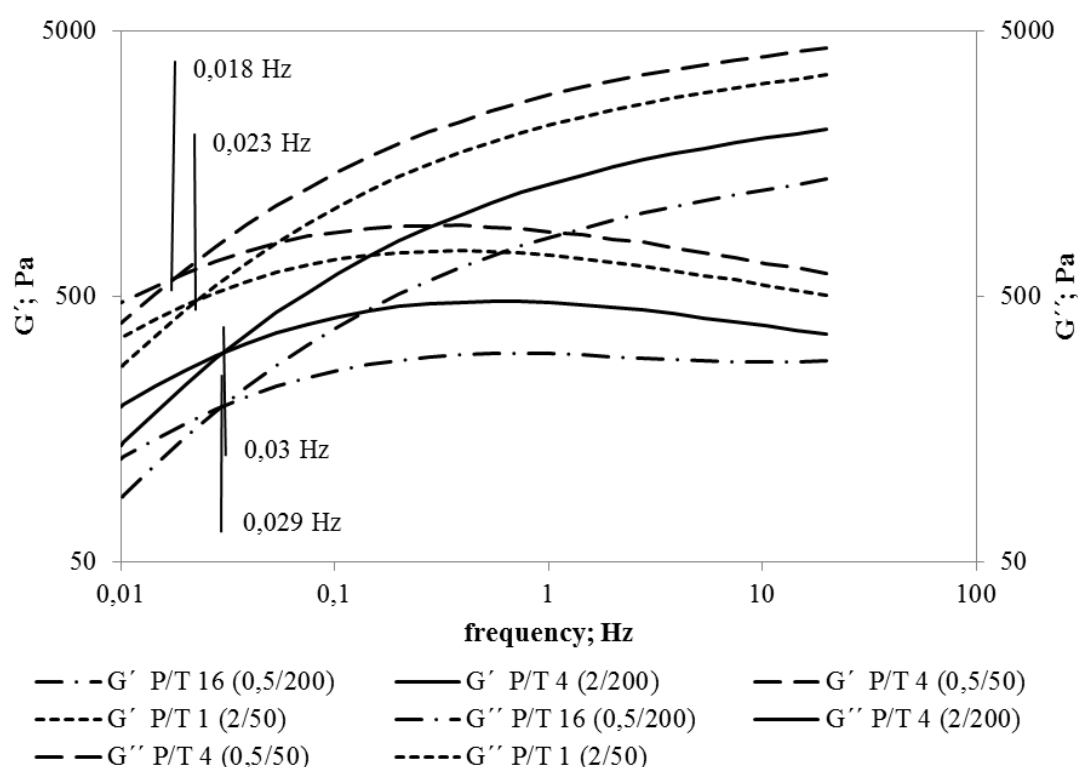


Fig.3: Dependences of elastic and viscous modulus on frequency for systems with 2 MDa hyaluronan and with different composition during preparing, concretely 0.5 % HyA/ 50 mM or 0.5 % HyA/ 200 mM or 2 % HyA/ 50 mM or 2% HyA/ 200 mM.

Tab. 1 shows the parameter values for each element generalized Maxwell model. Relaxation time of the first element in all samples, ranging in tenths of seconds, and within the same molecular weight does not change much. However, with increasing molecular weight, it is growing. The same trend applies to the second relaxation time, but he reaches values in units of seconds. Third relaxation time is within a molecular weight significantly changes only if Hya 300 kDa is used, which is considerably lower for the samples containing 50 mmol.dm⁻³ CTAB. Fourth relaxation time then all samples ranging in hundredths of a second and does not change significantly, even within a single molecular weight, or at increasing molecular weight. In the latter case, only very slightly increase is seen. Changes of relaxation time of fifth element again show a trend similar to the first and second element.

Within a molecular weight does not change much, but slightly increases with increasing molecular weight used.

Tab. 1: The parameters for each element generalized Maxwell model

composition		element 1		element 2		element 3		element 4		element 5	
		G ₁ ; Pa	λ ₁ ; s	G ₂ ; Pa	λ ₂ ; s	G ₃ ; Pa	λ ₃ ; s	G ₄ ; Pa	λ ₄ ; s	G ₅ ; Pa	λ ₅ ; s
300 kDa	2/50	278	0,22	72	1,20	0,36	77	775	0,03	6,76	7,19
	0,5/50	338	0,22	70	1,20	1,12	105	1173	0,03	6,05	7,67
	2/200	156	0,18	18	1,07	0,01	799	904	0,02	0,50	7,83
	0,5/200	206	0,17	29	0,95	0,03	720	1002	0,02	1,26	6,13
700 kDa	2/50	491	0,30	232	1,64	5,86	64	975	0,04	51	9,17
	0,5/50	886	0,34	402	1,85	10,25	65	1511	0,05	89	10,15
	2/200	426	0,31	167	1,69	2,45	61	907	0,04	30	9,32
	0,5/200	355	0,30	133	1,67	1,49	69	798	0,04	22	9,27
2000 kDa	2/50	850	0,51	967	3,34	366	138	814	0,06	764	20,04
	0,5/50	1038	0,50	1219	3,36	516	150	980	0,06	999	20,86
	2/200	584	0,50	616	3,28	190	132	584	0,06	440	19,64
	0,5/200	372	0,47	389	3,13	123	130	472	0,05	283	19,15

The viscoelastic properties of gels were significantly affected by the hyaluronan molecular weight. As expected, stronger and tougher gels were obtained with hyaluronan of the highest molecular weight. Composition effects were similar within each series of gels prepared with hyaluronan of the same molecular weight. The toughest gels were obtained for the most diluted systems, i.e. gels prepared from solutions of 0.5% hyaluronan and 50 mM CTAB. The softest gels, in fact highly viscous liquids, resulted from solutions of 0.5% hyaluronan and 200 mM CTAB.

Shear measurements

Most gels showed a behavior close to newtonian liquids within the measurable range of shear rates, i.e. a broad interval of shear rates with constant viscosity. It was thus quite easy to determine the zero shear viscosity for all samples and their values are given in Table 2. On contrary, the critical shear rate at the transition from newtonian-like to non-newtonian behavior could not been determined for most samples and is not further discussed.

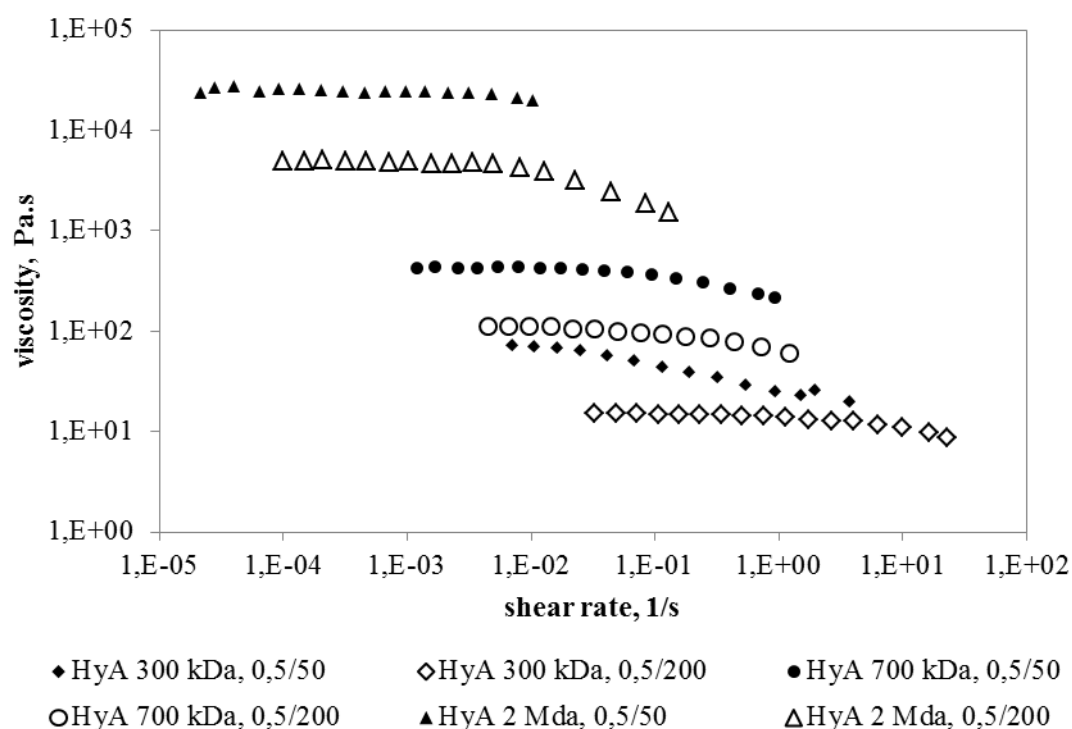


Fig. 4: Dependences of viscosity on shear rate for systems 0.5 % HyA/ 50 mM and 0.5 % HyA/ 200 mM and all three molecular weights of hyaluronan.

Tab. 2: Values of η_0 determined using Cross equation

composition	$\eta_0; \text{Pa.s}^{-1}$			
	2/50	0,5/ 50	2/200	0,5/200
300 kDa	53,4	58,2	11,7	15,3
700 kDa	283,3	435,8	154,4	116,4
2000 kDa	16185	24357	7441	4965

Zero shear viscosity increased with the hyaluronan molecular weight significantly. Zero shear viscosity of samples prepared with the same molecular weight is dependent on the CTAB contents – higher value was found for the lower CTAB concentration (50 mM). The effect of concentration of hyaluronan of a given molecular weight was dependent on this molecular weight. In the case of low molecular weight hyaluronan the effect of its concentration is weak, higher contents only slightly decreased the zero shear viscosity. In the case of samples prepared from hyaluronans of higher molecular weights the effect of hyaluronan contents was determined also by the CTAB concentration – zero shear viscosity increased in following order: 0.5/200<2/200<2/50<0.5/50 which is the same order as that observed for the modulus value at the crossing point in oscillatory measurements.

Influence of molecular weight

Molecular weight has fundamental effect on rheological properties of concentrated phases in samples. Rheological characteristic for the system prepared by HyA 2%/CTAB 200 mM solutions are showed in figure 5. Significant shift of cross over with changing molecular weight is obvious. With increasing molecular weight is cross over by lower frequencies and concentrated phase is stiffer. It means that rheological properties of samples are to a certain extent modifiable by the changing of constitution.

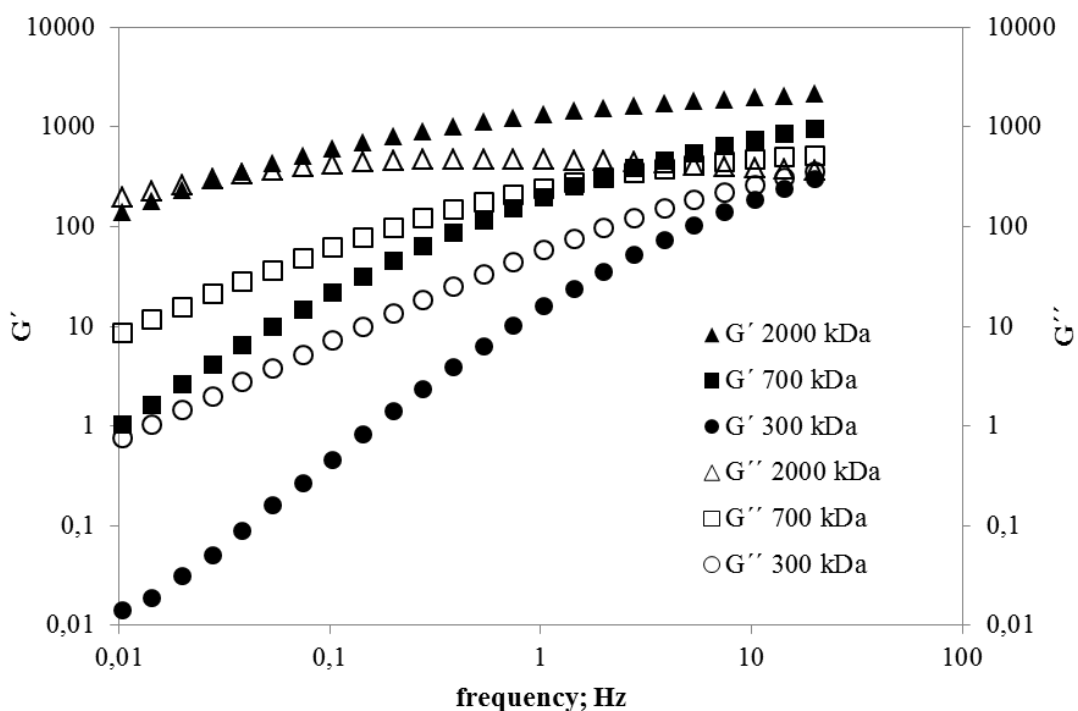


Fig. 5: Dependences of elastic and viscous modulus on frequency for system HyA 2%/CTAB 200 mM with three different molecular weights hyaluronan.

Conclusion

Generally one can say that, for one and the same molecular weight as the nature of the sample depends mainly on the concentration of the initial solution of CTAB, which is probably due to the different arrangement of aggregates in the starting surfactant solution which interacts with hyaluronan to form gel phases with different properties. Effect of molecular weight hyaluronan just grows with the increasing value of this parameter. Longer chains of NaHy, with high molecular weight, will have in solution different conformations due to their different concentration. It can be presumed, that this high molecular chains in a higher concentration will create the polymer network itself. For binding aggregates CTAB therefore be accessible only a limited number of binding sites on the polymer chain. This will affect the internal structure of the resulting gel phases. This effect will be greater with increasing chain stiffness. At higher molecular weights thus prevails elastic nature of the sample, and these gels have limited flow properties. While when using a lower molecular weight component of viscous behavior prevails, gels thus flow better, but their mechanical strength is low.

10.5 Příloha 5: Životopis

Životopis

Osobní informace

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

Vzdělání

2009 – současnost **VUT Brno, chemická fakulta,**
Doktorský program: Fyzikální chemie, obor: Fyzikální chemie
Dizertační práce na téma: Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul

2007 – 2009 **VUT Brno, chemická fakulta,**
Magisterský program: Spotřební chemie, obor: Spotřební chemie
Diplomová práce na téma: 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 na téma: Vliv fyzikálních vlastností roztoku na agregaci polysacharidů

2000 – 2004 **Gymnázium Blansko,**
maturitní zkouška: chemie, biologie, Aj, Čj

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 International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Strasbourg, FR
2011	5th Chemistry & Life, Brno, CZ (Nejlepší poster studentské sekce)
2012	ECIS 2012, Malmö, SE
2013	13th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 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