



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYALURONANOVÉ HYDROGELY NA BÁZI CTAT

HYALURONAN-CTAT HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Velcer

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP1003/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Tomáš Velcer	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Hyaluronanové hydrogely na bázi CTAT

Zadání diplomové práce:

Seznámit se s hydrogely vznikajícími interakcí opačně nabitých polyelektrolytů a tenzidů a vlastnostmi tenzidu CTAT. Prostudovat přípravu a vlastnosti hydrogelů na bázi hyaluronan-CTAT.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Tomáš Velcer
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce zkoumá vlastnosti a chování fázově separovaných hydrogelů připravených interakcí hyaluronanu s opačně nabitými tensidy. Pro porovnání byly vybrány tři zástupci, konkrétně cetyltrimethylamonium bromid, chlorid a *p*-toluensulfonát (CTAB, CTAC, CTAT). Pomocí metody reologie bylo zjištěno, že použitím tensidu CTAT vznikají nejrigidnější gely a vyšší molekulová hmotnost hyaluronanu má přímý vliv na objem a tuhost vzniklých gelů. Srovnání metod přípravy bylo také diskutováno, přičemž se jako nejvhodnější jeví míchání připravených zásobních roztoků komponent. Maloúhlový rozptyl rentgenového záření byl použit pro stanovení tvaru a velikosti micel tensidů. Ukázalo se, že tvar micel nemá vliv na objem vzniklého gelu. Výsledky této práce naznačují, že dané gely jsou si do jisté míry konkurenceschopné a inkorporování hyaluronanu do jejich sktruktury je žádoucí s ohledem na jeho biologickou aktivitu. Nabízí se tak potenciální použití těchto látek na poli medicínských aplikací.

ABSTRACT

This thesis studies the properties and behaviour of phase-separated hydrogels prepared by interaction of hyaluronan with oppositely charged surfactants. Three representatives of surfactants, namely cetyltrimethylammonium bromide, chloride and *p*-toluensulfonate (CTAB, CTAC, CTAT), were selected for comparison. Using the method of rheology, the fact that the system of Hya-CTAT forms the most rigid hydrogels has been proved. Higher molecular weight of hyaluronan has also direct influence on the volume and stiffness of the newly formed hydrogels. Preparation methods were compared as well. Mixing the stock solutions of entry components appeared to be the most suitable. Small-angle X-ray scattering was used for determination of shape and size of surfactant's micelles, concluding that it has no effect on the volume of formed gels. The results of this study indicate that given gels are to a certain extent competitive and incorporation of hyaluronan into their structure is desirable with respect to its biological activity. This offers a potential usage of these substances in the field of medical applications.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, cetyltrimethylamonium bromid, cetyltrimethylamonium chlorid, cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonát, hydrogely, reologie, maloúhlový rozptyl rentgenového záření

KEYWORDS

hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, cetyltrimethylammonium chloride, cetyltrimethylammonium *p*-toluensulfonate, hydrogels, rheology, small-angle X-ray scattering

VELCER, T. *Hyaluronanové hydrogely na bázi CTAT*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 102 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

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

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

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho neutuchající trpělivost při diskutování výsledků a Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za rozsáhlou spolupráci, užitečné rady a předání znalostí při osvojování metody reologie.

Poděkování patří také Mgr. Tomášovi Klumplerovi, Ph.D., z Centrální laboratoře RTG difrakce a Bio-SAXS Středoevropského technologického institutu, za pomoc a ochotu při měření malouhlového rozptylu rentgenového záření, stejně tak děkuji Ing. Jiřímu Másilkovi, Ph.D. za konzultace a pomoc při interpretaci těchto dat.

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

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Hyaluronan.....	8
2.1.1	Struktura.....	8
2.1.2	Síťování.....	10
2.1.3	Syntéza	11
2.1.4	Metabolismus	12
2.1.5	Výskyt a význam v organismu.....	12
2.1.6	Využití.....	13
2.2	Tenzidy	14
2.2.1	Tvorba micel	15
2.2.2	Velikost a tvar micel	17
2.2.3	Solubilizace.....	19
2.2.4	Cetyltrimethylamonium bromid.....	20
2.2.5	Cetyltrimethylamonium chlorid.....	21
2.2.6	Cetyltrimethylamonium <i>p</i> -toluensulfonát	21
2.2.7	Interakce polymer-tenzid	22
2.2.8	Interakce hyaluronanu s kationtovými tenzidy	23
2.3	Gely.....	24
2.3.1	Vznik.....	24
2.3.2	Vlastnosti	25
2.3.3	Hydrogely	26
2.3.4	Využití.....	27
2.4	Reologie	27
2.4.1	Hookův zákon	27
2.4.2	Newtonův zákon	27
2.4.3	Viskoelasticita.....	29
2.4.4	Oscilační testy	29
2.4.5	Tokové testy	30
2.4.6	Měřicí systémy.....	30
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	32
3.1	Hyaluronan v cílené distribuci	32
3.2	Interakce hyaluronan-tenzid.....	33
3.3	Hyaluronové hydrogely v medicínských aplikacích.....	34

3.4	Vlastnosti tenzidu CTAT a problematika micel typu worm-like.....	35
4	CÍLE PRÁCE	39
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
5.1	Materiály	40
5.2	Příprava zásobních roztoků a vzorků fázově separovaných hydrogelů	40
5.2.1	Příprava zásobního roztoku NaCl	40
5.2.2	Příprava zásobního roztoku hyaluronanu.....	40
5.2.3	Příprava zásobního roztoku tenzidu.....	40
5.2.4	Příprava fázově separovaných hydrogelů	40
5.3	Metody měření a standardní vyhodnocení dat	42
5.3.1	Reologie - oscilační testy	42
5.3.2	Reologie – tokové testy	43
5.3.3	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
6.1	Vizuální charakterizace chování a vlastností hydrogelů.....	46
6.2	Charakterizace hydrogelů metodou reologie	63
6.2.1	Oscilační testy	63
6.2.2	Tokové testy	79
6.3	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření	85
7	ZÁVĚR	88
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	91
9	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	101
9.1	Seznam zkratk	101
9.2	Seznam symbolů	102

1 ÚVOD

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

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

Jedná se o hydrofilní, tělu vlastní látku, schopnou silně vázat vodu. Nachází se např. v očním sklivci nebo v synoviální tekutině, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem plní nezaměnitelnou funkci. Po svém objevení byl hyaluronan postupně uplatňován v celé řadě odvětví jako v oftalmologii, kosmetologii a posléze až v hojení ran. Zjistilo se však, že má unikátní citlivost na receptory silně exprimující nádorovou tkáň. Tohoto faktu je možno využít právě pro cílenou distribuci léčiv. Nicméně nemodifikovaný hyaluronan je jen těžko schopen rozpustit nepolární látky. Jedna z možností je využití již zmíněné elektrostatické interakce s kationtovými látkami, nejčastěji tenzidy, k vytvoření fázově separovaného hydrogelu.

Tato diplomová práce se zabývá přípravou a vlastnostmi gelů vzniklých na bázi hyaluronanu a kationtového tenzidu cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonátu (CTAT), který není tak hojně, jako např. cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), využíván na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně na tvorbu fázově separovaných hydrogelů. Je známo, že tento tenzid tvoří oproti CTAB jiný typ micel, i přesto že se strukturně liší pouze v protiiontu. Použitím zejména reologických metod je provedena základní charakteristika gelů na bázi CTAT. Výsledky měření vlastností těchto vzorků jsou dále porovnávány s jinými tenzidy velmi podobného typu, kdy je diskutováno jejich případné použití na poli medicínských aplikací. V kapitole 6.3 jsou uvedeny prvotní výsledky pokusu použití metody malouhlového rozptylu rentgenového záření k charakterizaci struktury těchto gelů. Z provedené rešerše totiž vyplývá, že daná metoda je klasicky používána k charakterizaci těchto typů látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan

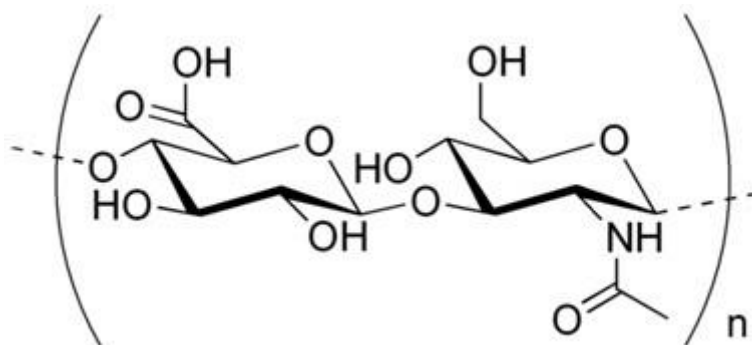
Hyaluronan patří do skupiny mukopolysacharidů, neboli glykosaminoglykanů (GAG), které se přirozeně vyskytují ve všech živých organismech. Je považován za nejjednodušší z GAG, narozdíl od ostatních zástupců této třídy polysacharidů však neobsahuje sulfátovou skupinu.

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

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

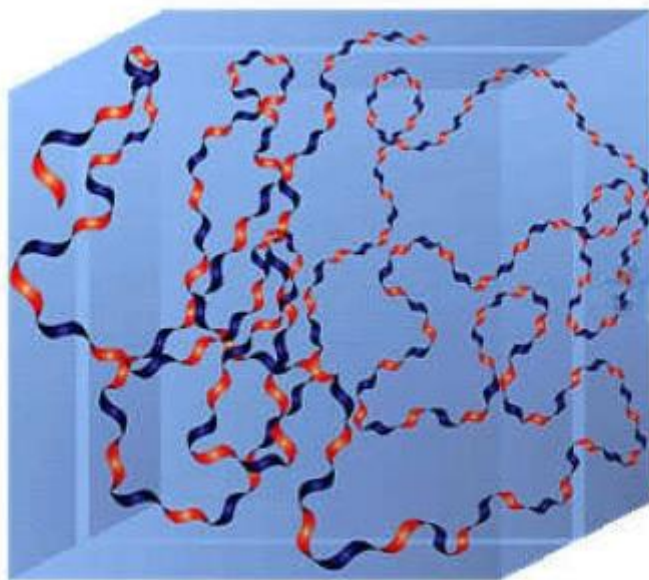
2.1.1 Struktura

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



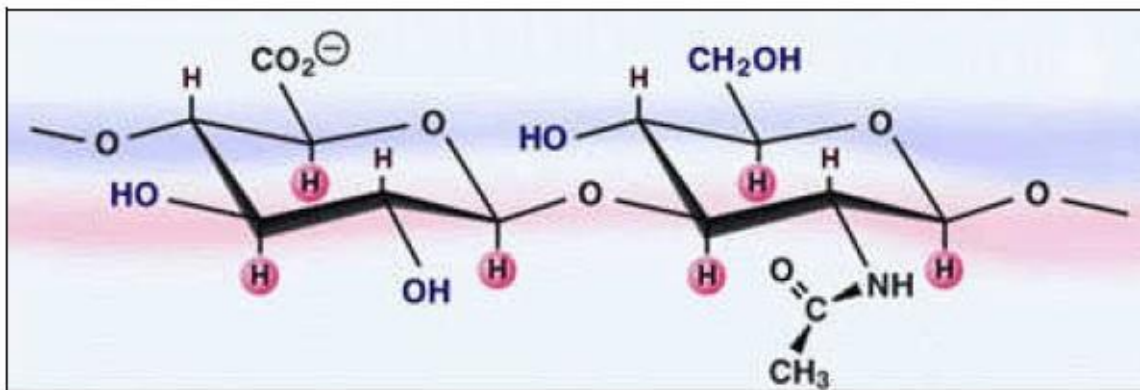
Obr. 1: Struktura kyseliny hyaluronové

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



Obr. 2: Struktura hyaluronanu v roztoku [4]

Objemnější části molekuly přechází do ekvatoriální polohy a tvoří polární část molekuly, zatímco malé vodíkové atomy tvoří axiální rovinu, kde tvoří nepolární oblast nazvanou jako „hydrophobic patch“ [4]. Tyto hydrofobní oblasti se pravidelně střídají a umožňují agregaci s dalším antiparalelním řetězcem hyaluronanu, což má za následek rovnoměrný růst agregátů po obou stranách. Hydrophobic patches jsou poměrně objemné a obsahují asi 8 uhlíkových atomů. Díky nim lze hyaluronan považovat za amfifilní molekulu, která má sice vlastnosti silně hydrofilního materiálu, ale současně obsahuje hydrofobní oblasti charakteristické pro lipidy.



Obr. 3: Disacharidová jednotka hyaluronanu – oblast axiálních vodíků je zobrazena růžovým pruhem [4]

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

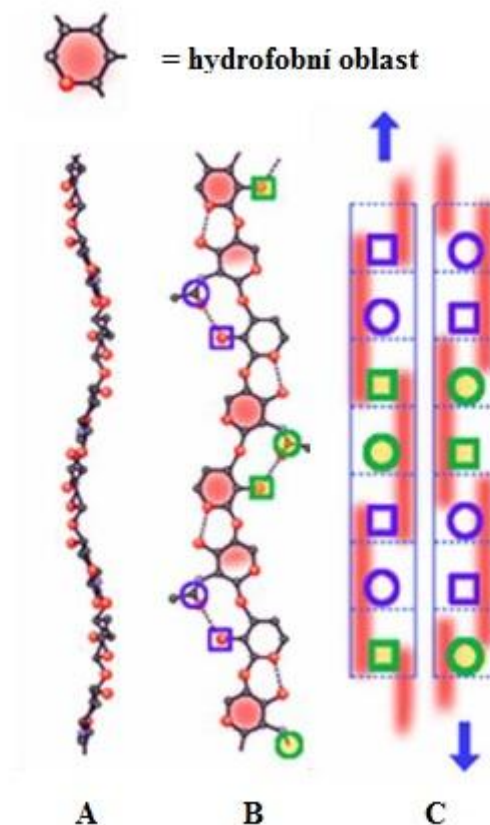
má za příčinu tvorbu extrémně viskózních roztoků se specifickými reologickými vlastnostmi již při nízkých koncentracích.

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

2.1.2 Sít'ování

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

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



Obr. 4: Síťová struktura hyaluronanu – A a B jsou zobrazení molekuly hyaluronanu, červené oblasti značí hydrofobní místa na střídajících se stranách polymerního řetězce, kruhy reprezentují acetamidovou skupinu a čtverce karboxylovou. Část C představuje schéma možné interakce mezi dvěma řetězci hyaluronanu. Molekuly jsou si navzájem antiparalelní. Sacharidová jednotka je ohraničena tečkovanou čarou. Hydrofobní místa jsou opět značena červeně a přiléhají těsně k sobě [4]

2.1.3 Syntéza

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

Od roku 1980 se však využívá i ekonomicky výhodnější fermentace bakterií kmene *Streptococcus* nebo *Pasteurella*. Jedná se o lidské, resp. zvířecí patogeny. Základem je fakt, že tyto bakterie si tvoří z hyaluronanu extracelulární kapsuly. Takto syntetizovaný hyaluronan je pro tělo obratlovce k nerozeznání od vlastního. To umožňuje bakteriím nepozorovaně napadnout hostitelský organismus a v něm bujet, aniž by byly ohroženy imunitním systémem daného organismu. Při genetické úpravě těchto bakterií na nepatogenní, lze takto získávat hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti, velmi vysoké čistotě a s mnohem větším

výtěžkem než při extrakci z živočišných zdrojů. Po samotné fermentaci jsou bakterie odfiltrovány a kyselina hyaluronová se čistí ultrafiltrací. Získaný produkt se ještě několikrát přečistí srážením cetylpyridinium chloridem a ethanolem pro odstranění glykosaminoglykanů a živočišných proteinů, které jsou hlavní složkou nečistot. Krok přečištění se může opakovat dle potřeby, k dosažení požadované čistoty [7, 8, 9, 10].

2.1.4 Metabolismus

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

V organismu savců je kyselina hyaluronová syntetizována třemi různými enzymy, a to hyaluronansyntázami 1, 2 a 3 (HAS1, HAS2, HAS3). Jedná se o transmembránové proteiny, které jako jediné enzymy disponují více funkcemi. Každý z nich má jinou katalytickou aktivitu, potřebnou na přenos jednotek N-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny. HAS1 a HAS2 jsou nejméně aktivní a řídí syntézu vysokomolekulárního hyaluronanu. Naopak HAS3 je nejaktivnější, řídící syntézu velkého množství řetězců nízkomolekulárního hyaluronanu [11, 12]. Syntéza řetězce hyaluronanu obsahujícího velký počet disacharidových jednotek je pro buňky vysoce energeticky náročná, a proto je přísně regulována. Hyaluronan je nejjednodušší glykosaminoglykan lišící se od ostatních tím, že jako jediný není sulfonovaný a není kovalentně vázaný s proteiny. Samotný proces syntézy probíhá v plasmatické membráně buňky, čímž se také odlišuje od ostatních polymerů svého druhu, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu. Příslušný enzym v buněčné membráně střídavě váže k redukujícímu konci řetězce jednotlivé monosacharidové jednotky a narůstající polymer je pak vytlačen do extracelulární matrix. Tam je schopen tvořit nadmolekulární komplexy s jinými látkami, např. proteiny. Ostatní glykosaminoglykany jsou naopak syntetizovány na neredukujícím konci jejich řetězců [4, 8].

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

2.1.5 Výskyt a význam v organismu

Kyselina hyaluronová je přirozeně přítomná v tkáních všech obratlovců, jakožto součást extracelulární matrix, ve formě sodné a draselné soli. Lidské tělo obsahuje přibližně 15 g hyaluronanu, přičemž velký podíl této látky nalezneme v naší kůži. Slouží zde jako jakýsi organizátor tkáně a zajišťuje hydrataci, jelikož je schopen na sebe navázat až 1 000krát více vody než je jeho samotný objem. V některých tkáních tvoří hlavní komponentu, např. v očním sklivci, kde zajišťuje správnou optickou refrakci oka při zobrazování obrazu na sítnici. Ve formě velmi viskózních roztoků je důležitou součástí chrupavek. V synoviální tekutině

sníží tření a tlumí nárazy kloubů, v oocytech naopak ovlivňuje ovulaci. Vyskytuje se též v pupeční šňůře, plicích, ledvinách, mozku a svalech. Dále odhaluje aktivitu volných radikálů, podporuje buněčnou migraci, angiogenezi, hojení ran, a zejména produkci nové granulační tkáně během zánětu.

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

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

2.1.6 Využití

V lékařské a farmaceutické praxi má využití hyaluronanu obrovský potenciál. Jelikož se jedná o látku tělu vlastní, je jeho použití velmi šetrné. Není cytotoxický, teratogenní ani imunogenní. Naopak je dobře odbouratelný z organismu, přičemž i produkty jeho štěpení, tedy jednoduché cukry, jsou přirozeně biokompatibilní. V širokém měřítku se využívá jeho viskoelastických a hydratačních vlastností na péči o pokožku a vyhlazování vrásek, jelikož s věkem obsah hyaluronanu v kůži klesá, a tím se ztrácí i její pružnost. Nejúčinnější je injekční aplikace přímo do kůže, ovšem naše tělo je schopné hyaluronan během šesti měsíců rozložit. Nechceme-li tedy, aby se nám vrásky vrátily, je třeba podat další injekci [16]. Tím, že váže vodu z okolí, a tím i živiny, se ve formě scaffoldů používá pro léčbu špatně hojitelných, zejména diabetických, ran a jizev. Tyto scaffoldy obvykle obsahují proteiny navázané na hyaluronan pro usnadnění migrace buněk.

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

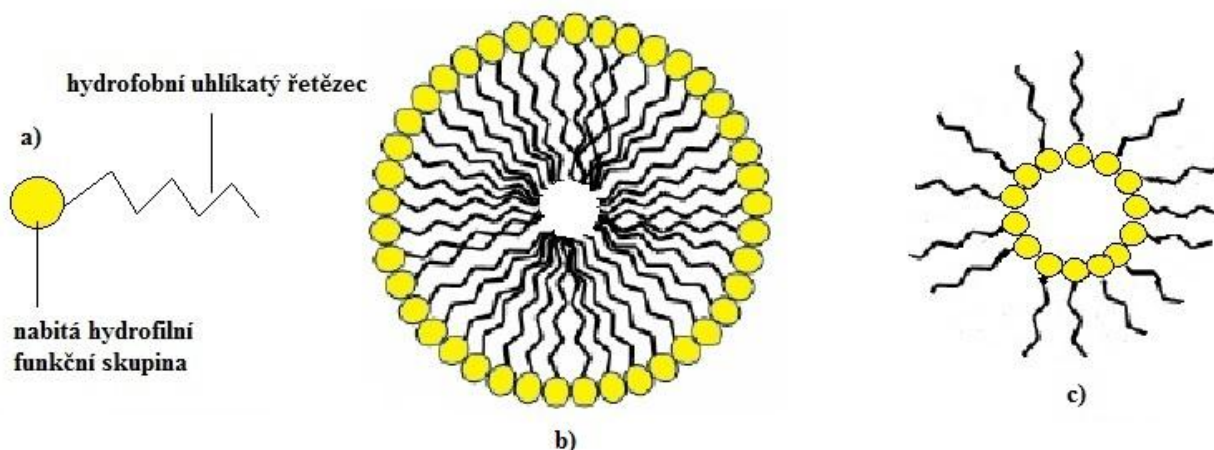
Jelikož je hyaluronan velmi dobře rozpustný a odbouratelný z organismu, nachází jeho použití v tkáňovém či bioinženýrství určitá omezení. Je nutno zavést derivatizace hyaluronanu

ovlivňující jeho rozpustnost. Lze připravit deriváty s alkylovými zbytky navázané esterovou vazbou přes primární nebo sekundární –OH skupinu. Délkou navázaného řetězce lze také redukovat rozpustnost. Další možností je síťování hyaluronanu do formy hydrogelu. Hyaluronové hydrogely vykazují výborné výsledky v tkáňovém inženýrství chrupavek, kdy podporují diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a umožňují tak lepší tvorbu chrupavky [19, 20].

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

2.2 Tenzidy

Některé nízkomolekulární látky poskytují ve vhodném rozpouštědle a velkém zředění pravé roztoky, ale od určité koncentrace asociují do vzniku agregátů koloidních rozměrů. Tyto agregáty se nazývají **micely** a látky, které se chovají tímto způsobem, se nazývají **asociativní** nebo **micelární koloidy**. Právě tenzidy neboli povrchově aktivní látky (PAL) patří mezi asociativní koloidy a jsou význačné tím, že se již při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní a snižují mezifázovou energii. Tento jev je podmíněn jejich zvláštní strukturou. Molekuly tenzidů se skládají ze skupiny, která má velkou afinitu k rozpouštědлу a nazývá se lyofilní (ve vodě hydrofilní) a skupiny, které jsou v daném prostředí prakticky nerozpustné a nazývají se lyofobní (ve vodě hydrofobní), přičemž hydrofilní skupina je většinou silně polární, např. –COOH nebo –SO₃H, naopak hydrofobní skupiny představují nepolární dlouhé uhlovodíkové řetězce. Struktura tohoto typu se nazývá amfipatická nebo amfifilní. V nepolárním prostředí jsou hydrofilní části molekuly uschovány v jádře micely a hydrofobní skupiny tvoří vnější obal, vzniká tzv. inverzní micela. Tvorba těchto inverzních micel je obecně méně výhodná, protože může docházet k nevýhodným elektrostatickým interakcím mezi hydrofilními částmi molekul. V polárním prostředí je tomu naopak.



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

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

Obecně nalézají aniontové a kationtové tenzidy uplatnění v mnoha oborech, především v kosmetickém průmyslu jako součást baktericidních a antistatických přípravků, dále jako detergenty a čisticí prášky, v potravinářském průmyslu jako stabilizátory, v ropném průmyslu a zemědělství. Díky amfifilní struktuře nacházejí tyto látky také využití ve farmaceutickém průmyslu jako potenciální nosiče pro cílenou distribuci léčiv. Zejména se jedná o polymerní micely, liposomy, nano- a mikročástice či hydrogely.

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

2.2.1 Tvorba micel

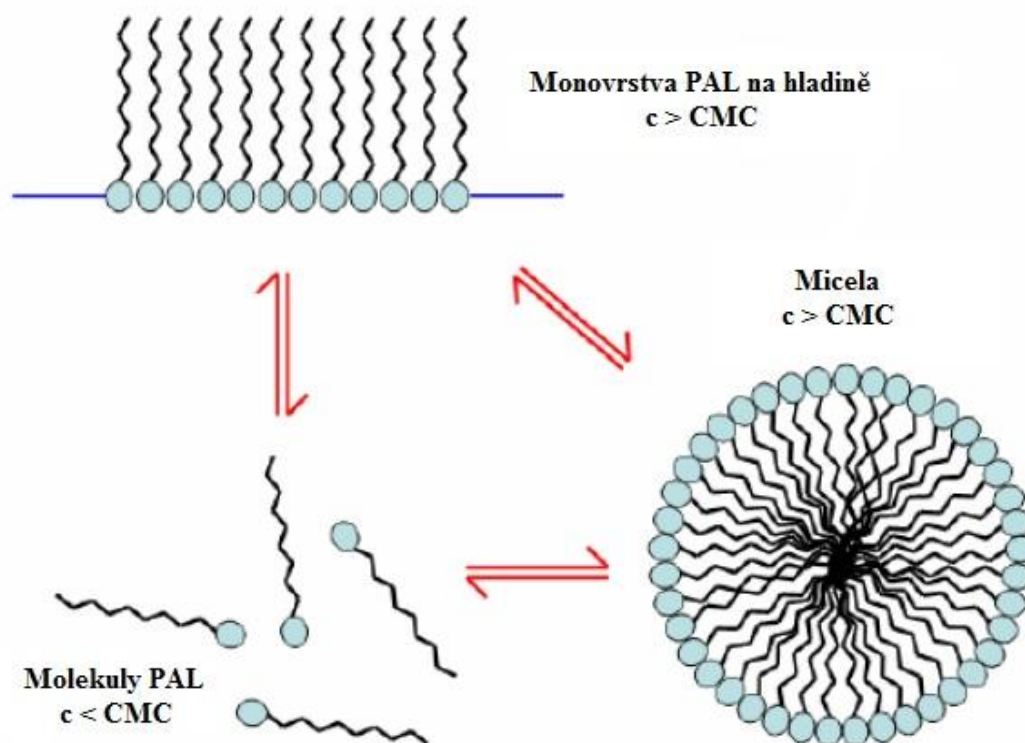
Amfifilní povaha molekul tenzidů má za následek jejich snahu minimalizovat styk jejich nepolárních částí s polárním prostředím a naopak polárních částí, nacházejí-li se v nepolárním prostředí. Ve velkých zředěních se PAL chovají jako pravé roztoky. Při vzrůstající

koncentraci se nacházejí jako volné molekuly i v roztoku, ale ve velké míře se začnou hromadit na mezifázovém rozhraní, kde snižují povrchové napětí. Ve vodném prostředí se polární hlavy orientují dovnitř roztoku, zatímco hydrofobní alkylové řetězce vně. Při úplném nasycení povrchu kapaliny dochází k dosažení tzv. **kritické micelární koncentrace (CMC)**. Je to nejvyšší možná koncentrace, při které se PAL vyskytují v roztoku v molekulové formě. Po překročení této koncentrace začnou tenzidy asociovat do agregátů zvaných micely. Proces micelizace je znázorněn na **obr. 6**. Hnací silou agregace jsou hydrofobní interakce, které jsou spojeny s poměrně značným nárůstem entropie, který je zapříčiněn desolvací hydrofobních alkylových řetězců. Změna entalpie se liší v závislosti na povaze tenzidů. U iontových typů tenzidů je proces agregace exotermní, v případě neiontových se jedná o proces endotermní.

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

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

Hodnota CMC je ovlivněna jak strukturou tenzidu, tak i rozpouštědlem a látkami v něm rozpuštěnými. S rostoucí délkou řetězce tenzidu hodnota CMC klesá, v případech rozvětvených řetězců a přítomností nenasycených vazeb hodnota CMC roste. Při stejné délce řetězce je hodnota CMC nižší u neiontových tenzidů oproti iontovým. V případě obsahu jednoduchých anorganických elektrolytů v roztoku klesá hodnota CMC u iontových tenzidů z důvodu stínění nábojové repulze mezi nabitými hlavami tenzidu. Při přidání vhodné látky, např. polymerů, do roztoku PAL může také dojít k agregaci i při nižší koncentraci než je CMC. Elektrostatickými a hydrofobními interakcemi interaguje tenzid s molekulami polymeru a dochází k vytvoření tzv. „*minimicel*“ tenzidu na povrchu polymeru. Koncentrace, při níž se takto děje, se nazývá **kritická agregační koncentrace (CAC)** – viz kapitola 2.2.7. Tvorbu micel lze naopak i úplně potlačit přidáním silně polární látky např. močoviny [28, 29, 30, 31].



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

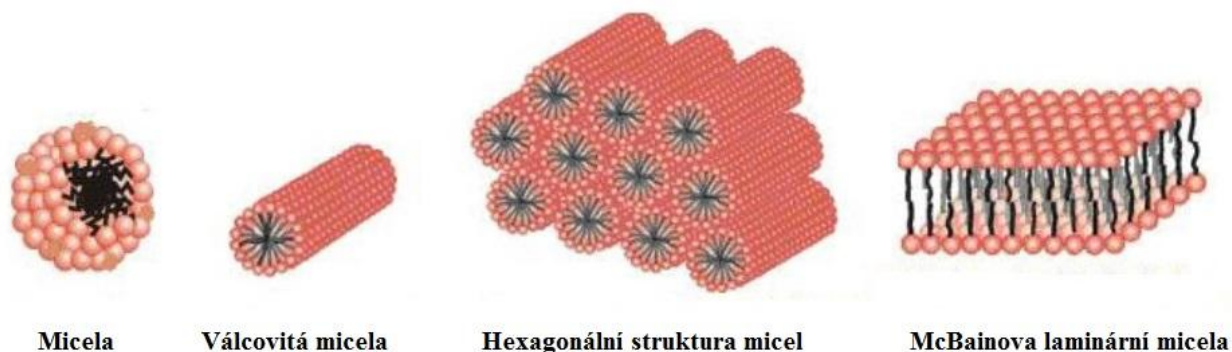
Koloidní roztoky se vyznačují typickým průběhem závislosti různých fyzikálně-chemických veličin na koncentraci, kdy při hodnotě CMC obvykle nastává prudký zlom a změna vlastností. Například povrchové napětí prudce klesá se zvyšující se koncentrací tenzidu, po dosažení CMC se však jeho hodnota již téměř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

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

2.2.2 Velikost a tvar micel

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

válcovité agregáty, hexagonální kapalné krystaly či útvary podobné dvojvrstvě lipidů v buněčných membránách. Tyto dvojvrstvé micely se nazývají McBainovy a jsou složeny ze dvou vrstev tenzidů, které jsou k sobě orientovány uhlovodíkovými řetězci, zatímco polární skupiny směřují směrem ven. Díky laminárnímu uspořádání micel může docházet k přechodu roztoku v gel [23, 25, 35].



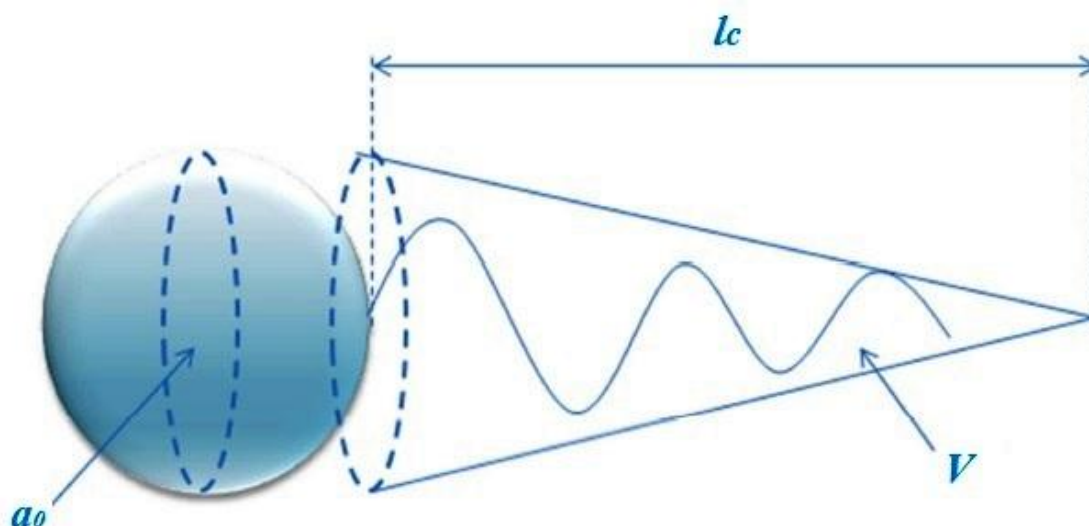
Obr. 7: Změna tvaru micely v závislosti na koncentraci roztoku [23]

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

$$p = \frac{V}{a_0 \cdot l_c}, \quad (1)$$

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

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

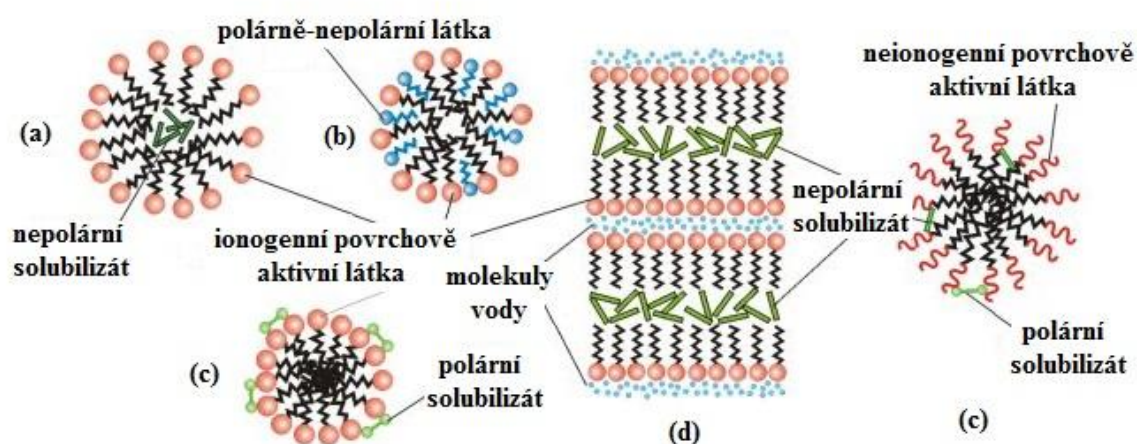


Obr. 8: Schéma molekuly tenzidu s veličinami popisující CPP [36]

2.2.3 Solubilizace

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

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



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

Solubilizační kapacita je definována jako počet molů rozpouštěné látky na 1 mol tenzidu a pro konkrétní povrchově aktivní látky zůstává obvykle stejná v širokém koncentračním

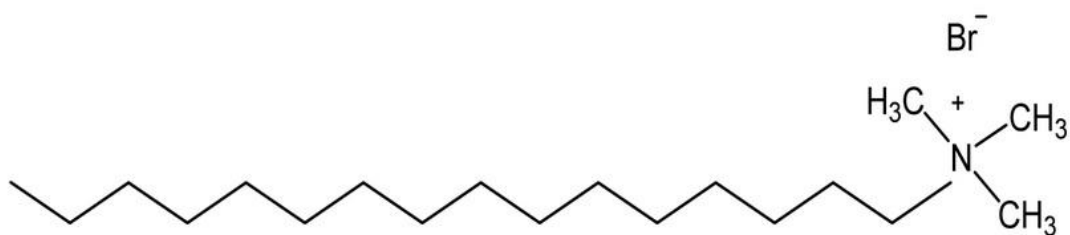
rozmezí nad CMC. Faktory ovlivňující solubilizaci jsou vesměs totožné s těmi, které ovlivňují micelizaci. Jedná se zejména o přídavek elektrolytu, pH roztoku, teplota nebo tlak. Solubilizace také závisí na tvaru micely a podílu z jejího povrchu, na kterém proces probíhá. Ve většině případů je solubilizační kapacita větší pro polární solubilizáty [39, 40].

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

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

2.2.4 Cetyltrimethylamonium bromid

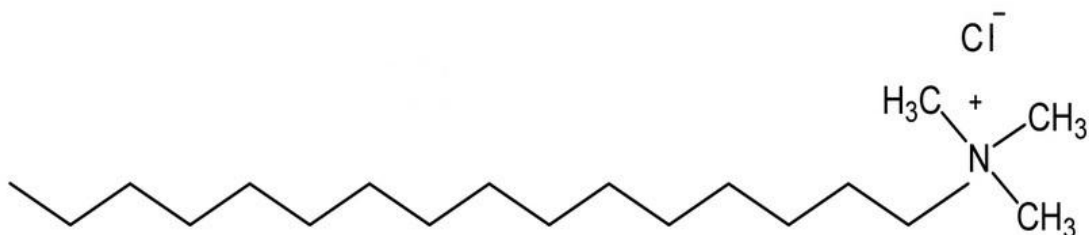
Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) patří mezi kationtové tenzidy, vyskytující se ve formě kvartérní amoniové soli s kladným nábojem na dusíku a funkčním vzorcem $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Br$. Lze se též setkat s názvy hexadecyltrimethylamonium bromid či cetrimonium bromid. Jedná se o bílou krystalickou látku s bodem tání 243 °C. CTAB je rozpustný v alkoholu, poněkud méně ve vodě (3g/l při 20 °C) a mírně i v acetonu. Ve vodných roztocích tvoří, stejně jako všechny ostatní tenzidy, micely s definovanou kritickou micelární koncentrací při 20 °C přibližně 1 mM a agregačním číslem 75–120. Ve vyšších koncentracích či při přídavku vhodné látky přechází micely na tyčinkový popř. červovitý tvar (viz kapitola 3). CTAB vykazuje toxicitu, která při stálé expozici způsobuje trvalé poškození cílových orgánů. Cetrimoniový kation je významné antiseptické činidlo používané proti bakteriím a houbám. Další uplatnění nachází při výrobě zlatých nanočástic, extrakci DNA, dezinfekci chirurgických nástrojů či jako složka vlasových kondicionérů. V posledním jmenovaném případě se právě kvůli poměrně vysoké ceně CTAB velmi často používají jeho levnější obměny jako např. cetrimonium chlorid nebo cetrimonium stearát. Laboratorně se CTAB využívá ke studiu interakcí s opačně nabitými polyelektrolyty např. s hyaluronanem, s nímž ochotně, metodou fázové separace, tvoří hydrogely. Tyto systémy mohou potenciálně zaujmout roli nosiče v cílené distribuci léčiv [43, 44, 45, 46].



Obr. 10: Struktura cetyltrimethylamonium bromidu

2.2.5 Cetyltrimethylamonium chlorid

Cetyltrimethylamonium chlorid patří taktéž mezi kationtové tenzidy, od CTAB se liší pouze protiiontem. Jedná se o bílou krystalickou látku s funkčním vzorcem $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Cl$ a bodem tání $234\text{ }^{\circ}C$. CTAC tvoří sférické micely při koncentraci $1,4\text{ mM}$, přičemž agregační číslo je přibližně rovno hodnotě 83, čímž se příliš neliší od CTAB. Také hodnota jejich volné Gibbsovy energie micelizace je velmi podobná, $-14,76\text{ kJ/mol}$ pro CTAC, resp. $-17,87\text{ kJ/mol}$ pro CTAB. CTAC se používá jako levnější náhražka CTAB převážně v antiseptických a čistících prostředcích, velkou úlohu hraje také v šampónech, vlasových gelech a kondicionérech. Efekt je založen na elektrostatické interakci mezi kladně nabitými hlavami tenzidu a záporně nabitým povrchem vlasového vlákna. Při depozici tenzidu na vlasovou kutikulu se tato stává jemnější a tím se také redukuje elektrostaticky vyvolané odstávání vlasů vyskytující se zejména ve studeném a chladném počasí [47, 48].

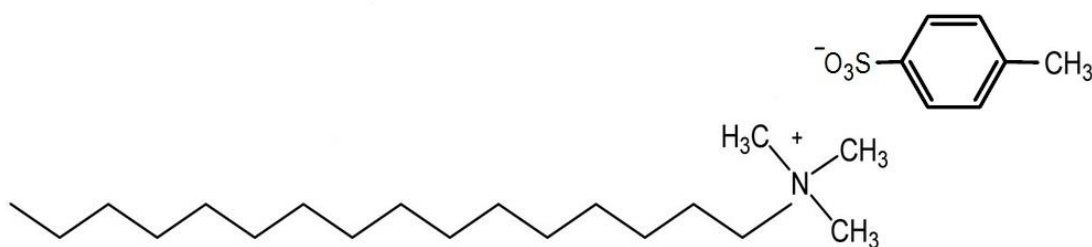


Obr. 11: Struktura cetyltrimethylamonium chloridu

2.2.6 Cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonát

Cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonát či cetyltrimethylamonium tosylát je kationtový tenzid obdobné struktury jako výše zmiňovaní zástupci, liší se však tosylátovým protiiontem. Funkční vzorec pro bílou krystalickou látku s bodem tání $245\text{--}255\text{ }^{\circ}C$ je $C_{26}H_{49}NO_3S$. Stejně jako CTAB i CTAC dráždí oči, kůže a při vdechování či požití je toxický. Sférické micely tvoří již při koncentraci $0,24\text{ mM}$ s agregačním číslem 102. Také s hodnotou $-24,58\text{ kJ/mol}$, jakožto Gibbsovou volnou energií micelizace, se poněkud odlišuje od svých předchozích kolegů. Při koncentraci $1,9\text{ mM}$ dochází v ostrém přechodu k tvorbě červovitých (*worm-like*) micel. Tato koncentrace je označována jako **kritická koncentrace vzniku tyčinkových micel – CRC** (z angl. „critical rod concentration“). Délka těchto micel je závislá především na koncentraci tenzidu, teplotě a iontové síle, kdy se s přidavkem nízkomolekulárního elektrolytu červovité micely prodlužují až do okamžiku, než se začnou shlukovat do klubka. Důvodem tak nízké CRC pro CTAT, na rozdíl od CTAB, u kterého tato hodnota přesahuje koncentraci 200 mM , je aromatická struktura tosylátového protiiontu, který je silně vázán k micelle. Jeho hydrofobní povaha naopak umožňuje interakce s ostatními molekulami tenzidů a tím pádem zapříčiňuje růst micely (viz kapitola 3). Nad 100 mM tvoří CTAT gel, jehož viskoelastické vlastnosti lze cíleně ovlivňovat přesným přidavkem některých aditiv, např.

SiO₂. Použití nachází při studiu vývoje komplexů na bázi křemíku a mědi, a také studiu uhlíkových nanotrubek. Jeho hydrogely jsou zkoumány pro použití v nanobiotechnologiích a medicíně [48, 49, 50, 51, 52].



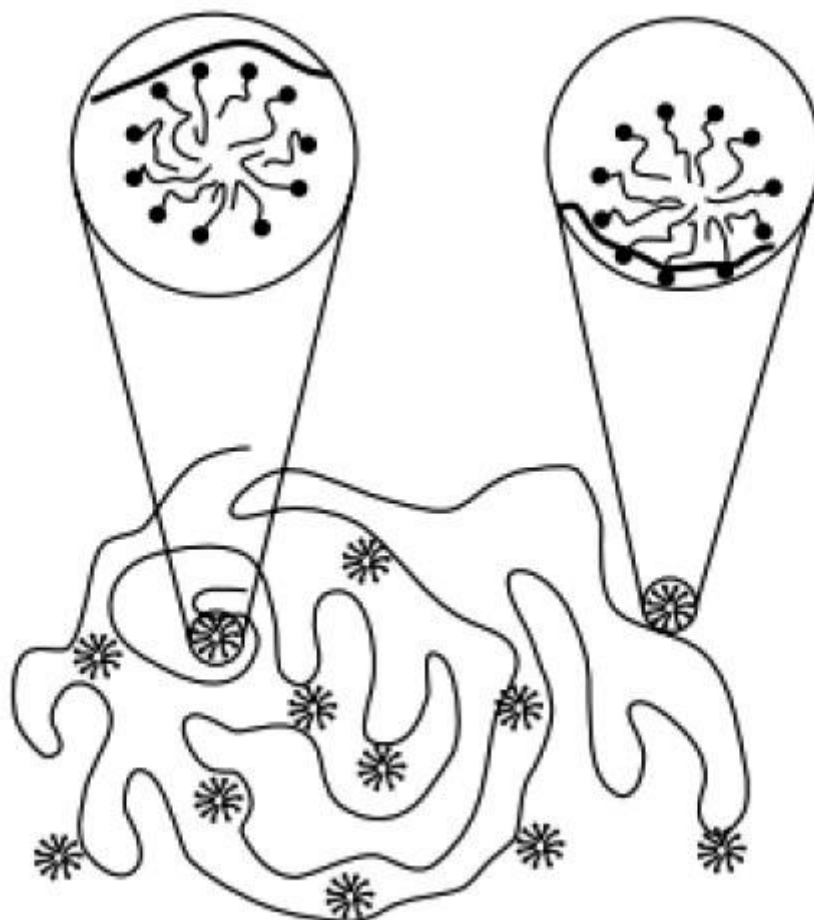
Obr. 12: struktura cetyltrimethylamonium *p*-toluensulfonátu

2.2.7 Interakce polymer-tenzid

Interakce polymerů s tenzidy mohou být více druhů a různě silné v závislosti na povaze látek. Vazba mezi neiontovým tenzidem a nenabítným polymerem je slabá nebo žádná, v případě interakce iontových tenzidů s neiontovým polymerem reagují ochotněji aniontové tenzidy [53]. U polymerů obsahujících hydrofobní část molekul budou převládat hydrofobní interakce s molekulami tenzidů. Nabítný polymer, tzv. polyelektrolyt, v roztoku disociuje a jeho disociované funkční skupiny jsou obklopeny ekvivalentním množstvím protiiontů. S opačně nabitými tenzidy zde budou převládat elektrostatické interakce, na které má vliv především chemické složení, lineární hustota a pozice náboje a dynamika kostry polymeru [25].

Vázání molekul tenzidu na řetězců polymeru nastává již při velmi nízké koncentraci, která se nazývá **kritická agregační koncentrace (CAC)** a je často i o několik řádů nižší než CMC tenzidu. Pokud by byla hodnota CAC vyšší než CMC, situace by naznačovala, že molekuly tenzidu preferují vlastní micelizaci nežli vznik komplexů s polymery. Navázané molekuly tenzidu tvoří na řetězci polymeru klastry nazývané „*minimicely*“ a celá tato charakteristická struktura se nazývá **struktura perlového náhrdelníku**, tzv. „*pearl necklace*“ (**obr. 13**), kde micely svým kulovým tvarem připomínají perly a řetězec polymeru je spojuje [25, 54].

Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu dochází v roztoku i k tvorbě volných micel a složitějších agregátů, po přesáhnutí určitého bodu navázání tenzidu na polymer přestanou být jejich komplexy dále rozpustné a dochází k fázové separaci za vzniku gelů. Tyto gely, vzniklé interakcí polyelektrolytů a opačně nabitých tenzidů, jsou dnes předmětem velkého zájmu hlavně v potravinářství a farmacii. Dosahují vyšší stability a povrchovou aktivitu, zároveň mohou micely v těchto komplexech sloužit jako nosiče pro nepolární látky, zejména cytostatika [55].



Obr. 13: Struktura perlového náhrdelníku – model interakce polymer-tenzid [25]

2.2.8 Interakce hyaluronanu s kationtovými tenzidy

Pro medicínské aplikace není dostačující pouze předpoklad úspěšné interakce. Použité látky musí být též biokompatibilní a biodegradabilní, netoxické stejně jako jejich degradační produkty. Jako vhodný kandidát se zde jeví hyaluronan, který se přirozeně nachází v těle všech obratlovců a tudíž splňuje výše zmíněné podmínky. Mnoho výzkumů směřuje právě k prozkoumání interakcí mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy (viz kapitola 3).

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

Dvoufázová oblast, která vystupuje z rohu vody, má kapkovitý tvar a je silně nakloněna k rohu tenzidu. Vzorky nacházející se v této oblasti podléhají fázové separaci. Její příčinou je

redukce náboje mezi hyaluronanem a tenzidem, čímž se sníží hydrofilicita i repulze v rámci polymeru. Při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu a různých tenzidů má kapkovitá dvoufázová oblast mírně odlišný tvar.

Vzniklé gely obsahují hydrofobní oblasti, jelikož koncentrace tenzidu v gelu přesahuje CMC. Samovolná difúze vody v gelech je omezená kvůli poměrně velkému množství již navázané hydratační vody. Gely je možné znovu rozpustit přidáním velkého nadbytku tenzidu či zvýšením iontové síly roztoku. Přídavek nízkomolekulárního elektrolytu totiž odstiňuje elektrostatické interakce mezi nabitými skupinami hyaluronanu a polárními hlavami tenzidů, čímž se podporuje vznik volných micel. Koncentrace elektrolytu potřebná pro zabránění vzniku fázové separace se nazývá **kritická koncentrace elektrolytu (CEC)** a pro hyaluronan roste s jeho zvyšující se molekulovou hmotností. Pravděpodobně kvůli hydrofobním interakcím však nelze tyto interakce v případě hyaluronanu s tenzidy zcela potlačit [56, 57, 58, 59].

2.3 Gely

Jako makromolekulární gely se označují koloidní disperzní soustavy, kde pevné částice disperzního podílu tvoří trojrozměrnou síť, která je prostoupená spojitou fází disperzního prostředí. V důsledku uspořádání částic právě do této trojrozměrné sítě mají gely charakter tuhé látky i přesto, že disperzní prostředí, které gel obsahuje, je kapalné. Takové gely (s kapalným disperzním prostředím) se obecně nazývají *lyogely*. Dle charakteru disperzního prostředí dělíme gely na **hydrogely** (rozpouštědlem je voda) a **organogely** (rozpouštědlem je organická látka). Jestliže rozpouštědlo odstraníme, např. vysušením, vzniká tak *xerogel*. Jeho objem je zmenšený o objem odstraněného rozpouštědla. U gelů vzniklých z lyofilních koloidů je možnost opětovného vzniku lyogelu ze xerogelu, a to přidáním rozpouštědla. Takové gely se nazývají **reverzibilní**. Gely vzniklé z lyofobních koloidů tuto schopnost nemají a nazývají se **ireverzibilní**. Proces přechodu xerogelu v lyogel se nazývá **botnání** gelu (viz kapitola 2.3.2), které může být **omezené** (do vzniku gelu) nebo **neomezené**, kdy xerogel přijímá nadbytek rozpouštědla až do vzniku koloidního roztoku [24, 60].

2.3.1 Vznik

Ke vzniku gelu je, v procesu zvaném gelace, nutno vytvoření dostatečného množství spojení mezi lineárními řetězci polymeru v roztoku. Tyto spoje se nazývají styčné body neboli *uzly*. Podle povahy sil, které drží síť gelu v těchto uzlech pohromadě, můžeme dělit gely na **fyzikálně** nebo **chemicky síťované**. U fyzikálních gelů převládají v uzlových oblastech van der Waalsovy síly, bipolární síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce, příp. zde může dojít také k vzájemnému zauzlení řetězců. Chemické gely jsou zesíťovány pomocí kovalentních vazeb. Jedním ze způsobů vzniku gelů je také botnání, podrobněji popsané v následující kapitole [24, 61].

Proces gelace ovlivňuje zejména teplota, koncentrace, pH či mechanické působení. Zvyšující se teplota obvykle zabráňuje vzniku gelů z důvodu většího tepelného pohybu molekul a tudíž kratšího trvání vazeb mezi segmenty. Se vzrůstající koncentrací však roste počet srážek molekul, čímž se zvětšuje i počet vzniklých vazeb v objemu gelu. V případě amfoterních polyelektrolytů probíhá gelace nejlépe v hodnotě pH, která je rovna izoelektrickému bodu [23, 24, 61].

2.3.2 Vlastnosti

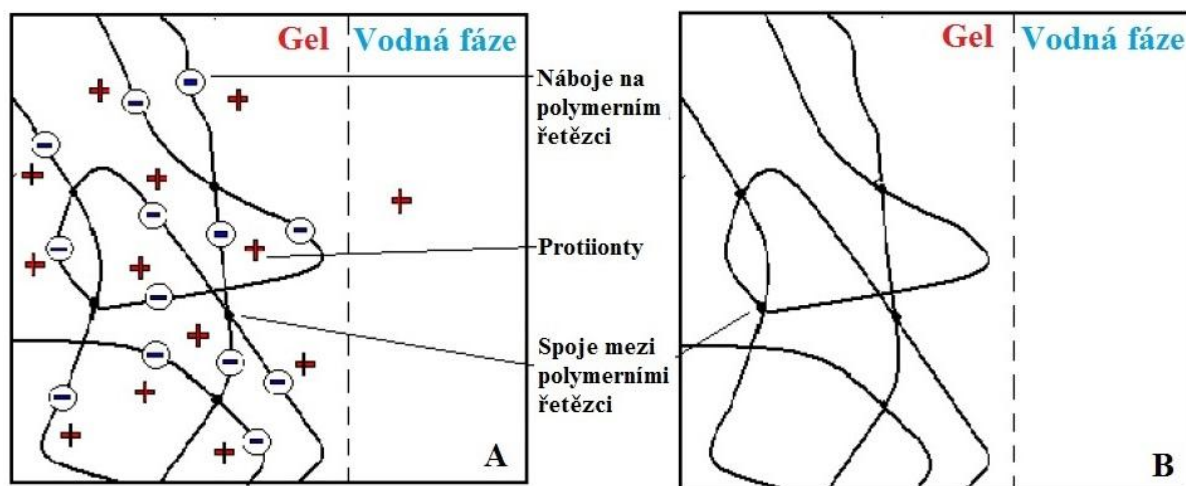
Gely se vyznačují svou charakteristickou elasticitou. V důsledku svého uspořádání se i přes majoritní podíl kapalného disperzního prostředí chovají jako látky v tuhém stavu a odolávají vystavené deformaci až do určité kritické hodnoty. Do té doby se deformují vratně. Hodnota kritického napětí závisí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

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

V případě aplikací hydrogelů je botnání jednou z jejich nejdůležitějších vlastností. Charakterizuje se měřením kapacity absorpce vody nebo vodného roztoku. Zjištění hmotnosti nabotnaného hydrogelu je nejjednodušší cesta k získání botnací kinetiky a rovnováhy. Rozsah botnání (R_S), nejčastěji používaný parametr k vyjádření botnací kapacity hydrogelů, je definován jako:

$$R_S = (W_S - W_D) / W_D, \quad (2)$$

kde W_S a W_D jsou hmotnosti nabotnaného a vysušeného hydrogelu. Botnací síla je kompenzována retrakční silou vyvolanou uzly sítě. Když se tyto dvě síly vyrovnají, botnání hydrogelu se dostane do rovnovážného stavu [62, 63].



Obr. 14: A) Botnutí gelu vysokomolekulárního elektrolytu, B) nedisociovaný gel se stejnou strukturou v čisté vodě [24]

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

2.3.3 Hydrogely

Stejně jako u definice gelů, tak i v případě hydrogelů se jedná o trojrozměrné sítě polymerních řetězců. Hydrogely se však vyznačují značnou absorpcí vody, aniž by se rozpouštěly. Schopnost vázat vodu je dána hydrofilní povahou funkčních skupin vázaných na řetězci, mezi které mohou patřit hydroxylové ($-\text{OH}$), karboxylové ($-\text{COOH}$), amidické ($-\text{CONH}$) nebo sulfonické ($-\text{SO}_3\text{H}$) skupiny. Tyto polární skupiny jsou hydratovány jako první, a to přes vodíkové můstky či iontové interakce. Tím je absorbována tzv. primárně vázaná voda. V důsledku hydratace polárních skupin se prostorová síť hydrogelu zvětšuje, čímž se odkrývají hydrofobní skupiny, které také interagují s vodou a dochází tak k navázání sekundární vody. Primárně a sekundárně vázaná voda se souhrnně označuje jako celkově vázaná voda. Prázdný mezisíťový prostor vyplňuje ještě tzv. volně vázaná voda, která je dovnitř hydrogelu vháněna osmotickou silou.

Hydrogel má vlastnosti jak kapaliny, tak pevné látky, jeho objem je významně závislý na teplotě, pH či kvalitě rozpouštědla [64].

Hydrogely lze vyrobit z přírodních i syntetických polymerů, a to chemicky či fyzikálně. Chemické hydrogely vykazují pevnější vazby a označují se jako permanentní hydrogely, nicméně jejich příprava často vyžaduje přítomnost toxických látek, a proto nejsou vhodné pro medicínské použití. Fyzikální gely jsou pro tuto aplikaci vhodnější. Jedním ze způsobu jejich přípravy je elektrostatická interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, kdy vznikají tzv. **PEC hydrogely** (z angl. „*Polyelectrolyte complex hydrogels*“). Takto připravené hydrogely jsou i předmětem této práce, kde je jako modelový polymer vybrán hyaluronan, který je stále více

oblíbený na poli terapeutického využití právě díky své přirozené biokompatibilitě a biodegradabilitě. Jeho unikátní citlivost na nádorové receptory je také jedním z předpokladů pro úspěšné použití těchto systémů v cílené distribuci léčiv. Asociací hyaluronového řetězce s micelami tenzidu vzniká charakteristická struktura *perlového náhrdelníku* (viz kapitola 2.2.7). Micely jsou schopny solubilizovat nepolární látky do svého jádra, zatímco hyaluronová síť poskytuje vnější ochranu a zabezpečuje cílení právě díky již zmíněné interakci s buněčnými receptory [25, 65, 66].

2.3.4 Využití

Gely nacházejí své nezastupitelné využití v mnoha odvětvích průmyslu jako např. při výrobě vláken, lepidel, kontaktních čoček nebo při zpracování kůží. Používají se též jako zahušťovadla v potravinářství. V kosmetice jsou gelové přípravky oblíbené pro svoji dobrou roztíratelnost na kůži. Při kontaktu s pokožkou se velmi dobře vstřebávají, odpařování vody navíc ochlazuje povrch a působí protizánětlivě. Nejvyšší potenciál však v současné době mají na poli tkáňového inženýrství, hojení ran či cílené distribuce léčiv. Degradční vlastnosti, a tedy jejich schopnost cíleně uvolňovat léčiva, jsou velmi dobře modulovatelné. Příkladem mohou být hydrogely citlivé na odpovídající fyzikální podněty jako např. teplota, pH, či světlo [67, 68, 69]. Podrobnější využití hydrogelů v této problematice je popsáno v kapitole 3.

2.4 Reologie

Reologie jako vědní obor založili roku 1929 chemik Eugene Cook Bingham a stavební inženýr Markus Reiner. Název je odvozen z řeckých slov *rhein* a *logos*. První uvedené znamená „tok“ nebo „řeka“, druhé „nauka“ nebo „věda“, z čehož vyplývá, že reologie se zabývá studiem toku a deformace. Konkrétně zkoumá vztahy mezi silou, napětím, deformací a rychlostí deformace u různých druhů látek. Ač se jedná o poměrně mladý obor, právě reologie vyplnila potřebu charakterizace tokového chování látek v technologických procesech materiálového inženýrství, jelikož většina reálných látek nevykazuje ideální reologické chování, které popisuje Hookův a Newtonův zákon [23, 70].

2.4.1 Hookův zákon

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

$$\sigma = G_E \cdot \frac{\Delta l}{l} = G_E \cdot \varepsilon, \quad (3)$$

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

Při větší míře deformace můžeme u reálných tuhých těles pozorovat druhý typ odezvy. Ten se po odnětí působící síly projeví tzv. nevratnou, neboli **trvalou** deformací [71, 72].

2.4.2 Newtonův zákon

Newtonův zákon popisuje, obdobně jako Hookův, vztahy pro deformace, zde pro případ ideálně viskózních tekutin. Jedná se zejména o plyny a nízkomolekulární kapaliny, které

veškerou vloženou energii disipují na teplo. Nedochází tedy k žádnému zpětnému využití vložené mechanické energie při odlehčení vzorku. Newtonův zákon pro takové ideálně viskózní látky, nazývané také jako **newtonovské**, je dán vztahem:

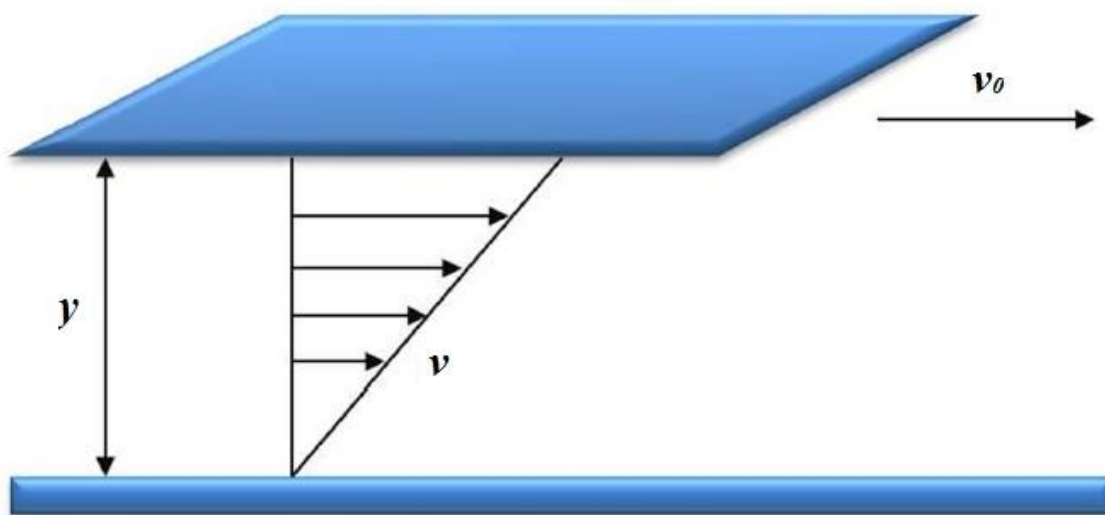
$$\sigma_{xy} = \eta \cdot \gamma_{xy}, \quad (4)$$

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

Pro případ proudění kapaliny mezi dvěma deskami, z nichž spodní je stacionární a horní pohyblivá, je smykové napětí σ definováno Newtonovým zákonem:

$$\sigma = \frac{F}{A}, \quad (5)$$

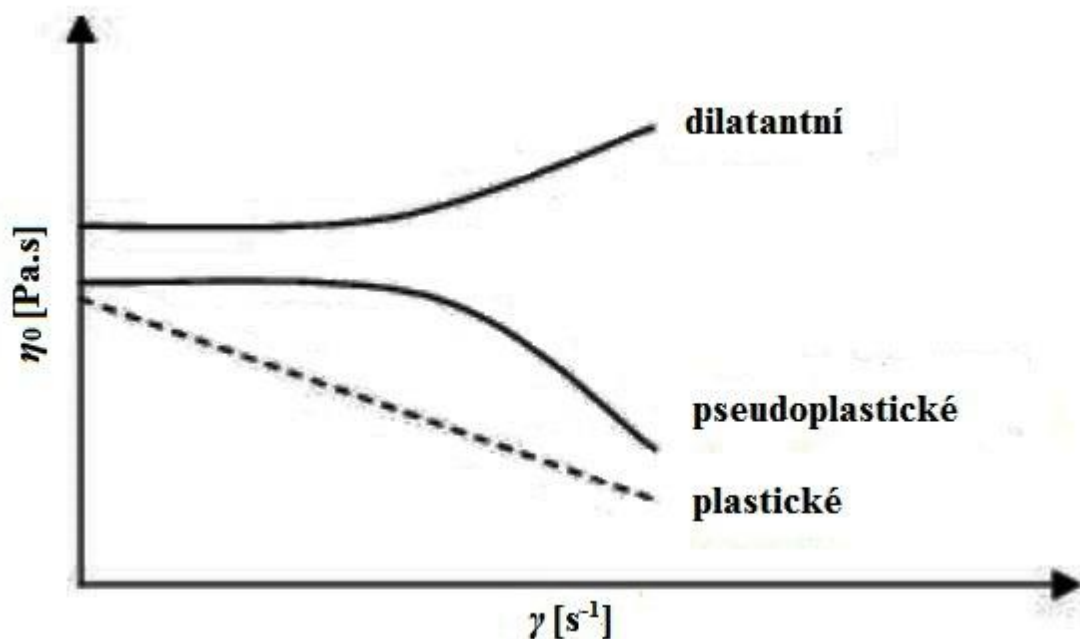
kde F udává smykovou sílu, která vyvolává pohyb horní desky o ploše A .



Obr. 15: Rychlostní profil toku v kapalině mezi nepohyblivou (spodní) a pohybující se (horní) deskou [73]

Látky, které se neřídí tímto zákonem, se nazývají jako **neneutronovské**. Jejich viskozita není materiálovou konstantou, ale je závislá na velikosti tečného napětí nebo rychlosti deformace a označuje se proto pojmem zdánlivá viskozita η_0 .

Mezi neneutronovské látky se řadí zejména roztoky či taveniny polymerů, suspenze, pasty apod. Se změnou tečného napětí nebo rychlosti deformace může tedy zdánlivá viskozita růst, popř. klesat, kdy takové chování označujeme jako *pseudoplastické* a *dilatantní* [71, 74].



Obr. 16: Závislost zdánlivé viskozity na rychlostním gradientu pro různé typy nenewtonských látek

2.4.3 Viskoelasticita

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

Materiálové vlastnosti viskoelastických látek se zpravidla popisují dvěma typy modulů. V prvním případě je to **elastický modul** pro pevné látky, standardně označovaný jako G' , který vyjadřuje energii uloženou v materiálu během napětového cyklu a tvoří reálnou část komplexního smykového modulu G^* . **Viskozitní modul** pro kapaliny, označovaný G'' , sděluje ztrátu energie během napětového cyklu. Jedná se o imaginární složku komplexního smykového modulu G^* . **Komplexní smykový modul** zahrnující obě složky a vyjadřující reologické chování reálných viskoelastických látek lze matematicky vyjádřit jako komplexní číslo:

$$G^* = G' + iG'' \quad (6)$$

K určení přesné hranice v chování mezi pevnou a kapalnou fází slouží tzv. **bod překřížení** (z angl. „*crosspoint*“) elastického a ztrátového modulu. Do dosažení dané hodnoty deformace převažuje právě jeden z modulů a udává tak charakter chování zkoumané látky [75].

2.4.4 Oscilační testy

Pro zkoumání viskoelastických látek včetně hydrogelů jsou vhodné oscilační testy. Základní princip spočívá v rovnoměrném uložení vzorku mezi dvě části měřicí aparatury (např. dvě desky), přičemž spodní je stacionární a horní osciluje. Podmínkou je, aby se vzorek deformoval homogenně v celém smykovém rozsahu a aby přilnul k oběma deskám bez jakýchkoliv protiskluzových účinků. Existuje několik druhů nastavení experimentu, v této

práci byly použity amplitudové testy s konstantní frekvencí oscilace a frekvenční testy s konstantní amplitudou deformace.

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

$$\operatorname{tg}(\delta) = \frac{G''}{G'}, \quad (7)$$

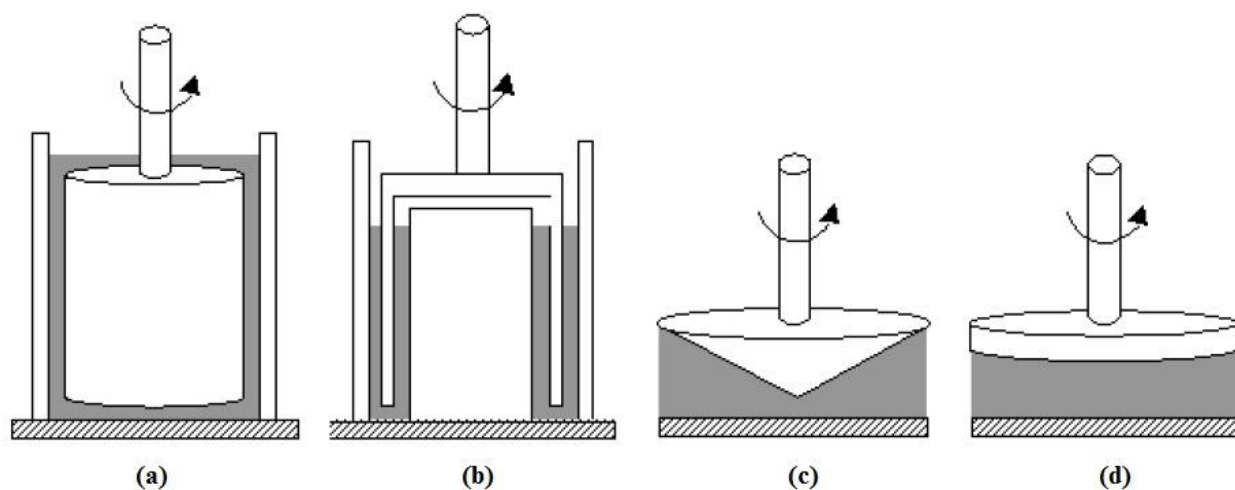
z jehož velikosti se dá usuzovat charakter chování zkoumaného vzorku. V případě, že $\delta > 45^\circ$ (tedy $\operatorname{tg}(\delta) > 1$), vzorek vykazuje viskózní chování a naopak, pokud je $\delta < 45^\circ$ (tedy $\operatorname{tg}(\delta) < 1$), tak se vzorek chová elasticky [76, 77].

2.4.5 Tokové testy

Tokové křivky vyjadřují závislost viskozity na smykové rychlosti. Výsledný tvar pak charakterizuje reologické chování materiálu. Systémy s hodnotou viskozity nezávislou na aplikované smykové rychlosti se nazývají jako *newtonovské* (viz kapitola 2.4.2). Rozdíly mezi ostatními typy látek, označovaných jako *pseudoplastické* a *dilatantní*, jsou přehledně prezentovány na **obr. 16**. Z hlediska medicínských aplikací je vhodné aplikovat právě tyto typy testů pro farmaceutické a kosmetické přípravky, jakožto příklad pseudoplastické, rychle vstřebatelné látky (čím rychleji roztíráme, tím lépe se vstřebává z důvodu poklesu viskozity). Opačný případ platí např. pro zubní pasty, které si i po roztírání musí zachovat svůj vysoce viskózní charakter [71, 78].

2.4.6 Měřicí systémy

Rotační reometry jsou složeny ze dvou základních částí, kdy jedna je statická – stator a druhá rotuje nastavenou úhlovou rychlostí – rotor. Pro měření různě viskózních vzorků lze použít několika typů geometrie popsanych na **obr. 17**. Ke stanovení reologických vlastností gelových vzorků je nejvhodnější typ deska-deska (*parallel plates*). Výhoda spočívá v malé spotřebě vzorku a jednoduchém čištění aparatury. Avšak při měření tokových křivek může vzorek ve vysokých smykových rychlostech z aparatury vylétávat. Speciální případ geometrie pro tekutější roztoky je dvojice koaxiálních válců (*double gap concentric cylinders*). Oba válce jsou duté a zasouvají se do sebe, přičemž jeden je opět stacionární a druhý, oscilující, namáhá vzorek. Nevýhodou je však větší spotřeba vzorku oproti aparatuře deska-deska a složitější čištění, kdy musí být celá aparatura rozebrána. Viskóznější vzorky, jako např. hydrogely, nelze pohodlně nadávkovat do tohoto typu aparatury, proto je pro ně vhodnější uspořádání deska-deska [79].



Obr. 17: Geometrie rotačního reometru: (a) válec-válec, (b) double-gap, (c) kužel-deska, (d) deska-deska [79]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Cílem mnoha vědeckých týmů po celém světě je udělat průlom v oblasti léčby nádorových onemocnění, a to pomocí cílené distribuce léčiv, kdy je toto léčivo dopraveno do postižené tkáně speciálním nosičem, který zabrání jeho nežádoucímu působení ve zdravé tkáni. Výběr nosiče není věc jednoduchá, musí se jednat o látku biokompatibilní a biodegradabilní, schopnou pevně vázat léčivo, aby nedošlo k jeho samovolnému uvolnění do krevního oběhu, zároveň umožnit léčivu specificky působit v požadovaném místě. Dalším důležitým požadavkem na nosič je netoxicitata látek vzniklých jeho degradací [80].

Byla vyvinuta celá řada nosičů, založených na liposomech, dendrimerech [81] nebo polymerních micelách [42, 82].

Výsledky studií testování různých biopolymerů pro použití v cílené distribuci léčiv byly diskutovány jinde [83, 84, 85, 86, 87]. Testy se většinou zaměřovaly na charakteristiku daných biopolymerů, ať už nativních či hydrofobně modifikovaných, konkrétně se zkoumala bioaktivita, biodegradabilita a vlastnosti jejich micel. Na stanovení vlastností micel byly použity klasické techniky fluorescenční sondy, dynamického rozptylu světla (DLS), infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), rentgenové difrakce, nukleární magnetické rezonance (NMR) nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Sledovala se velikost a stabilita polymerních micel, byla stanovena kritická micelární koncentrace, jejich biokompatibilita, příp. interakce směsí micel různých biopolymerů.

3.1 Hyaluronan v cílené distribuci

Podle mnohých autorů se však jako nejvýznamnější zástupce na pozici potenciálních nosičů léčiv jeví hyaluronan. Jedná se o tělu vlastní polysacharid, takže je přirozeně biokompatibilní a biodegradabilní. Velmi důležitá je také jeho citlivost na receptor CD44, který se nachází u většiny savčích buněk, kde je zodpovědný za jejich proliferaci a migraci. Ve velké míře je však tento receptor exprimován na povrchu nádorových buněk. Tohoto faktu se využívá při aktivním cílení, kdy je hyaluronan specificky vychytáván právě nádorovou tkání [88, 89].

Avšak právě díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě je nativní hyaluronan pro medicínské aplikace a tkáňové inženýrství téměř nepoužitelný. Přistupuje se proto k jeho modifikacím, ať už se jedná o síťování, derivatizace hydrofobními funkčními skupinami či interakce s jinými látkami.

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

O rok později zkoumal tým **R. Censiho** [90] kombinaci polyethylenglykolu (PEG) s diakrylát/thiolovaným hyaluronanem. Jako síťovací prostředek zde byla opět použita fotopolymerizace. Cílem bylo prozkoumat uvolňování proteinů z takto upraveného hyaluronanu. Dle očekávání se kladně nabitě proteiny uvolňovaly rychleji než záporné, a to z důvodu záporného náboje na řetězcích hyaluronanu. Rychlost uvolňování také závisí na enzymu hyaluronidáze, která je přítomna v biologických tkáních.

V téže roce proběhl také pokus zapouzdřit do micelárních útvarů modifikovaného hyaluronanu cytostatikum Paclitaxel (PTX), jehož úspěšným nosičem se stal styryl-pyridinium-hyaluronan. Experimenty prováděli **Y. Tao a spol.** [91]. Užitím metody

fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) bylo dokázáno, že daný nosič je vychytáván mozgovými tumory, tudíž bude nadále používán v medicíně.

Úspěšná solubilizace PTX se povedla i **J. Liovi** [92] při použití micelárního roztoku hyaluronanu s deoxycholovou kyselinou jakožto nosiče. Polymerní micely tohoto systému byly vychytávány karcinomem prsu. Prokázalo se také, že dopravují hydrofobní cytostatika velmi rychle a receptory v tumoru podporují množení těchto micel.

Jak však naznačují předchozí studie, uvolňování aktivních látek z hyaluronového nosiče je silně závislé na aktivitě hyaluronidáz. Z tohoto faktu vyplývá zásadní problém cílené distribuce, a to neúmyslné uvolnění aktivní látky do krevního řečiště. Touto problematikou se v roce 2013 zabývali **H. Yoon a spol.** [93], kteří vyvinuli nanočástice kyseliny hyaluronové připravené fotozesíťováním akrylátových skupin. Takto zesíťovaný hyaluronan vykazoval větší stabilitu a také delší a postupnější uvolňování PTX v místě účinku. Autoři se shodují, že naměřená data poskytují slibné možnosti využití těchto derivátů pro medicínské aplikace.

3.2 Interakce hyaluronan-tenzid

Hojně prostudovaná je také myšlenka interakce tenzidu s hyaluronanem, kde, zjednodušeně řečeno, tenzid vytváří hydrofobní prostor pro rozpuštění nepolárního léčiva a polyelektrolyt, v tomto případě hyaluronan, poskytuje vnější ochranu a schopnost cílení k poškozené tkáni. Dané komplexy jsou také více stabilní, protože se v nich projevují nejen elektrostatické, ale také hydrofobní interakce.

Vzájemné působení hyaluronanu a tenzidu bylo cílem zájmu **T. Halasové a spol.** [94]. Jako vzorek byl použit hyaluronan o dvou molekulových hmotnostech smíchaný s dvěma zástupci kationtových tenzidů – CTAT nebo CTAB v roztoku NaCl. Výsledky ukázaly, že i když přítomnost NaCl může potlačit interakce mezi opačně nabitými polyelektrolyty a povrchově aktivními látkami, jsou tyto interakce stále přítomny v některých systémech hyaluronan-tenzid, bez ohledu na iontový charakter povrchu. Molekulová hmotnost hyaluronanu také nemá na posun CMC významný vliv. Fluorescenční data ale poukázala především na fakt, že tvorba agregátů (micel) se vyskytuje spíše v určitém intervalu, než v jednom konkrétním bodě koncentrace povrchově aktivní látky, a to zejména v přítomnosti hyaluronanu. Tento poznatek je zásadní v problematice cílené distribuce léčiv, kdy se právě snažíme zjistit, jestli, a při jaké koncentraci, je systém schopen vytvořit micely ochotné pojmout léčivo.

Sama **Halasová** [73] pak ve své dizertační práci zkoumá interakce CTAB a hyaluronanu. Testy proběhly v oblasti kolem CMC tenzidu, kdy se potvrdilo, že tento je schopen tvořit stabilní agregáty s hydrofobními doménami schopné pojmout nepolární látku a zodpovědné za interakci s řetězcí hyaluronanu. Testy byly provedeny pro různé koncentrace CTAB a různá prostředí. Při vyšších koncentracích tenzidu pak dochází ke vzniku gelové fáze, která je schopna pojmout všechnu nepolární látku. Reologické vlastnosti gelů jsou závislé na použitémolekulové hmotnosti hyaluronanu. Solubilizační testy potvrdily, že gel je schopen vytvořit se v přítomnosti téměř jakékoliv látky nezávisle na její hydrofilicitě či hydrofobicitě, jedinou výjimku tvořil minerální olej s vysokou viskozitou a hustotou nižší než voda.

Asi nejznámější je práce vědeckého týmu **K. Thalberga** [95] již z roku 1989, který zkoumal vzájemné interakce mezi hyaluronanem sodným a kationtovými tenzidy s různou délkou řetězce (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků). Bylo prokázáno, že ještě pod kritickou micelární koncentrací tenzidu dochází k jeho navázání na hyaluronan, ovšem toto platí jen u tenzidů, které obsahují 10 a více uhlíků v alkylovém řetězci. Po dalším přidávání tenzidu se agregáty stabilizují a dochází i k tvorbě volných micel. Vodivostní, solubilizační a NMR měření

prokázaly, že micely s navázaným hyaluronanem mají menší velikost než volné micely tenzidu. Byla také prokázána nezávislost molekulové hmotnosti polymeru (nad určitou minimální hodnotu) na interakci polymer-tenzid.

Interakce polymerů s aniontovými a neiontovými tenzidy prověřovali **D. Yin a spol.** [96], kteří také posoudili vliv přídavku dalších sacharidů.

3.3 Hyaluronové hydrogely v medicínských aplikacích

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

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

Studie italských vědců z roku 2000 se právě zabývá cílenou manipulací ve viskoelastických vlastnostech připravených gelů. Odlišné hydrogely stejného základu lze připravit z hyaluronanu, který je modifikován kvartérními amoniovými skupinami pocházejícími z diaminu (tzv. *linker*). Modifikace probíhá na karboxylových skupinách hyaluronanu, kdy výběrem různého linkeru lze cíleně měnit vlastnosti vzniklých hydrogelů. Tým **R. Barbucciho** [99] došel při zkoumání reologických vlastností těchto gelů k závěru, že všechny modifikované gely vykazovaly lepší viskoelastické vlastnosti než gely nemodifikované, přičemž elastický modul převyšoval ztrátový modul v celé škále měřených frekvencí, což naznačuje právě elastický charakter.

Také **P. Bulpip a spol.** [100] se zaměřili na zlepšení viskoelastických vlastností hyaluronových hydrogelů a zvýšení jejich odolnosti vůči degradaci. Na kostře hyaluronanu esterifikovali karboxylové skupiny, stejně tak jako substituovali nukleofilní skupiny na bočním řetězci. Výsledkem byl chemicky síťovaný hydrogel odolný vůči fragmentaci na jednoduché cukry. Pro slibné použití v hojení ran a tkáňovém inženýrství napovídaly výsledky inkorporace hyaluronanu do buněk, či nadměrné vázání růstových faktorů na jeho skelet.

Jak napovídá kapitola 3.1, použití micelárního roztoku hyaluronanu vykazuje nadějně výsledky pro cílenou distribuci léčiv. Stejná myšlenka napadla i **G. Bajaje** a jeho tým [101], kteří v roce 2012 zkoušeli zapouzdřit PTX do hyaluronového hydrogelu. Jako modelový vzorek byly použity myši s nádorem pobřišnice. Hyaluronový hydrogel dokázal udržet a postupně uvolňovat PTX v místě účinku až 14 dní. Použití klasické chemoterapie pomocí PTX dosahuje udržení tohoto léčiva v místě účinku řádově v minutách až hodinách. Ačkoliv hyaluronový hydrogel nezvyšuje terapeutický účinek PTX, jeho postupné a dlouhotrvající uvolňování je však tou správnou cestou ve výzkumu léčby nádorových onemocnění.

Metodu lyofilizace použili k vytvoření nanoporézních hydrogelů **Y. Minaberry a spol.** [102]. Do gelu jako aktivní látku inkorporovali gentamicin. Při testech se autoři zaměřili na zkoumání rozpustnosti a agregace gelů. Na závěr také potvrdili výhodu prodlouženého uvolňování aktivní látky z hydrogelu.

3.4 Vlastnosti tenzidu CTAT a problematika micel typu worm-like

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.6, chování a vlastnosti tenzidu CTAT se podstatně liší od jeho kolegů se stejným skeletem, ale jiným protiiontem, a to zejména jeho schopností samovolně tvořit tyčinkové či červovité micely (*worm-like* micely) již při nízkých koncentracích. Stanovení jeho tokových vlastností a charakterizování vnitřní struktury je proto zásadní v definování možností použití daného tenzidu na poli medicínských aplikací.

A. Pal a spol. [103] zkoumali strukturu vodného roztoku CTAT. Ten je schopen tvořit worm-like micely i bez přídavku jakékoliv soli. Popsaný jev je způsoben silným vázáním tosylátového protiiontu k micelle, kvůli jeho aromatické povaze ve srovnání s anorganickými protiionty, jako např. Br^- nebo Cl^- . Ke stanovení struktury použili autoři metodu polarizační optické mikroskopie a maloúhlového rozptylu rentgenového záření (*small-angle X-ray scattering* – SAXS). Zjistili, že roztok je ve stavu nematické fáze pro hmotnostní koncentrace tenzidu mezi 32 a 45 % hm., při vyšších koncentracích přechází do hexagonální fáze, která je tvořená dlouhými tyčinkovitými micelami, které jsou uspořádány do dvoudimenzionální sítě. Autoři konstatují, že výskyt nematické fáze přes tak širokou škálu koncentrací je nezvyklý v systémech tenzid-voda.

E. R. Macías [104] testoval v roce 2011 vliv iontové síly na reologické vlastnosti micelárního roztoku CTAT s přídavkem různých solí. Testy byly provedeny nad CMC při měnících se podmínkách (teplota, typ soli, koncentrace soli, iontová valence soli). Závěrem studie bylo, že micelární roztok je kineticky stálý nehlédě na typ použitého protiiontu soli. Vědci také zjistili, že vliv aniontu soli na viskoelastické vlastnosti polymeru sleduje Hofmeisterovy řady.

R. Bandyopadhyay a A. K. Sood [50] zkoumali vliv přídavku SiO_2 na reologické vlastnosti gelů na bázi CTAT. K polozředěnému gelu tvořenému červovitými micelami CTAT byly přidávány koloidní submikronové částice SiO_2 v různých hmotnostních podílech v řádu jednotek procent. Výrazné zvýšení viskozity a G_0 modulu (označovaný jako vysokofrekvenční modul plató, který vychází z komplexního dynamického modulu G^*) při přídavku nižších koncentrací SiO_2 bylo připisováno k silným interakcím mezi SiO_2 a zapletenými worm-like micelami tenzidu. Naopak při vyšších koncentracích SiO_2 docházelo ke snižování měřených hodnot, pravděpodobně v důsledku vzniku dvojvrstvy SiO_2 -tenzid. Výsledná studie však naznačuje možnost cíleného měnění viskoelastických vlastností hydrogelů na bázi CTAT přidáním přesného množství aditiv, jako např. zkoumaného SiO_2 . V článku autorů je také zmíněn fakt, že podobné interakce se vyskytují i u jiných tenzidů

stejného základu, jako např. u již zmíněného CTAB, kde se délka jeho micel výrazně zvýšila po přidavku opačně nabitých surfaktantů.

Vlivu iontové síly na viskoelastické vlastnosti worm-like micel CTAT se věnovali také **M. F. Torres a spol.** [105]. Reologické testy a měření dynamického rozptylu světla (DLS) ukázaly, že po přidavku soli nastává prudký nárůst velikost těchto micel, ale jen do určité hodnoty koncentrace soli, kdy se tato červovitá micela stává dostatečně dlouhá a ohebná na to, aby spíše kontrahovala do klubka. To naznačuje, že i s přidavkem soli jsou vlastnosti a tvar micel takové, že zabráňují vzniku nadmicelárních agregátů.

M. R. Rojas [51, 106, 107] provedl tři studie týkající se vzniku a vlastností worm-like micel. Nejprve zkoumal v roce 2008 vliv směsi opačně nabitých surfaktantů na vznik worm-like micel. Ke studii byla použita směs CTAT/SDS v molárním poměru 0,12. Měřením tokových vlastností se ukázalo, že CTAT je při koncentraci 20 mM silně citlivé i na malý přídavek dodecylsírany sodného (SDS), kdy po přidání jeho roztoku o koncentraci 2 mM se 3krát zvýšil relaxační čas překryvu reologických modulů a roztok se stal výrazně elastický. Autor také zmiňuje CMC CTAT jako hodnotu 0,26 mM a CRC při koncentraci roztoku 1,9 mM, kdy na červovité micely přechází roztok tenzidu v hodnotě CRC v ostrém přechodu, nikoliv pozvolném sledu. Tento fenomén byl zjištěn pomocí statického rozptylu světla (SLS). Worm-like micely mohou navíc růst, až dokud nedosáhnou koncentrace překryvu klubka. Tyto roztoky vykazují viskoelastické vlastnosti srovnatelné s vysokomolekulárními polymery. Délka worm-like micel je závislá na teplotě, iontové síle a přítomnosti dalších komponent v roztoku, jak bylo zkoumáno i předešlými autory. Tvorba těchto micel při nízkých koncentracích může být podpořena přidavkem hydrotropu (jedná se o silně se vázající protiiont nebo přídavek dalšího opačně nabitého surfaktantu). *P*-toluensulfonát jako protiiont vykazuje značné snížení CRC oproti např. bromidu v CTAB, u něhož dosahuje hodnota CRC nad 200 mM. Zapojení opačně nabitého surfaktantu do systému, příkladně SDS uváděný v této studii, může mít podobný efekt jako protiionty, které stabilizují náboj na povrchu micely, a ta může dále růst. Důvod, že *p*-toluensulfonátový aniont snižuje oproti bromidovému tak významně CRC je hydrofobicita jeho fenylové skupiny, která umožňuje co-micelizaci se surfaktantem a tvorbu delších worm-like micel.

O 2 roky později zkoumal stejný tým vědcův daném systému CTAT/SDS navíc vliv přídavku jednoduchých solí.

Svou trilogii zakončil **M. R. Rojas a spol.** v roce 2009 kombinací CTAT s dendrony. Výsledky ukázaly hydrofobní interakce mezi danými typy látek, kdy směs CTAT/dendron byla více elastická než samotný roztok CTAT.

Stejně výsledky jako předchozí studie, a to zvýšení elasticity roztoku z důvodů zvýšení koncentrace worm-like micel, dokázal v roce 2011 tým **J. C. Cuggina** [108], kteří kombinovali 20 mM CTAT s jejich nově syntetizovanými dendronizovanými polymery na bázi amino Behera akrylátů, které si charakterizovali pomocí DLS, NMR, gelové permeační chromatografie (GPC) a FT-IR. Po přidavku pouze 0,25 ppm polymeru k roztoku CTAT vzrostla jeho elasticita 2krát.

Také již v roce 1996 zkoumali **J. Narayanan a spol.** [109] vliv přídavku soli na velikost a růst micel CTAT. Použili, v té době, poměrně moderní, fluorescenční techniku FRAPP (*fluorescence recovery after fringe pattern photobleaching*), která počítá difúzní koeficienty micel pomocí zhášení fluorescence sondy, která je osvětlena pulzním paprskem laseru. Autoři popisují již několikrát výše diskutovaný fakt, že kationtové surfaktanty, jako např. CTAB, jsou schopny po přidavku soli (např. salicylátu) tvořit tyčinkovité micely, a tím přecházet

z roztoku na viskoelastické gely. Vhodným výběrem aniontu a koncentrace jsme schopni vytvořit gely požadovaných vlastností. V případě hydrofobního aniontu *p*-toluensulfonátu u tenzidu CTAT potvrzují také autoři jeho nižší CMC a téměř okamžitý vznik tyčinkových micel při přidavku soli jak 0,1 mM, tak 1 mM KBr. V nepřítomnosti soli rostou micely jen velmi pomalu od koncentrace 0,06–0,7 % hm., kdy dosáhnou koncentrace překryvu micel.

R. Abdel-Rahem [48] zkoumal vliv hydrofilních a hydrofobních protiiontů tenzidů na morfologii micel. Autor poukazuje, že hydrofobní protiionty určitých tenzidů mohou způsobit růst jejich micel a změnu morfologie či geometrie. Této změny lze též dosáhnout použitím hydrofilních protiiontů, ale je požadována vyšší koncentrace surfaktantu. Při testech vlivu hydrofobních protiiontů kationtových tenzidů byly porovnání tři zástupci, a to CTAT, CTAB a CTAC. Nejnižší CMC vykazovalo CTAT díky nejsilněji vázané *p*-toluensulfonátové skupině. Z výsledků měření volné Gibbsovy energie micelizace a agregačního čísla také vyplývá největší tendence CTAT k samovolnému růstu micel a vůbec k micelizaci. Pomocí DLS byl zkoumán vliv přidavku soli NaCl k CTAT. Jak bylo potvrzeno i předešlými studiemi, po přidavku NaCl došlo k rapidnímu růstu micel. Autoři konstatují, že přechod sférických na worm-like micely lze dosáhnout i jinak než zvýšením koncentrace. U vzorku CTAB byla metodou elektronové mikroskopie se zmražením vzorku (cryo-TEM) pozorována koexistence sférických a worm-like micel po přidavku kyseliny methylsalicylové a hydroxybenzoové do jeho roztoku. Roztok vykazoval lepší viskoelastické vlastnosti díky přítomnosti worm-like micel. Ty vznikly v důsledku zmenšení efektivní plochy hydrofilních hlav při reakci s karboxylovou skupinou kyseliny, přičemž se zároveň zvýšila efektivní plocha uhlovodíkového řetězce při penetraci fenylové skupiny z kyseliny. Toto má za následek správné uspořádání micel a vede k jejich růstu. Na závěr tedy autoři shrnují fakta, že růst micel iontových tenzidů je silně závislý na hydrofobicitě protiiontu z důvodu jejich silného vázání na hydrofilní hlavu. Také povrchová aktivita těchto protiiontů hraje významnou roli v micelárním růstu. Ve vazbě hydrofobních protiiontů na molekulu surfaktantu se zapojují jak hydrofobní interakce, tak elektrostatické interakce. Stejně tak, obsahuje-li protiiont i krátký alkylový řetězec, je i tento zahrnut do interakcí s micelou.

Na počest 60. narozenin izraelského profesora Nissima Gartiho, který působí na univerzitě v Jeruzalémě, předložil vedoucí jeho vědecké skupiny **S. Ezrahi** [110] rozsáhlé review zabývající se vlastnostmi a hlavním použitím worm-like micel. Práce z roku 2006 zmiňuje především vliv délky řetězce na reologické a viskoelastické vlastnosti a dále pak použití tenzidů tvořících daný typ micel při těžbě ropy, v nanobiotechnologiích nebo jako chytré gely pro medicínské aplikace.

Podrobný popis přeměny sférických na worm-like micely u CTAB popsali již v r. 1994 vědci z univerzity v Minnesotě **Z. Lin a spol.** [111]. Přídavek methylsalicylové a benzoové kyseliny k 20 mM roztoku CTAB způsobí přechod jeho sférických micel na micely typu worm-like. Pro pozorování použili metody cryo-TEM, reologii a maloúhlový rozptyl neutronů (SANS). Z měření vyplynulo, že přechod ve tvaru micel probíhá v širším koncentračním řádu kyseliny methylsalicylové a oba typy micel koexistují spolu. Výsledky také naznačují, že průchod benzenového jádra do micely hraje důležitou roli v průběhu tohoto přechodu. Na sérii experimentů byly použity 3-, 4- a 5-methylsalicylové kyseliny, u nichž přechod probíhal stejně. Methylová skupina je hydrofobní a nebrání benzenovému jádru v průchodu do vnitřní hydrofobní domény tenzidu. Naopak z testovaných 2-, 3-, 4-hydroxybenzoových kyselin byla nejefektivnější k přechodu právě 2-hydroxybenzoová kyselina, právě proto, že při pohybu

hydroxy skupiny po benzenovém kruhu, stíní tato hydroxy skupina hydrofobní část benzenu a snižuje jeho efektivitu.

Závislost velikosti micel z předchozí studie na teplotě a koncentraci zkoumal tým **N. Ch. Dase** [112], který použil roztok CTAB/NaSal (tenzid/salicylát sodný v poměru 0,6) a metodu SANS. Výsledky ukázaly, že s rostoucí teplotou se worm-like micely daného systému zmenšují, se zvyšující se koncentrací složek naopak prodlužují.

Studie **E. Feitose a spol.** [113] dokazuje, že i CTAS (s protiiontem $(\text{SO}_4)^{2-}$) je schopno po překročení určité koncentrace přidané soli (Na_2SO_4) přecházet z jednoduchých kulových micel na micely typu worm-like. Autoři vzorek podrobili detailnímu testování pomocí DLS, stacionární fluorescence, fluorescence s časově rozlišeným zhašením (*time resolved fluorescence quenching* – TRFQ), tenziometrie, vodivostních testů a izotermální titrační kalorimetrie (ITC). Přeměna micel probíhala při přidavku soli vyšším než 0,3 mM.

D. Li a spol. [114] použili metodu stacionární fluorescence s pyrenem jako sondou ke stanovení dvou kritických micelárních koncentrací CTAC. Jako rozpouštědlo použili ekvimolární množství vody a ethanolu. CMC_1 byla stanovena na 0,125 M, zatímco CMC_2 , při které roztok přechází ze sférických na tyčinkovité micely, byla stanovena na 0,21 M. I zde tedy byl dokázán fakt změny morfologie tvaru micel tenzidu v závislosti na jeho koncentraci.

Trojice vědcůve složení **M. Almgren, J.-E. Löfroth a R. Rydholm** [115] dokázala pomocí metody fluorescenční sondy koexistenci globulárních a tyčinkových micel v roztoku směsi CTAB/CTAC. Fluorescenční křivka vykazovala dvojí zlom. První zlom reprezentuje kratší dobu života, která popisuje pyren rozpuštěný v tyčinkových micelách, zatímco druhý, s dlouhou dobou života, zastává pyren rozpuštěný ve sférických micelách.

4 CÍLE PRÁCE

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium vlastností fázově separovaných hydrogelů na bázi hyaluronan-tenzid, které vznikají elektrostatickou interakcí mezi těmito opačně nabitými látkami. Hyaluronan byl vybrán jakožto zástupce biokompatibilního, záporně nabitého polymeru. CTAT představuje modelový vzorek tenzidu, který, jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, není tak hojně využíván na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně. Původní myšlenka tedy byla sestavit hlubokou rešerši na téma vlastností tohoto tenzidu a analytických metod používaných k jeho charakterizaci. Z ní pak vyplývá, že pro základní zhodnocení vlastností se klasicky používá metoda reologie, která se v této práci řadí mezi stěžejní. Pro lepší prezentaci a pochopení výsledků a zhodnocení faktu, zdali má jiný protioton a rozdílný tvar micel tenzidu CTAT nějaký vliv na interakci s hyaluronanem, gelaci a viskoelastické vlastnosti těchto gelů, byly souběžně všechny testy prováděny také pro tenzidy CTAB a CTAC, jejichž výsledky byly následně porovnány.

I přes mnoho předpokladů v chování tenzidu CTAT, které vyplývají z rešeršní části, pro nás byla práce s tímto vzorkem novým polem působnosti. Proto je v experimentální části zahrnuta také kapitola obsahující senzorickou analýzu autorem práce popisující chování gelů při jejich výrobě a měření nebo vhodnost použití té či oné metody přípravy. Právě porovnání, jestli používané čtyři metody přípravy dají ve výsledku stejný gel, je klíčovou částí výsledků reologického měření. Důraz je kladen hlavně na srovnání paralel suchá a mokrá cesta, resp. stání či odstředění vzorků. Podrobněji je o této problematice popsáno v následující kapitole.

Prvotní pokusy o použitelnosti metody malouhlového rozptylu rentgenové záření pro hlubší charakterizaci vnitřní struktury gelů jsou prezentovány v úplném závěru předložené práce. Snahou těchto měření bylo porovnat velikosti částic výchozích látek a z nich vzniklých hydrogelů pro lepší pochopení jejich interakce.

Ze souhrnných výsledků diplomové práce si tato klade za cíl zhodnotit a diskutovat stejné či rozdílné chování připravených hydrogelů při použití tenzidu s odlišnou vnitřní strukturou než mají ty hojně užívané. Zejména z tokových měření jsou pak také vyvozeny závěry o aplikačním potenciálu těchto vzorků na poli medicínských aplikací.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiály

Hyaluronan	LMW Hya (hyaluronan o molekulové hmotnosti 250–450 kDa), $M_w = 340$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 230215-E1
	HMW Hya (hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 400–1 600 kDa), $M_w = 1\,540$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 181214-4-D1
CTAB	CAS: 57-09-0, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže 120152
CTAC	CAS: 112-02-7, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže 1436113V
CTAT	CAS: 138-32-9, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže 026K1508
Olejová červeň	CAS: 1320-06-5, Sigma-Aldrich s.r.o., šarže 018K0669
Chlorid sodný	CAS: 7647-14-5, Lach-ner s.r.o., šarže PP/2009/06278
Voda	Deionizovaná voda Miliphore; Purelab: ELGA

5.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků fázově separovaných hydrogelů

5.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl

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

5.2.2 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Přesná navážka hyaluronanu byla smíchána s přibližně $\frac{3}{4}$ požadovaného objemu 0,15 M NaCl. Po úplném rozpuštění na magnetické míchačce (cca 8–12 hod.) byl přesný objem upraven pomocí odměrných baněk na požadovaný výsledný objem a roztok byl opět ponechán na magnetické míchačce po dobu nejméně 12 hodin.

Pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 2 % hm. a 0,5 % hm. Roztoky byly uchovány v lednici při 4 °C.

5.2.3 Příprava zásobního roztoku tenzidu

Pro všechny tři použité tenzidy (CTAB, CTAC, CTAT) byl použit obdobný postup přípravy zásobních roztoků. Přesná navážka tenzidu byla smíchána s potřebným množstvím 0,15 M NaCl a roztok byl uložen na magnetickou míchačku na 24 hodin.

V případě tenzidů CTAB a CTAC byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 200 mM a 50 mM. Vzorek CTAT byl navíc rozšířen zásobními roztoky o koncentraci 75, 100 a 150 mM. Roztoky byly dále uchovány při laboratorní teplotě.

5.2.4 Příprava fázově separovaných hydrogelů

Pro obě použité molekulové hmotnosti hyaluronanu byla, smícháním zásobních roztoků Hya a tenzidů, připravena čtveřice gelů dle následujícího schématu, a to s každým ze třech použitých tenzidů.

2 % Hya + 200 mM tenzid
2 % Hya + 50 mM tenzid
0,5 % Hya + 200 mM tenzid
0,5 % Hya + 50 mM tenzid

V případě CTAT byly navíc připraveny gely o výchozí koncentraci tenzidu 75, 100 a 150 mM, a to pro obě molekulové hmotnosti i koncentraci Hya. Přehled těchto doplňkových gelů mimo základní čtveřici je uveden níže.

2 % Hya + 75 mM CTAT
2 % Hya + 100 mM CTAT
2 % Hya + 150 mM CTAT
0,5 % Hya + 75 mM CTAT
0,5 % Hya + 100 mM CTAT
0,5 % Hya + 150 mM CTAT

Fyzikálně síťované hydrogely vzniklé fázovou separací při interakci hyaluronan-tenzid byly pro tuto práci připraveny čtyřmi metodami. Suchá cesta¹ míchání vzorků, které byly následně ponechány k relaxaci stáním, byla označena jako **příprava č. 1**, mokrá cesta míchání zásobních roztoků s následným stáním vzorku je značena jako **příprava č. 2**, obdobně suchá a mokrá cesta s odstředěním vzorků jsou označeny jako **příprava č. 3**, resp. **č. 4**.

Podrobnější popis daných metod příprav je zmíněn v následujících podkapitolách.

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

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

Jelikož se při přípravě mokrou cestu míchají zásobní roztoky v poměru 1:1, tak je pro zachování stejných koncentrací komponent ve vzniklém gelu potřeba spočítat navážky na suchou cestu pro polovinu výsledného objemu, v tomto případě 2 % či 0,5 % Hya, resp. 200 mM či 50 mM tenzid v objemu 3 ml.

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

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

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

Postup přípravy je téměř shodný s metodou č. 1., avšak míchání vzorků probíhalo ve skleněných centrifugačních zkumavkách. Po homogenizaci a vortexování roztoku byl tento

¹ Příhlaška vynálezu PV 2016-946 – Způsob přípravy fyzikálně síťovaného hydrogelu s alespoň jednou solubilizovanou hydrofobní skupinou.

odstředován po dobu 15 min a 3 500 ot/min na rotační centrifuze ROTOFIX 32 Hettich Zentrifugen.

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

Metoda je obdobná s postupem č. 2, kdy jsou do centrifugačních zkumavek smíchány zásobní roztoky vybraných komponent v poměru 1:1. Vzniklý roztok je poté homogenizován promícháním špachtlí, vortexován několik desítek sekund, a poté odstředěn opět při 3 500 ot/min po dobu 15 min.

5.3 Metody měření a standardní vyhodnocení dat

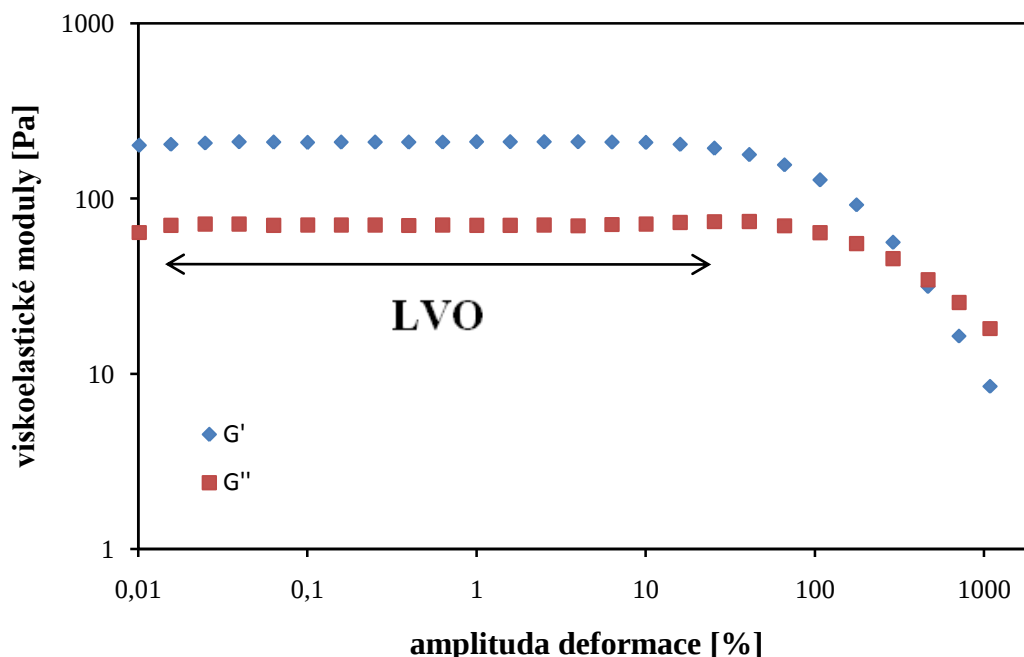
5.3.1 Reologie - oscilační testy

Veškerá reologická měření byla provedena na rotačním reometru DISCOVERY HR2 od firmy TA Instruments při teplotě 25 °C, jež byla temperována před každým měřením. V případě gelových vzorků byla použita geometrie typu deska-deska s průměrem horní rotační ocelové desky 20 mm. Pro měření reologických vlastností zásobních roztoků, které byly provedeny hlavně pro srovnání tokových vlastností s gely, byla použita geometrie typu double gap (viz **obr. 17**). Software TRIOS umožňuje nastavení jednotlivých parametrů. Před každým měřením byl zaveden krok relaxace vzorku tzv. „*conditioning step*“, kdy po sjetí senzoru do měřicí polohy je vzorek ponechán k relaxaci po dobu 5 min při požadované teplotě měření. V případě prvního typu geometrie je horní rotační deska v měřicí poloze vzdálena 100 μm od spodní stacionární desky. V druhém provedení je horní rotační válec v měřicí pozici vzdálen 500 μm od dna spodního válce, do kterého se zasouvá.

Pro všechny typy vzorků byl nejprve proveden deformační test tzv. „*strain sweep test*“, jehož výsledkem je závislost viskoelastických modulů na měnící se amplitudě deformace při konstantní hodnotě frekvence oscilací, která byla nastavena na 10 rad/s. Rozsah amplitudy deformace se v průběhu měření měnil v rozmezí 0,01–1 000 %. Výsledkem těchto testů je nalezení optimální hodnoty amplitudy deformace, která je poté použita do dalších typů měření. Tato hodnota leží v tzv. lineární viskoelastické oblasti (LVO), která je zakončena těsně před protnutím obou modulů, tzv. *cross pointem*. Po překročení takové amplitudy deformace nastává nevratné porušení uzlů gelu, který již poté není schopen nabýt své původní struktury. Poloha viskoelastických modulů vůči sobě ve strain sweep testu je také nositelem informace o tom, které chování u dané látky převažuje, jestli tedy vykazuje charakter jako elastické těleso či viskózní kapalina. Gely lze také porovnat z hlediska rozsahu LVO, kdy ten, jehož cross point obou modulů je posunut k vyšším hodnotám amplitudy deformace, dosahuje lepších mechanických vlastností, co se týče rigidity struktury gelu. Typický průběh závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace je uveden na **obr. 18**. V tomto konkrétním případě převyšuje elastický modul nad viskozitním a daná viskoelastická látka vykazuje převahu elastického chování.

Druhý typ testů reologického měření se nazývá frekvenční test s konstantní hodnotou amplitudy deformace, tzv. „*frequency sweep test*“. Daná hodnota deformace byla vybrána z předchozích testů tak, aby náležela do LVO. U všech vzorků byla použita její hodnota 1 %. Rozsah měnících se frekvencí byl nastaven v rozmezí 0,01–20 Hz. Výsledky poté ukazují závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilace. Zde je též možno usuzovat mechanické vlastnosti gelů s ohledem na cross point modulů, liší se pouze doba působení síly o stejné velikosti. Rozdílné hodnoty intenzit modulů (v grafech ve smyslu pohybu po ose y) vypovídají o mechanických vlastnostech gelu jako celku. Dle rovnice (7) byly také

vypočítány ztrátové úhly δ , jejichž porovnání je přehlednější v případě většího množství vzorků, jelikož jsou oba viskoelastické moduly sloučeny v jednu křivku.



Obr. 18: Typický průběh viskoelastických modulů v deformačním testu, šipkou je znázorněna LVO

5.3.2 Reologie – tokové testy

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

Veškerá data z reologických měření byla exportována do MS Excel, kde byly spočítány potřebné výsledky a hodnoty vyneseny do grafů. Pro lepší prezentaci dat jsou u všech grafů reologických měření použita logaritmická měřítka u obou os. Finální křivky nebyly proloženy žádným matematickým modelem, jelikož je tato diplomová práce zaměřena na základní charakteristiku gelů a posouzení jejich viskoelastických vlastností dle elastických a ztrátových modulů, popř. tokových křivek. Ty byly posléze diskutovány z hlediska aplikačních vlastností jako např. porovnání se smykovými rychlostmi mrknutí oka a k tomu odpovídající viskozitou slz, apod.

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

5.3.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Měření maloúhlového rozptylu světla bylo provedeno externě na pracovišti Centrální laboratoře RTG Difrakce a Bio-SAXS, která je součástí Středoevropského technologického

institutu (CEITEC) v Brně. Po schválení žádosti byla tamními specialisty změřena primární sada vzorků, jejíž vyhodnocení mělo přinést informace o použitelnosti této metody propřípadná další měření ke stanovení velikosti částic a tvaru micel tenzidů v hydrogelu.

Vzorky byly měřeny při laboratorní teplotě ve skleněných kapilárách o průměru 1 mm, které byly vkládány v sériích po třech do přístroje Rigaku BioSAXS-1000 SAXS. Vzorek byl do kapiláry dávkován v objemu cca 10 μ l pomocí injekční stříkačky a jehly o průměru 0,8 mm a délce 120 mm. Příliš tuhé gely nebylo možné protlačit jehlou a nadávkovat do kapiláry. Použitelnost této metody přípravy, popř. vhodnost vzorků na toto měření je diskutováno v kapitole 6.1, popř. v kapitole 6.3. Kapiláry jsou poté zataveny a po vložení do přístroje je celý měřicí prostor evakuován.

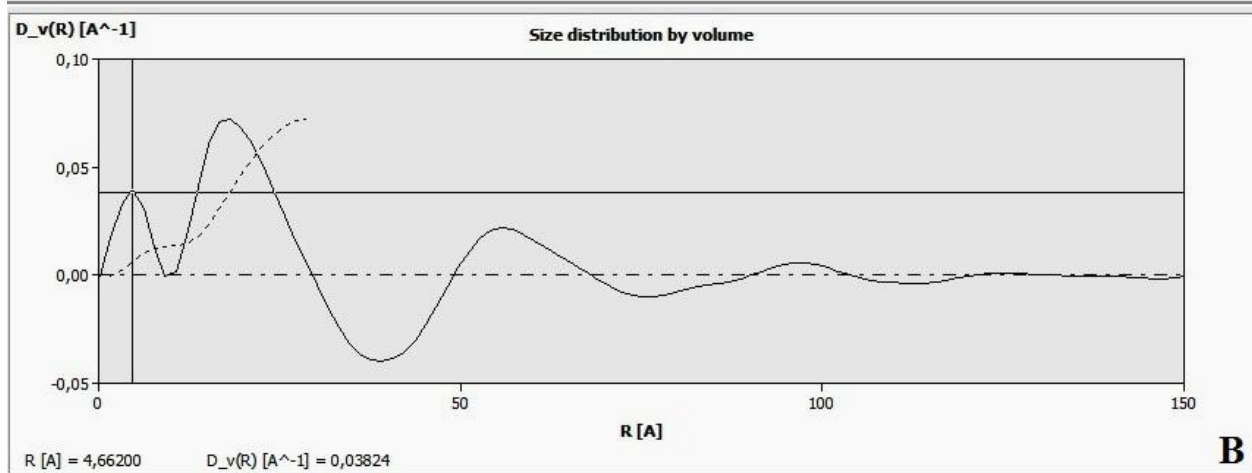
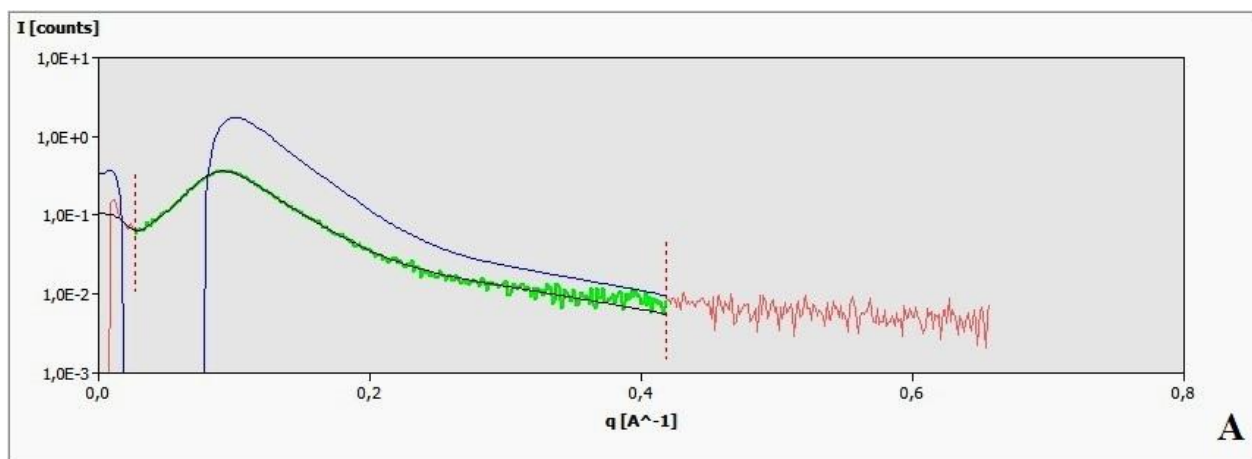
Jako zdroj rentgenového záření je u přístroje Rigaku použita rotační měděná anoda a na zafokussování paprsku je použito multivrstevné parabolické zrcadlo. Měření probíhá v transmisním módu při výkonu zdroje 40 kV a proudu 30 mA.

Poté, co jsou vzorky připraveny v měřicím prostoru, který se nachází 0,4 m od detektoru PLATUS 100K od firmy Dectris Ltd., je pomocí softwaru provedeno postupné nastavení paprsku rentgenového záření do středu všech tří kapilár se vzorky. Použitá vlnová délka záření je nastavena jako 1,54 Å. Následně byla provedena dvojdimenzionální analýza, která trvala 10 min na jeden vzorek. Detektor přitom snímá rozptyl rentgenového záření v rozmezí úhlů 0,1°–9,15°. Právě rozptyl v těchto malých úhlech nese užitečnou informaci o tvaru a velikosti makromolekul a nehomogenitě částic. Pro subtrakci pozadí bylo měřeno rozpouštědlo (0,15 M NaCl) za stejných podmínek. Radiální průměrování a subtrakce pozadí byly provedeny v programu SAXSLab3.0.0r1, Rigaku.

Vyhodnocení dat probíhalo ve spolupráci s konzultantem-specialistou na pracovišti rentgenové difrakce Fakulty chemické VUT v Brně. V programu EasySAXS byla surová data závislosti intenzity záření I na vlnovém vektoru q proložena matematickým modelem, který spočítá distribuční parametr D_v funkce dle rovnice:

$$\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} D_v(R) dR = 1. \quad (8)$$

Z rovnice poté software vyhodnotí distribuční diagram, na kterém je možné vidět rozložení částic v závislosti na poloměru R . Integrální křivka, vypovídající o objemovém zastoupení jednotlivých frakcí částic, je ve výsledném grafu také přítomna. Příklad vyhodnocení dat v software EasySAXS je uveden na **obr. 19**.



Obr. 19: A) Příklad proložení distribuční funkce vhodným matematickým modelem v programu EasySAXS, B) výsledný distribuční diagram

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

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

Podkapitola 6.1 sděluje informace subjektivního hodnocení autora o metodách přípravy a problémech při práci s gely. Rozebráno je chování gelů a jejich použití pro dané instrumentace, dále také jejich vzhled či mechanická pevnost nebo tekutost při aplikaci do měřících aparatur. Tabulky výsledků jsou doplněny ukázkovými fotografiemi z přípravy gelů různými metodami, jejich reakce na změnu teploty, popř. srovnání množství vzniklého gelu.

V následující podkapitole, která zaujímá stěžejní pozici v této práci, jsou zhodnoceny základní viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů. Metody přípravy a použití odlišných komponent pro složení gelů jsou diskutovány s ohledem na mechanické a tokové vlastnosti daných gelů. Aplikací potenciál pro medicínské aplikace je vyvozen z výsledků tokových měření při jejich srovnání s vybranými tokovými vlastnostmi biologických či průmyslových procesů.

Poslední kapitola stručně shrnuje prvotní pokusy o přínos či naopak nevhodnost aplikace metody malouhlového rozptylu rentgenového záření na dané typy vzorků.

6.1 Vizuální charakterizace chování a vlastností hydrogelů

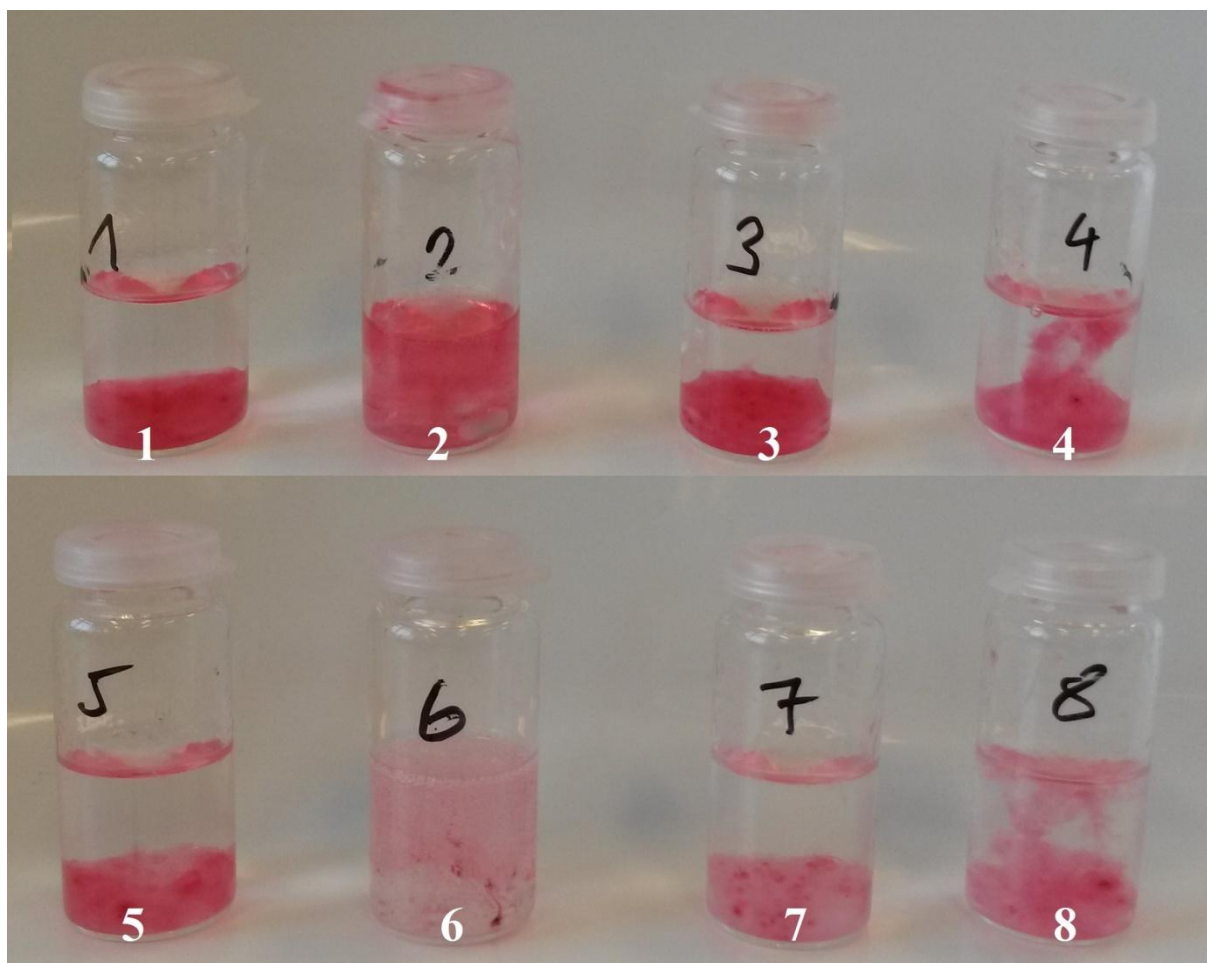
I přesto, že by se mohlo vizuální zhodnocení gelů jevit jako irelevantní a nic nevypovídající, opak je pravdou. Hned na první pohled jsou totiž mezi vzhledem a mechanickými vlastnostmi gelů znát jemné nuance, které napoví o možném chování či použití gelů pro danou aplikaci či instrumentální analytickou metodu.

Z předchozí zkušenosti při práci s hydrogely na bázi Hya-CTAB vyplývá, že při přichystání roztoku pro fázovou separaci na výsledný objem 6 ml vznikne přibližně 1 ml gelu. Nejprve proto byla sestavena čtveřice gelů dle **tabulky 1**, kdy byl zhodnocen vliv protiiontů použitých tenzidů na objem vzniklého gelu. Důvod použití pouze nejvyšších koncentrací Hya i tenzidů z nabízených možností přípravy gelů dle základní čtveřice (viz kapitola 5.2.4) byl čistě praktický, kdy v těchto případech dochází ke vzniku největších množství gelů v porovnání s použitím nižších koncentrací vstupních komponent. Použité číslování způsobů přípravy, které je uvedeno v tabulce, koreluje s těmi, popsanými v kapitole 5.2.4. Pro úplnost je také třeba dodat, že číselné označení gelů v **tabulce 1** není totožné s číslováním v **tabulce 2**, která prezentuje gely připravené jako základní čtveřice. I přes stejné číslo označení se tudíž liší výchozími koncentracemi stavebních komponent.

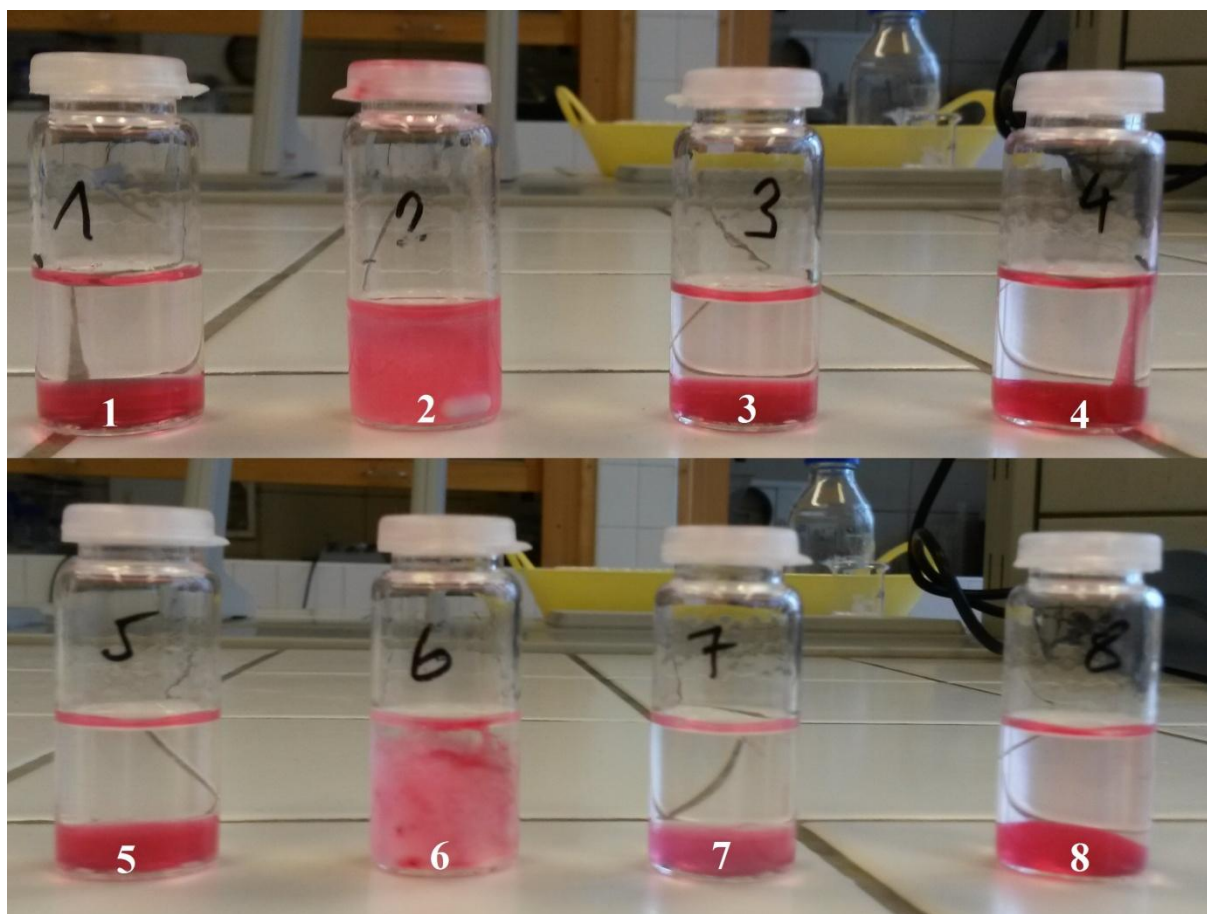
Tab. 1: Přehled gelů pro primární vizuální charakterizaci

Číselné označení gelu	Metoda přípravy	Složení
1	1	2 % HMW Hya + 200 mM CTAB
2	1	2 % HMW Hya + 200 mM CTAT
3	1	2 % HMW Hya + 300 mM CTAB
4	1	2 % HMW Hya + 200 mM CTAC
5	2	2 % HMW Hya + 200 mM CTAB
6	2	2 % HMW Hya + 200 mM CTAT
7	2	2 % HMW Hya + 300 mM CTAB
8	2	2 % HMW Hya + 200 mM CTAC

Použití koncentrace 300 mM u tenzidu CTAB prezentuje snahu o změnu tvaru jeho micel. Dle inspirace z rešerše je patrné, že při koncentracích vyšších než 200 mM přechází CTAB ze sférických na tyčinkové micely. Z **obr. 20 a 21**, které prezentují gely popsané v **tabulce 1**, je však patrné, že tvar micel nemá vliv na výsledný objem vzniklého gelu. Pro přehlednost zde byly gely obarveny olejovou červení. Fakt, že v případě tenzidu CTAT, obsahujícím tyčinkové micely, došlo ke gelaci v celém objemu, je zapříčiněn strukturou jeho protiiontu, nikoli však tvarem micel. Jak již bylo o tomto fenoménu popsáno v kapitole 3.4, CTAT je schopno gelovat samovolně i ve vodném roztoku, a to již při koncentraci 100 mM, z důvodu hydrofobicity tosylátového protiiontu. Při použití jeho nižších koncentrací, příkladně 50 mM pro přípravu gelů ze základní čtveřice, vznikalo obdobné množství výsledného gelu jako v případě gelů s CTAB a CTAC.



Obr. 20: Znázornění vzhledu a množství gelů z primární charakteristiky – foceno ihned po přípravě



Obr. 21: Znázornění vzhledu a množství gelů z primární charakteristiky – foceno dva měsíce po přípravě

Obr. 20 a **21** také ukazují na časovou trvanlivost vzorků. První z nich je focen ihned po přípravě, druhý po dvou měsících stání. Již na první pohled je patrné, že se gely ničím neliší. Měření viskoelastických vlastností a vnitřní struktury pomocí metody SAXS, bylo u těchto prvních osmi vzorků, z časových důvodů, provedeno pouze jednou. I tak však výsledky naznačují shodu vlastností gelů ihned po přípravě a po dvoutměsíčním stání, což vypovídá o mechanické stabilitě těchto gelů.

Právě u gelů složených z nejvyšších koncentrací výchozích komponent (**tabulka 1**) je velmi jasně patrné fázové rozhraní. Gely jsou také na pohled tužší, tudíž je u nich jednodušší zpozorovat vliv metody přípravy. Porovnání **přípravy č. 1** a **2**, čili *suchá* a *mokrý* cesta s následným *stáním* vzorku, vykazuje zanedbatelný rozdíl na výsledný vzhled gelu. Z následujících odstavců je však patrné, že u ostatních gelů s použitím jiných výchozích koncentrací stavebních látek, může být vliv přípravy zásadní. Gely se liší svou tuhostí či tekutostí, u některých příprav také není dosaženo úplného rozpuštění výchozích látek, i přes finální gelaci systému. Z toho důvodu je pro ten či onen vzorek některá z metod přípravy zcela nevhodná.

Po prvotním zhodnocení vizuální stránky gelů byly připraveny sady vzorků pro veškerá reologická měření. Základní koncept čtveřice gelů zůstal stejný, již popsáný v kapitole 5.2.4. Přehled vzorků s číselným označením je uveden v **tabulce 2**. Zde uvedených 24 vzorků bylo připraveno všemi čtyřmi druhy metod (viz kapitola 5.2.4), celkem tedy bylo přichystáno 96

gelů základní čtveřice. Pro měření metodou SAXS byla vybrána přibližně čtvrtina reprezentativních vzorků (viz kapitola 6.3).

V průběhu reologických měření byly všechny vzorky vyfotografovány a jejich vizuální posouzení bylo zapsáno do laboratorního deníku. Podrobný popis subjektivního posouzení vizuálních vlastností gelů autorem je pro přehlednost uveden v **tabulce č. 3** a **č. 4**. První z nich prezentuje porovnání všech čtyř metod přípravy pro gely založené na hyaluronanu o nízké molekulové hmotnosti. Druhá pak poskytuje tytéž informace pro gely tvořené tenzidem a vysokomolekulárním hyaluronanem.

Tab. 2: Číselná označení a složení základních čtveřic gelů

Číselné označení gelu		Složení
LMW Hya	HMW Hya	
1	5	2 % Hya + 200 mM CTAB
2	6	2 % Hya + 50 mM CTAB
3	7	0,5 % Hya + 200 mM CTAB
4	8	0,5 % Hya + 50 mM CTAB
9	13	2 % Hya + 200 mM CTAT
10	14	2 % Hya + 50 mM CTAT
11	15	0,5 % Hya + 200 mM CTAT
12	16	0,5 % Hya + 50 mM CTAT
17	21	2 % Hya + 200 mM CTAC
18	22	2 % Hya + 50 mM CTAC
19	23	0,5 % Hya + 200 mM CTAC
20	24	0,5 % Hya + 50 mM CTAC

Tab. 3: Vizuální charakteristika základních čtveřic gelů na bázi LMW Hya-tenzid

	Číslo gelu	Vzhled gelu	Vzhled supernatantu	Množství gelu	Anomálie	Použitelnost pro SAXS
Metoda přípravy č. 1	1	Jemně tekoucí, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	
	2	Mírně zakalený	Čirý	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	3	Viz vzorek č. 2				
	4	Viz vzorek č. 2				
	9	Tuhý, odolný proti vpichu špachtlí	–	Celý objem vialky	Obsah nerozpuštěného podílu	Nevybráno k měření
	10	Pevný, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	

	11	Tekutější, zakalený	Zakalenější, hustý	Cca 1 ml na dně vialky	Obsah nerozpuštěného podílu, hustý (gelovitý) sup.	Nevybráno k měření	
	12	Velmi pevný, čirý	Čirý	Povlak na dně vialky, agregát plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	Nevybráno k měření	
	17	Tekutější, zakalený	Zakalenější, hustý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓	
	18	Čirý, tekutý	Mírně zakalený	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	19	Viz vzorek č. 18					
	20	Viz vzorek č. 18					
Metoda přípravy č. 2	1	Jemně tekoucí, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓	
	2	–	Zakalený	Téměř žádný gel	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	3	Tuhý, transparentní	Čirý	Cca 0,5 ml na dně vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	4	Transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	9	Tekutý, mírně zakalený	–	Celý objem vialky	–	Nevybráno k měření	
	10	Tekutější, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na hladině supernatantu	Sup. uzavřen neprodyšně pod gelem	✓	
	11	Viz vzorek č. 10					Nevybráno k měření
	12	Pevný, čirý	Čirý	Cca 2 ml plave ve formě agregátu v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	Nevybráno k měření	

	17	Tekutější, zakalený	Zakalenější	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓	
	18	Zakalený, tekutý	Velmi zakalený	Cca 0,5 ml na dně vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	19	Transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	20	Viz vzorek č. 19					
Metoda přípravy č. 3	1	Tuhý, transparentní	Čirý	Cca 1 ml na dně zkumavky	Gel rychle schne a tvrdne	✓	
	2	Tekutější, transparentní	Čirý	Cca 0,5–1 ml na dně zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	3	Tekutější, transparentní	Čirý	Cca 0,5 ml na dně zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	4	Tekutější, transparentní	Čirý	Cca 0,5 ml na dně zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření	
	9	Tekutý, mírně zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky	Nevybráno k měření	
	10	Tekutější, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na dně zkumavky, část na hladině supernatantu	Sup. uzavřen neprodyšně pod gelem, na dně zkumavky obsah nerozpuštěného podílu	✓	
	11	Tekutý, zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky	Nevybráno k měření	
	12	Viz vzorek č. 10, na dně zkumavky je však méně gelu					Nevybráno k měření
	17	Tekutější, transparentní	Čirý	Cca 1 ml na dně zk.	Gel rychle schne a tvrdne	✗	

Metoda přípravy č. 4	18	Viz vzorek č. 17				Nevybráno k měření
	19	Tekutější, transparentní	Čirý	Velmi málo	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	20	Viz vzorek č. 19				
	1	Jemně tekoucí, transparentní	Čirý	Cca 1 ml na dně zkumavky	–	✓
	2	Tekutý, zakalený	Zakalený	Malý tužší podíl na dně zkumavky	Není poznat fázové rozhraní	Nevybráno k měření
	3	Jemně tekoucí, transparentní	Čirý	Cca 0,5 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření
	4	Viz vzorek č. 3				
	9	Hustý, pevný, zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu v horní polovině zkumavky	Nevybráno k měření
	10	Tuhý, transparentní	Mírně zakalený	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–	✓
	11	Hustý, pevný, zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu v dolní polovině zkumavky	Nevybráno k měření
	12	Tuhý, zakalený	Mírně zakalený	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření
	17	Pevný, zakalený	Čirý	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–	✓
	18	Viz vzorek č. 2				
	19	Tekutější, transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na stěnách zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	20	Tekutější, transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na dně zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření

Tab. 4: Vizuální charakteristika základních čtveřic gelů na bázi HMW Hya-tenzid

	Číslo gelu	Vzhled gelu	Vzhled supernatantu	Množství gelu	Anomálie	Použitelnost pro SAXS
Metoda přípravy č. 1	5	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓
	6	Tekutější, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	Nevybráno k měření
	7	Pevný, čirý	Čirý	Velmi málo na dně a stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	8	Viz vzorek č. 7				
	13	Pomalu teče, odolný proti vpichu špachtlí	–	Celý objem vialky	Obsah nerozpuštěného podílu	Nevybráno k měření
	14	Jemně tekoucí, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓
	15	Tekutější, zakalený	Zakalený	Cca 1 ml na dně vialky prostupující do objemu supernatantu	Obsah nerozpuštěného podílu.	Nevybráno k měření
	16	Velmi pevný, čirý	Mírně zakalený	Povlak na dně vialky, agregát plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	Nevybráno k měření
	21	Čirý, tuhý	Mírně zakalený	Agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	✓
	22	Tekutý, zakalený	Velmi zakalený	Cca 1 ml na dně vialky	Horší rozpoznání fázového rozhraní	Nevybráno k měření
	23	Čirý, tekutý	Mírně zakalený	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	24	Viz vzorek č. 23				

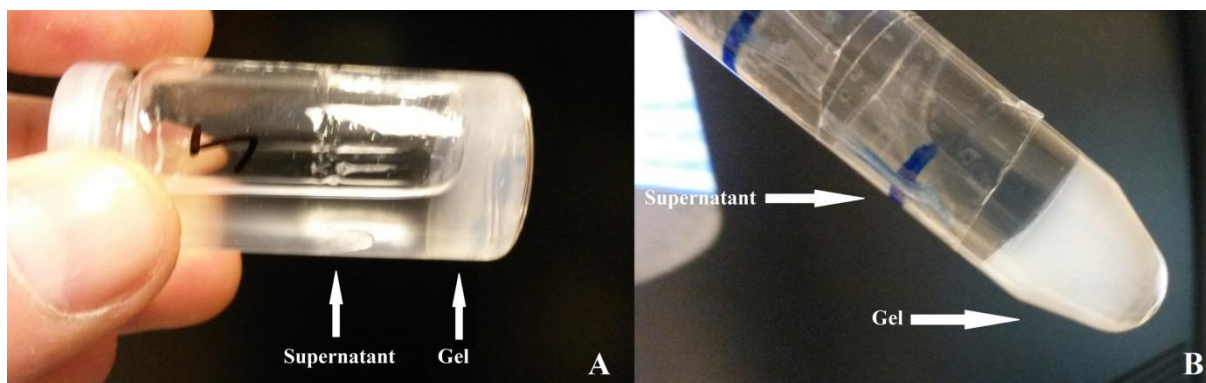
Metoda přípravy č. 2	5	Pevný, mírně zakalený	Čirý	Agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	✓
	6	Tekutý, zakalený	Velmi zakalený	Cca 0,5 ml na dně vialky	Není poznat fázové rozhraní	Nevybráno k měření
	7	Tuhý, transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na stěnách vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	8	Tuhý, transparentní	Čirý	Cca 0,5 ml na dně vialky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	13	Pomalů teče, odolný proti vpichu špachtlí	–	Celý objem vialky	–	Nevybráno k měření
	14	Tekutější, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	✓
	15	Tuhý, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na hladině supernatantu	Sup. uzavřen neprodyšně pod gelem	Nevybráno k měření
	16	Viz vzorek č. 15				
	21	Pevný, mírně zakalený	Čirý	Agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	✓
	22	Tekutý, zakalený	Velmi zakalený	Cca 0,5 ml na dně vialky	Není poznat fázové rozhraní	Nevybráno k měření
	23	Tuhý, transparentní	Čirý	Agregát na dně vialky (cca 1 ml)	–	Nevybráno k měření
	24	Tuhý, transparentní	Čirý	Agregát (cca 1 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku	Nevybráno k měření
Metoda přípravy č. 3	5	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 2 ml na dně zkumavky	–	✗
	6	Tekutější, mírně zakalený	Zakalený	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření
	7	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 0,5–1 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření

	8	Viz vzorek č. 7				
	13	Tuhý, mírně zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky	Nevybráno k měření
	14	Tekutější, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 1 ml na dně zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky	✗
	15	Tuhý, mírně zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky	Nevybráno k měření
	16	Jemně tekoucí, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	Nevybráno k měření
	21	Pevný, transparentní	Čirý	Cca 1 ml na dně zkumavky, část na hladině supernatantu	–	✗
	22	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–	Nevybráno k měření
	23	Viz vzorek č. 21				Nevybráno k měření
	24	Viz vzorek č. 22				
Metoda přípravy č. 4	5	Pevný, mírně zakalený	Čirý	Cca 2 ml na dně zkumavky	–	✓
	6	Tekutý, zakalený	Zakalený	Malý tužší podíl na dně zkumavky	Není poznat fázové rozhraní	Nevybráno k měření
	7	Tuhý, zakalený	Čirý	Cca 0,5 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření
	8	Viz vzorek č. 7				
	13	Hustý, pevný, zakalený	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu v horní polovině zkumavky	Nevybráno k měření

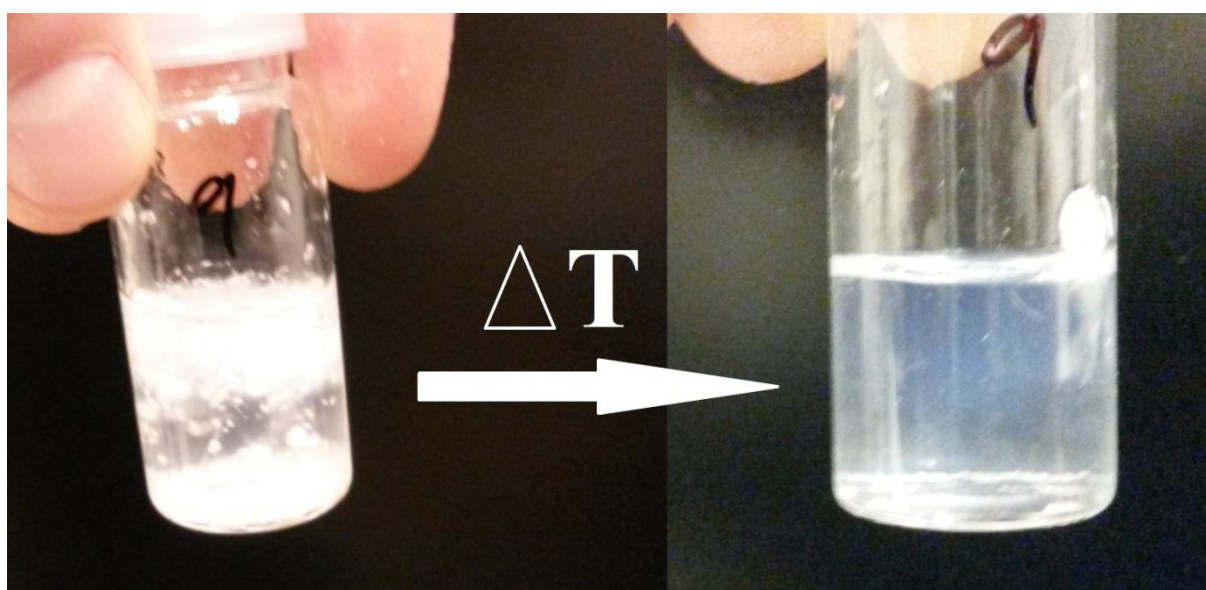
	14	Tekutý, zakalený	Zakalený	Tužší podíl na dně zkumavky	Není poznat fázové rozhraní	✓
	15	Čirý, pevný	–	Celý objem zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu v dolní polovině zkumavky	Nevybráno k měření
	16	Tuhý, mírně zakalený	Mírně zakalený	Cca 0,5–1 ml na dně zkumavky	–	Nevybráno k měření
	21	Pevný, zakalený	Čirý	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–	✓
	22	Viz vzorek č. 6				
	23	Pevný, transparentní	Čirý	Velmi málo na hladině supernatantu	Sup. uzavřen neprodyšně pod gelem, nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření
	24	Tekutější, transparentní	Čirý	Velmi málo, jen na dně zkumavky	Nutno udělat větší objem výchozího roztoku	Nevybráno k měření

Jak je patrné z předchozího přehledu, vzhled a vlastnosti připravených gelů by se daly popsat Gaussovou křivkou. Zhruba polovina gelů vykazuje ideální vzhled a mechanické chování. Takové gely jsou transparentní, pevné na dotek a v dostatečném objemu. Supernatant je též čirý. Zbytek gelů se více či méně blíží krajním extrémům, kdy vykazují ještě větší pevnost či naopak tekutost. Použití nejvyšších koncentrací vstupních komponent potvrzuje opakující se trend vzniku největšího objemu gelů. Toto chování je platné jak u gelů tvořených nízkomolekulárním Hya (vzorky č. 1, 9, 17), tak také u vzorků s obsahem vysokomolekulárního Hya (vzorky č. 5, 13, 21). Pozoruhodný je však fakt, že některé gely tvořené nejnižšími koncentracemi reaktantů vykazují na pohled, ač při menším vzniklém objemu, lepší mechanické vlastnosti než předchozí zmínění zástupci. Podrobně je problematika viskoelastických vlastností popsána v kapitole 6.2.

Na **obr. 22** je v části A a B prezentován ideální vzhled gelů ve vialce, popř. v centrifugační zkumavce. **Obr. 23** naopak ukazuje zajímavý jev, kdy při mírném snížení teploty jevil tenzid snahu se vyvločkovat z gelu i přesto, že tvořil jeho vnitřní komponentu. Tento jev byl potlačen opětovným zahřátím vzorku.



Obr. 22: Ideální vzhled vzniklých hydrogelů ve A) vialce, B) centrifugační zkumavce



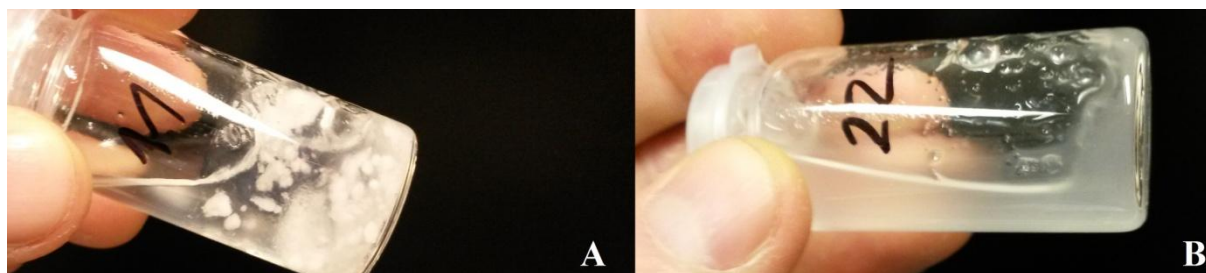
Obr. 23: Vločkování tenzidu z hydrogelu za nižší teploty a odstranění tohoto jevu jejím zvýšením

Z tabulky 3 a 4 taktéž vyplývá fakt o nevhodnosti použití určité metody přípravy pro daný vzorek. Jedná se zejména o použití tenzidu CTAT (vzorky č. 9–16), kdy tento v obou případech použití *suché cesty*, tedy metody **přípravy č. 1 a 3**, nebyl dostatečně rozpuštěn a jeho pevný podíl se nacházel ve vzniklém gelu. I přesto, že gel nakonec vznikl, nemůžeme přesně určit z jaké výsledné koncentrace tenzidu. Obecně se *mokrý cesta* jeví jako vhodnější způsob přípravy pro všechny druhy gelů, jelikož jsou při tomto postupu smíchány již dobře rozpuštěné zásobní roztoky vstupních komponent.

V případě vzorků č. 2, 6, 18 a 22 bylo pozorováno neobvyklé chování, kdy i přes použití 2 % Hya, avšak jen 50 mM tenzidu, nevznikal buď vůbec žádný gel, nebo byl výsledný roztok tak zakalený a viskózní, že nebylo možno pozorovat fázové rozhraní. Z těchto pozorování lze vyvodit závěr, že na gelaci systému Hya-tenzid má pravděpodobně zásadní vliv použitá koncentrace tenzidu, jehož micely jsou pak schopny pospojovat i malé množství hyaluronanu do síťovité struktury perlového náhrdelníku. Tento fenomén je ilustrován, spolu s nevhodností použití *suché cesty* pro gely na bázi CTAT, na **obr. 24**.

Vzorky, které byly použity pro měření metodou SAXS jsou v předchozích tabulkách poznačeny jako ✓ pro vzorky vhodné k dávkování do kapiláry měřící aparatury. Ty označené

jako ✗ byly na dávkování příliš tuhé. Ostatní vzorky nebyly pro tuto metodu zvoleny. Bližší pojednání o této problematice poskytuje kapitola 6.3.



Obr. 24: A) Nevhodnost použití suché cesty přípravy, B) nemožnost určit fázové rozhraní některých vzorků

Jelikož je tato diplomová práce zaměřena primárně na studium gelů na bázi Hya-CTAT, byla sestavena ještě doplňková sada vzorků dle **tabulky 5**. Koncentrace výchozích komponent pro tvorbu gelů se liší od základní čtveřice, přičemž obě sady jsou již popsány v kapitole 5.2.4. Důvodem je bližší prozkoumání interakcí hyaluronanu s CTAT v okolí koncentrace samovolné gelace tohoto tenzidu. Ta je dle kapitoly 3 stanovena jako 100 mM ve vodném prostředí.

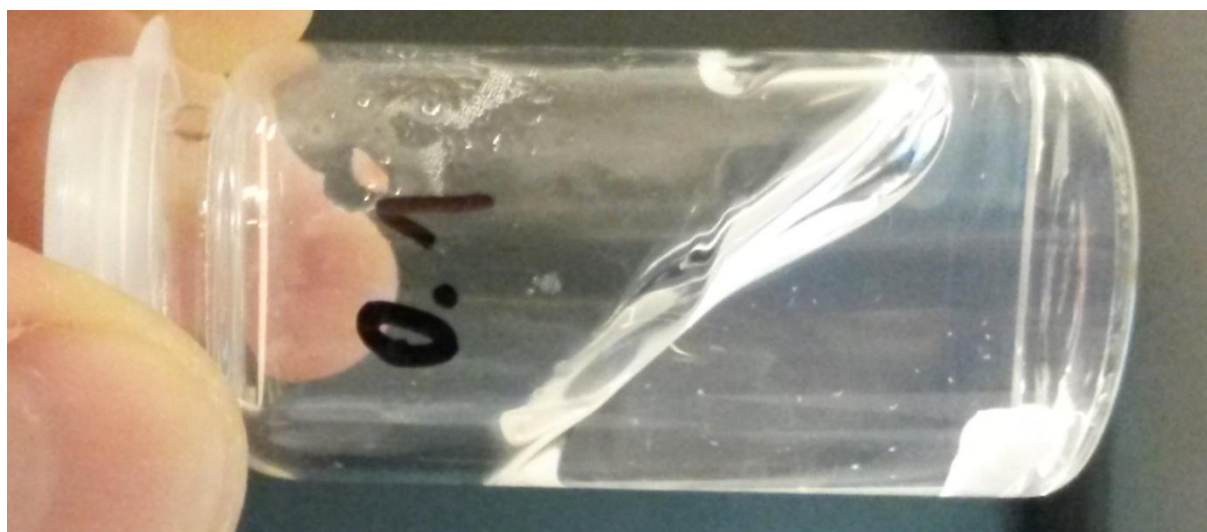
Tab. 5: Číselná označení a složení doplňkové sady gelů

Číslo gelu	Metoda přípravy	Složení		Číslo gelu	Metoda přípravy	Složení	
		Hya	CTAT			Hya	CTAT
1	1	2 % LMW	75 mM	1	3	2 % LMW	75 mM
2	1	2 % LMW	100 mM	2	3	2 % LMW	100 mM
3	1	2 % LMW	150 mM	3	3	2 % LMW	150 mM
4	1	0,5 % LMW	75 mM	4	3	0,5 % LMW	75 mM
5	1	0,5 % LMW	100 mM	5	3	0,5 % LMW	100 mM
6	1	0,5 % LMW	150 mM	6	3	0,5 % LMW	150 mM
7	1	2 % HMW	75 mM	7	3	2 % HMW	75 mM
8	1	2 % HMW	100 mM	8	3	2 % HMW	100 mM
9	1	2 % HMW	150 mM	9	3	2 % HMW	150 mM
10	1	0,5 % HMW	75 mM	10	3	0,5 % HMW	75 mM
11	1	0,5 % HMW	100 mM	11	3	0,5 % HMW	100 mM
12	1	0,5 % HMW	150 mM	12	3	0,5 % HMW	150 mM
13	2	2 % LMW	75 mM	13	4	2 % LMW	75 mM
14	2	2 % LMW	100 mM	14	4	2 % LMW	100 mM
15	2	2 % LMW	150 mM	15	4	2 % LMW	150 mM
16	2	0,5 % LMW	75 mM	16	4	0,5 % LMW	75 mM
17	2	0,5 % LMW	100 mM	17	4	0,5 % LMW	100 mM
18	2	0,5 % LMW	150 mM	18	4	0,5 % LMW	150 mM
19	2	2 % HMW	75 mM	19	4	2 % HMW	75 mM
20	2	2 % HMW	100 mM	20	4	2 % HMW	100 mM
21	2	2 % HMW	150 mM	21	4	2 % HMW	150 mM
22	2	0,5 % HMW	75 mM	22	4	0,5 % HMW	75 mM

23	2	0,5 % HMW	100 mM	23	4	0,5 % HMW	100 mM
24	2	0,5 % HMW	150 mM	24	4	0,5 % HMW	150 mM

Všechny gely uvedené v předchozí tabulce byly opět připraveny čtyřmi metodami přípravy a podrobeny veškerým reologickým testům stejně jako gely základního čtverce popsané v **tabulce 2**. V průběhu měření byla také popsána subjektivní charakterizace vizuálního vzezření gelů autorem. Měření metodou SAXS nebylo u těchto vzorků provedeno.

I přesto, že gelace tenzidu CTAT je stanovena při koncentraci 100 mM, z **obr. 25** je možné si všimnout, že již jeho zásobní roztok o koncentraci 50 mM vykazuje více či méně elastickou povahu. Vše záleží na osobním pohledu pozorovatele při určení, které látky už vykazují chování gelu a které nikoliv. Příprava gelů *mokrou cestou* by se tedy mohla zdát neefektivní z hlediska inkorporace zásobního roztoku Hya do již hotových gelů tenzidu CTAT. Podrobný popis srovnání tokových vlastností gelů tvořených samotným CTAT a těch s přídavkem Hya je popsán v kapitole 6.2. I když by se u některých vzorků mohlo jednat o zbytečný krok v přípravě, kdy Hya již nijak neovlivní viskoelastické vlastnosti gelu z CTAT, právě jeho včlenění do struktury gelů je žádoucí z hlediska zachování biokompatibility či schopnosti cílení k nádorovým receptorům. Míra účinnosti inkorporace Hya do gelů pak bude záviset na individuální snaze operátora výchozí roztoky co nejvíce homogenizovat mícháním špachtlí či vortexováním.



Obr. 25: Zásobní roztok CTAT o koncentraci 50mM vykazující elastické chování

V následující **tabulce 6** jsou obdobně jako u **tabulek 3** a **4** popsány vizuální projevy gelů doplňkové sady na bázi Hya-CTAT. Hodnocení proběhlo okem operátora s důrazem na množství a mechanickou pevnost vzniklých gelů.

Jako první se zde projevuje potvrzující fakt, že metoda **přípravy č. 1** popř. **3**, tedy *suchá cesta* míchání vzorků, není vhodná pro tento typ tenzidu. CTAT ve formě prášku je poměrně obtížné rozpustit i s míchadlem, pouhé stání či odstředění vzorků proto není dostačující. I přes tento nedostatek však došlo ke vzniku gelů. Důležité je si také povšimnout trendu, že i když má CTAT gelovat již při koncentraci 100 mM, v přítomnosti Hya tomu tak někdy nemusí být, obzvláště při použití nízké molekulové hmotnosti Hya a jeho koncentrace 0,5 %. Ke gelaci zde dochází až při použití 150 mM tenzidu, přičemž do té doby vznikají jen velmi viskózní roztoky. Obecně se tento jev děje i v případě použití HMW Hya při metodě přípravy *suchou*

cestou. Zde může mít již zmíněný fakt výskytu nerozpuštěného podílu tenzidu v roztoku právě vliv na tento jev, kdy ke gelaci není použita potřebná koncentrace tenzidu a vzniká tudíž méně gelu. Obecně tedy z následující tabulky vyplývá, že pro vznik většího množství gelu je vhodnější metoda přípravy s krokem odstředění vzorků, pro dokonalé rozpuštění komponent pak použití *mokrých cest*. Vzorky č. 19, 20 a 21 tento fakt potvrzují. Gelace právě této trojice vzorků také vypovídá pravděpodobně o zásadním vlivu molekulové hmotnosti Hya při jeho inkorporaci dovnitř gelů, které, při použití vysokomolekulárního Hya, vznikají v celém objemu reakčních nádob i při nižších koncentracích tenzidu.

Poslední zajímavý jev se vyskytl u vzorků č. 6 a 7 při použití metody **přípravy č. 1**. Oba se liší svým složením velmi výrazně, 0,5 % LMW Hya + 150 mM CTAT pro vzorek č. 6 resp. 2 % HMW Hya + 75 mM CTAT pro vzorek č. 7. Vytvořené gely však vykazovaly téměř identický vzhled, množství i tokové vlastnosti. To by mohlo znamenat, že vyšší koncentrace tenzidu s nižší koncentrací Hya a naopak se mohou do jisté míry zastupovat v tvorbě gelové sítě.

Tab. 6: Vizuální charakteristika doplňkové sady gelů na bázi Hya-CTAT

	Číslo gelu	Vzhled gelu	Vzhled supernatantu	Množství gelu	Anomálie
Metoda měření č. 1	1	Tuhý, transparentní	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, prstenec na stěnách	–
	2	Viz vzorek č. 1			Drobné zbytky nerozpuštěného podílu
	3	Tuhý, mírně zakalený	Mírně zakalený, viskózní	Cca 2 ml na dně vialky, prstenec na stěnách	Zbytky nerozpuštěného podílu
	4	Pevný, transparentní	Čirý	Agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku
	5	Pevný, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku
	6	Pevný, mírně zakalený	Mírně zakalený, viskózní	Cca 2 ml na dně vialky	Drobné zbytky nerozpuštěného podílu
	7	Pevný, mírně zakalený	Mírně zakalený, viskózní	Cca 3 ml na dně vialky, povlak po stěnách	Zbytky nerozpuštěného podílu
	8	Pevný, mírně zakalený	Zakalený, viskózní	Cca 4 ml na dně vialky, povlak po stěnách	Zbytky nerozpuštěného podílu
	9	Pevný, velmi pomalu tekoucí	–	Celý objem vialky	Zbytky nerozpuštěného podílu

	10	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Velmi málo na dně vialky, agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku
	11	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 1 ml na dně vialky, agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku
	12	Viz vzorek č. 9			
Metoda měření č. 2	13	Tekutý, zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–
	14	Tuhý, zakalený	Čirý	Cca 5 ml na hladině supernatantu	Sup. (cca 0,5 ml) uzavřen na dně vialky neprodyšně pod gelem
	15	Mírně tekoucí, zakalený	Mírně zakalený	Cca 4,5 ml na dně vialky, povlak po stěnách	–
	16	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 1,5 ml gelu drží na dně vialky a prostupuje do objemu	–
	17	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Agregát (cca 2 ml) plave v roztoku	Podíl gelu plave v roztoku
	18	Tekutější, velmi zakalený až do bílé barvy	Velmi zakalený, viskózní	Gel zabírá cca polovinu vialky, teče spolu se supernatantem	Velmi zakalený komplex
	19	Pevný, transparentní	–	Celý objem vialky	Mírné zakalení na povrchu gelu
	20	Viz vzorek č. 19			
	21	Pevný, zakalený	–	Celý objem vialky	–
	22	Tekutější, zakalený	Zakalený	Gel (cca 2 ml) teče spolu se supernatantem, na dně vialky nedrží	Podíl gelu plave v roztoku
	23	Viz vzorek č. 22			

	24	Viz vzorek č. 22			
Metoda měření č. 3	1	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Cca 1–2 ml na dně zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky
	2	Tuhý, dole nerozp. podíl, uprostřed zakalený, nahoře čirý gel	Čirý	Cca 1–2 ml na dně zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky
	3	Viz vzorek č. 2		Cca 2,5 ml na dně zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky
	4	Mírně tekutý, zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na dně zkumavky	Obsah nerozpuštěného podílu na dně zkumavky
	5	Viz vzorek č. 4			
	6	Zakalený	Zakalený	Na spodu velmi málo pevného podílu, zbytek tvoří jeden tekoucí celek	Jeden tekutý celek
	7	Tuhý, zakalený	Mírně zakalený	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–
	8	Tuhý, zakalený	Mírně zakalený	Cca 2 ml na dně zkumavky	–
	9	Viz vzorek č. 8			
	10	Na spodu tuhý, horní část tekutější	Zakalený	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	Zbytky nerozpuštěného podílu
	11	Tuhý, zakalený	Zakalený, viskózní	Cca 2 ml na dně zkumavky	Zbytky nerozpuštěného podílu
	12	Tuhý, 90 % zakalený, 10 % transparentní	Čirý	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	Zbytky nerozpuštěného podílu
Metoda měření č. 4	13	Tuhý, transparentní	Čirý, viskózní	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–
	14	Pevný, transparentní	–	Celý objem zkumavky	–
	15	Viz vzorek č. 14			
	16	Tuhý, zakalený	Čirý	Cca 1,5 ml na dně zkumavky	–
	17	Tuhý, zakalený	Čirý	Cca 2 ml na dně	–

				zkumavky	
	18	Tuhý, mírně zakalený	Čirý	Celý objem zkumavky	Po propíchnutí špachtlí vyteklo cca 1,5 ml sup.
	19	Tuhý, zakalený, vršek mírně teče	–	Celý objem zkumavky	–
	20	Pevný, transparentní	–	Celý objem zkumavky	–
	21	Pevný, transparentní, vršek gelu mírně zakalený	–	Celý objem zkumavky	–
	22	Viz vzorek č. 16			
	23	Viz vzorek č. 17			
	24	Pevný, transparentní, spodek gelu mírně zakalený	–	Celý objem zkumavky	–

6.2 Charakterizace hydrogelů metodou reologie

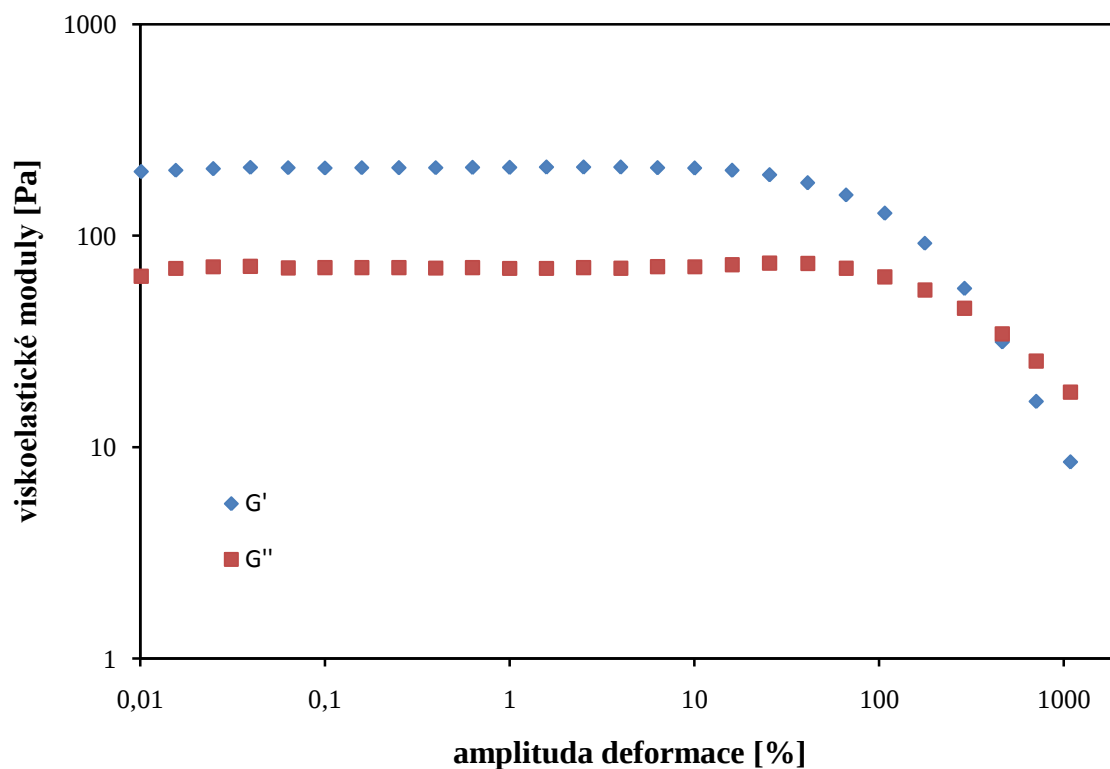
Následující kapitola shrnuje poznatky z měření reologického chování hydrogelů na bázi Hyaluronátu. Pro základní charakteristiku hydrogelů a popis vlastností pro diskuzi aplikačního potenciálu je právě reologie stěžejní metodou. V rámci této diplomové práce byly vybrány dva typy měření, a to oscilační a tokové testy, které jsou zařazeny do samostatných podkapitol. Příprava vzorku, nastavení měřicího systému i vyhodnocení dat bylo podrobně diskutováno v kapitolách 5.2 a 5.3.

6.2.1 Oscilační testy

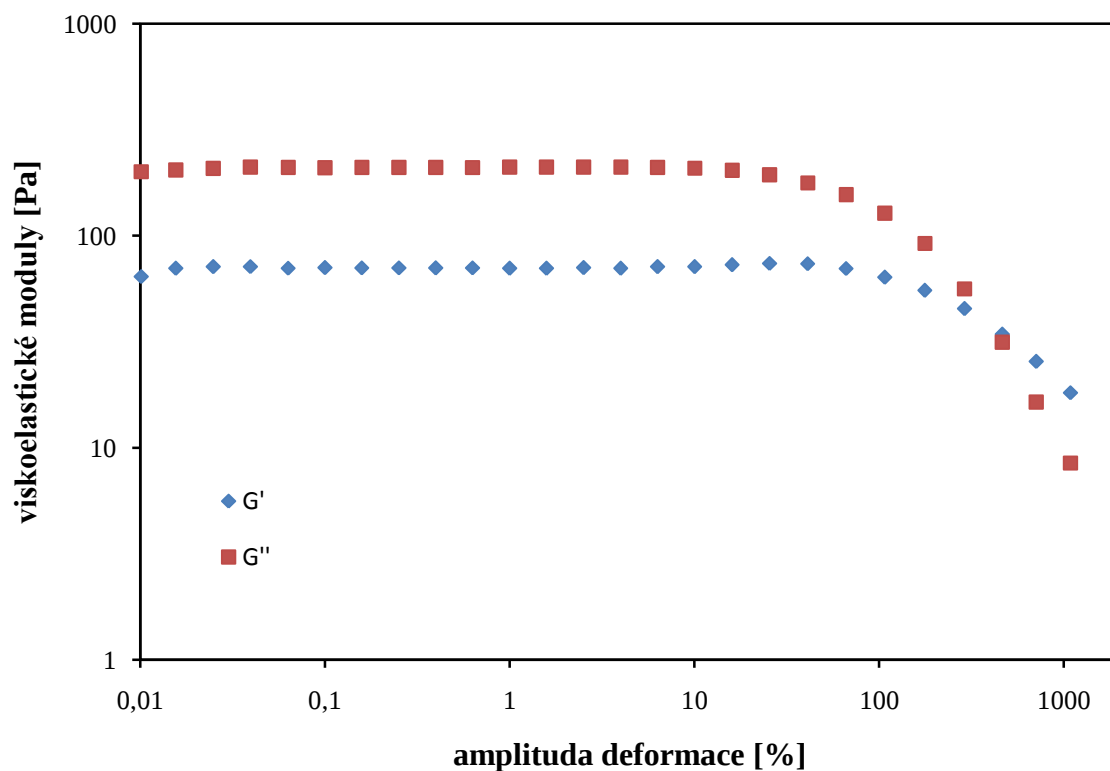
První z provedených testů byly oscilační měření. Deformační test („*strain sweep*“) s konstantní hodnotou frekvence oscilací vypovídá o rigiditě uzlů gelové sítě. Frekvenční test s konstantní amplitudou deformace („*frequency sweep*“) popisuje mj. tuhost gelu jako celku. Podrobná metodika obou měření je popsána v kapitole 5.3.1. Při vyhodnocování experimentů byly sledovány a porovnávány hodnoty viskoelastických modulů, popř. ztrátový úhel δ vypočtený z rovnice (7).

6.2.1.1 Deformační testy

Jako první byl proveden deformační test, který vypovídá o povaze látky, podle toho, který ze dvou viskoelastických modulů převažuje. V zásadě mohou nastat dva limitní případy ilustrované na **obr. 26** a **27**. V případě vyšších hodnot elastického (*paměťového*) modulu G' , vykazuje látka chování podobné tuhému tělesu, v opačném případě, při převážení viskozitního (*ztrátového*) modulu G'' se látka chová spíše jako kapalina.



Obr. 26: Závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace – příklad chování viskoelastického materiálu s převahou elasticity



Obr. 27: Závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace – příklad chování viskózní kapaliny

Přehled chování všech připravených gelů základní čtveřice (číselné značení gelů je shodné s **tabulkou 2**; metody přípravy viz kapitola 5.2.4) dle deformačního testu je uveden v **tabulce 7**. Viskózní chování látek je označeno písmenem *V*, elastické naopak *E*. Značky *VT* či *ET* vypovídají, který modul převažoval, ale jen velmi těsně. Jak je vidět, limitní případ viskózního chování, prezentováno i na **obr. 27**, převažuje u použití nízkomolekulárního hyaluronanu. Tím se opět potvrdila dlouhodobá zkušenost při práci s těmito typy vzorků na pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně. Naopak použití vyšších molekulových hmotností Hya posouvá elastický modul nad ztrátový (**obr. 28**). V případě tenzidu CTAT by se dalo hovořit o neměnném chování, kdy tento vykazuje elastický charakter u všech vzniklých hydrogelů, nehledě na použité molekulové hmotnosti Hya.

Tab. 7: Přehled viskoelastického chování připravených hydrogelů základní čtveřice

Tenzid	MW Hya	Metoda přípravy č. 1		Metoda přípravy č. 2		Metoda přípravy č. 3		Metoda přípravy č. 4	
		Číslo gelu	Chování	Číslo gelu	Chování	Číslo gelu	Chování	Číslo gelu	Chování
CTAB	LMW	1	V	1	V	1	VT	1	VT
		2	V	2	VT	2	VT	2	V
		3	V	3	V	3	VT	3	V
		4	V	4	V	4	E	4	ET
	HMW	5	E	5	E	5	E	5	E
		6	E	6	VT	6	E	6	VT
		7	E	7	E	7	E	7	E
		8	E	8	E	8	E	8	E
CTAT	LMW	9	E	9	E	9	E	9	E
		10	E	10	E	10	E	10	E
		11	E	11	E	11	E	11	E
		12	E	12	E	12	E	12	E
	HMW	13	E	13	E	13	E	13	E
		14	E	14	E	14	E	14	E
		15	E	15	E	15	E	15	E
		16	E	16	E	16	E	16	E
CTAC	LMW	17	V	17	V	17	VT	17	V
		18	V	18	ET	18	VT	18	VT
		19	V	19	V	19	VT	19	V
		20	ET	20	VT	20	VT	20	E
	HMW	21	E	21	E	21	ET	21	E
		22	E	22	E	22	E	22	E
		23	E	23	E	23	E	23	E
		24	E	24	E	24	E	24	E

Porovnání závislostí ztrátových úhlů na amplitudě deformace v případě gelů na bázi tenzidu CTAT je graficky znázorněno na **obr. 28, 29, 30 a 31**. V sestupném pořadí je srovnán vliv přípravy na mechanické vlastnosti gelů, přičemž číselné označení vzorků je totožné

s **tabulkou 2**, popř. 7. Pro přehlednost je osa x uváděna v logaritmickém měřítku. V grafech také záměrně zůstala zachována spojnice bodů pro lepší orientaci.

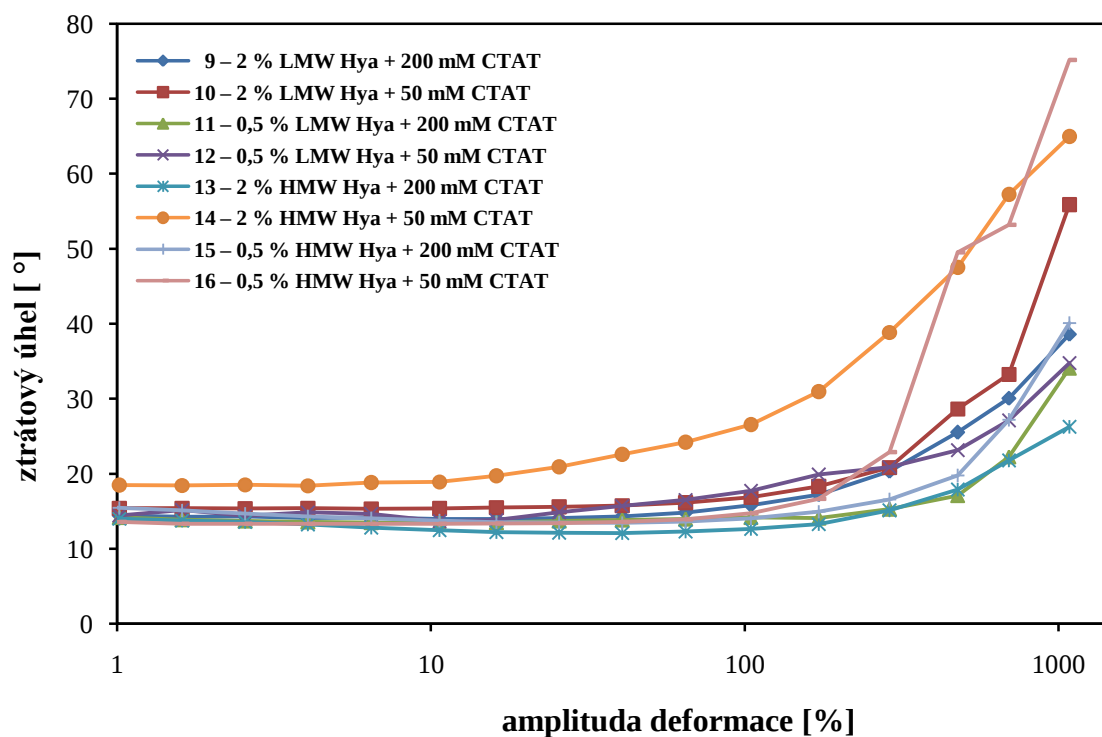
Z obrázků je patrné, že gely na bázi tenzidu CTAT jsou velmi rigidní. Dlouhá oblast LVO je z grafů vyjádřena nezávislostí obou modulů na amplitudě deformace, která naznačuje odolnost uzlů gelu proti zpřetrhání, a tudíž jejich schopnost odolávat této vystavené deformaci. Tato oblast končí, bez ohledu na použitou metodu přípravy gelů, přibližně až kolem neobvyklé hodnoty deformace 100 %. Po této mezní hodnotě dochází k rozpadu gelové sítě, která je tímto deformována nevratně. Na grafu závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace by tato hodnota znamenala jejich postupné snižování následným překřížení modulů a převahou ztrátového modulu při současném zvýšení tekutosti vzorku. Hodnota ztrátového úhlu větší než 45 ° právě koresponduje s tímto bodem překryvu, kdy se těleso začne chovat více viskózně.

V grafech je patrné, že této změny dosáhl vždy jako první vzorek č. 14 (oranžová křivka), reprezentující gel o složení 2 HMW Hya + 50 mM CTAT. Jak bylo patrné již z **tabulky 3 a 4**, tento vzorek vykazoval tekutější charakter oproti jiným porovnávaným vzorkům, což je dáno právě jeho nejkratší LVO, resp. nižší rigiditou uzlů sítě. Jedinou výjimku zde tvoří vzorek č. 12 (0,5 LMW Hya + 50 mM CTAT) s použitím metody **přípravy č. 3**, při které právě docházelo k nedokonalému rozpuštění stavebních látek, kdy se nerozpuštěný podíl usadil na dně zkumavky. Výsledné gely neobsahovaly požadovanou koncentraci stavebních komponent, a tudíž měly viskóznější charakter.

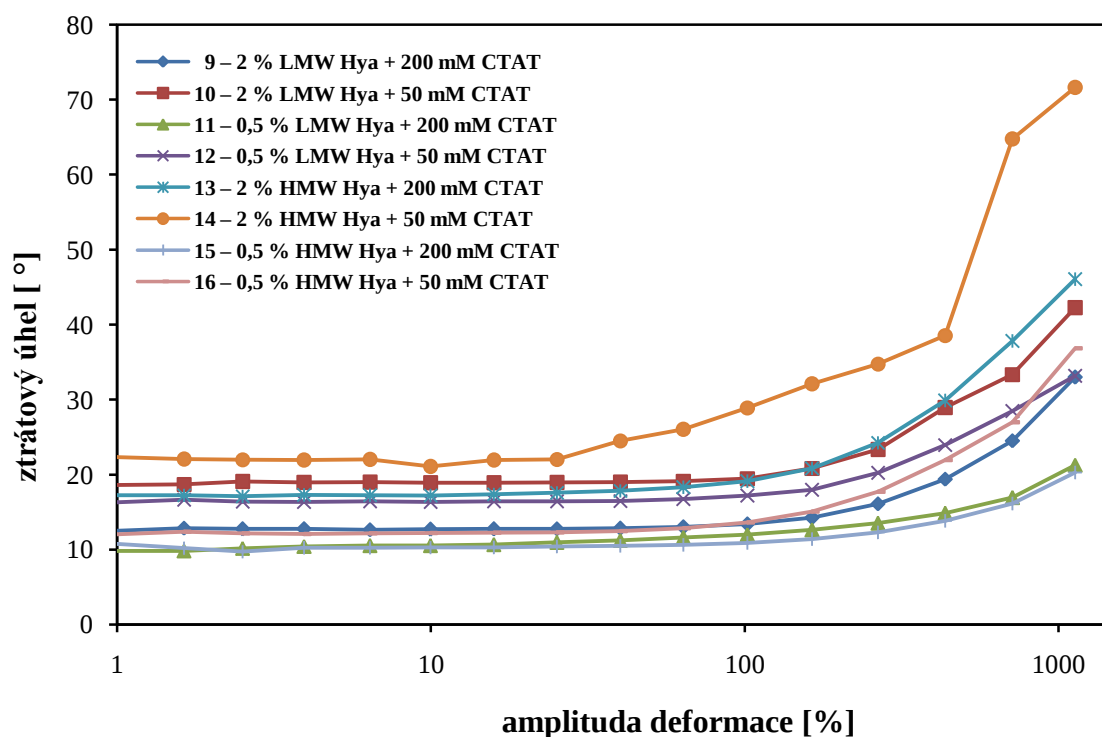
Jako nejrigidnější jde naopak, bez rozdílu metod přípravy, považovat vzorky 11 a 15. Jejich procentuální zastoupení vstupních komponent je stejné, liší se pouze použitá molekulová hmotnost Hya – 0,5 % LMW Hya + 200 mM CTAT (vzorek č. 11), resp. 0,5 % HMW Hya + 200 mM CTAT (vzorek č. 15). Popsaný fakt naznačuje, že důležitější než použitá molekulová hmotnost a koncentrace Hya bude zřejmě použitá koncentrace tenzidu. Jak se zdá, Hya již při nízkých koncentracích je schopen interagovat s micelami tenzidu, se kterými bude tvořit typickou síťovou strukturu *perlového náhrdelníku* (viz kapitola 2.2.7). Čím více micel tenzidu má však Hya na svázání k dispozici, tím pevnější se výsledný gel jeví. Stejné chování vykazují i ostatní gely při porovnávání pouze koncentrací tenzidu v jejich složení. Řeč je např. o dvojici gelů č. 10 a 12, které se svými mechanickými vlastnostmi vyskytují někde ve středu.

V případě vzorků č. 11 a 15 je však třeba také podotknout, že se jedná o gely s nejvyšší koncentrací tenzidu (200 mM), při které by již měl tento gelovat sám. Příprava suchou cestou eliminuje fakt, že by v případě mokré cesty nebylo možné zásobní roztok Hya již nijak inkorporovat do hotového gelu CTAT a stejné výsledky z obou metod naznačují, že dokonalá homogenizace výchozích roztoků (více či méně gelovité povahy) je možná i použitím mokré cesty. Na **obr. 34**, v závěru problematiky deformačních testů, je však pro zajímavost uvedeno srovnání mechanických vlastností gelů na bázi Hya-CTAT a jejich výchozích stavebních komponent.

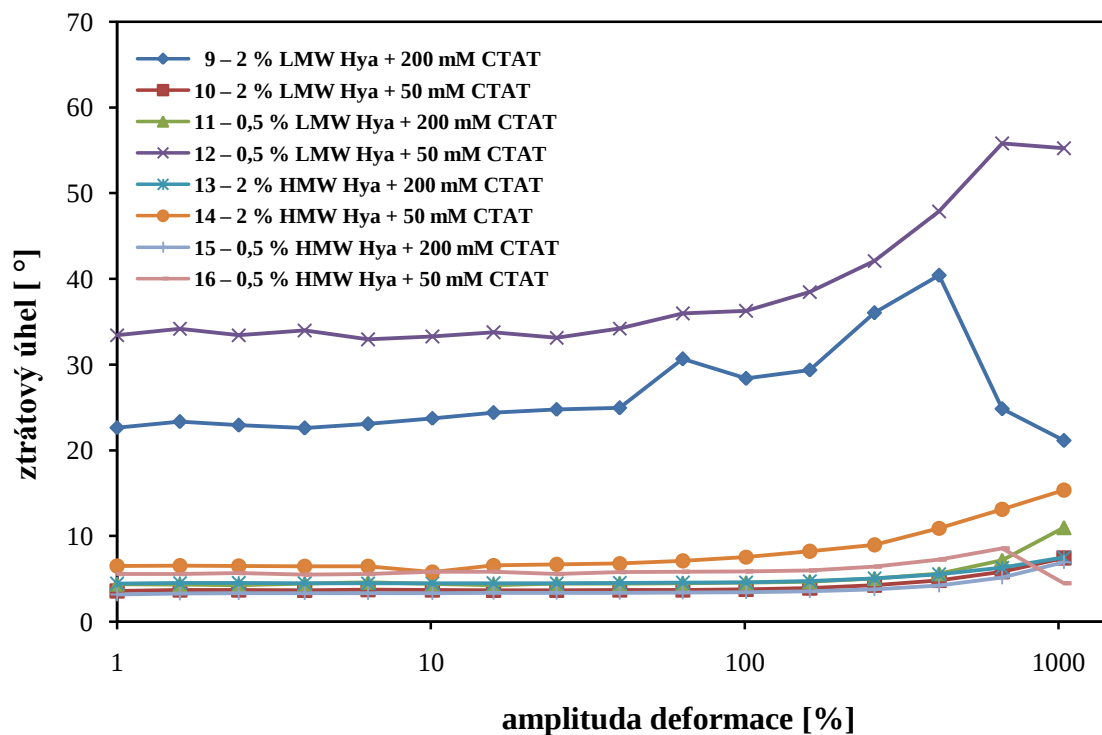
Poslední výjimku ve výše popsaném chování gelů představuje vzorek č. 13 při použití **metody č. 2**. Jedná se o *mokrou cestu* s následným *stáním* vzorků. Zde jsou výsledné mechanické vlastnosti gelu nepatrně horší, než by se očekávalo. Jev může být způsoben tím, že v průběhu přípravy se v podstatě snažíme smíchat dva zásobní roztoky, které jsou už samy ve formě gelu. Dokonalá homogenizace tak zřejmě není možná pouhým ponecháním vzorku ke stání, tudíž výsledné mechanické vlastnosti neodpovídají pevnějším komplexům Hya-tenzidy. Použitím rotační centrifugy je však tento jev eliminován.



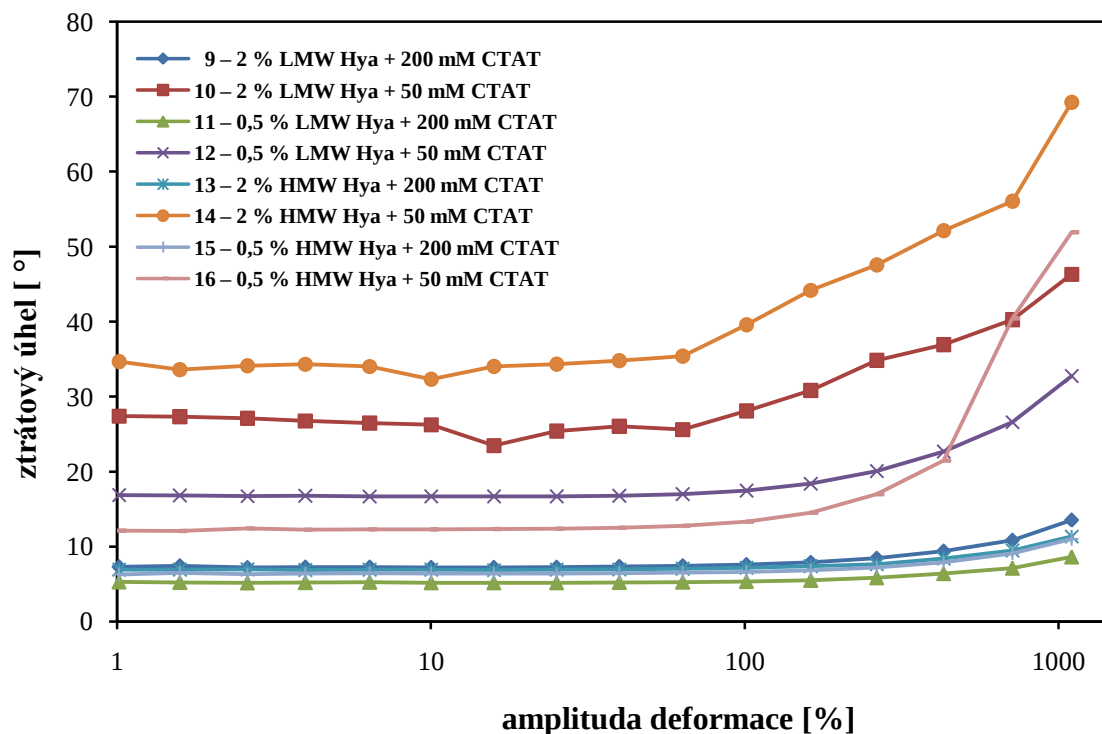
Obr. 28: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na amplitudě deformace – metoda přípravy č. 1



Obr. 29: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na amplitudě deformace – metoda přípravy č. 2



Obr. 30: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na amplitudě deformace – metoda přípravy č. 3



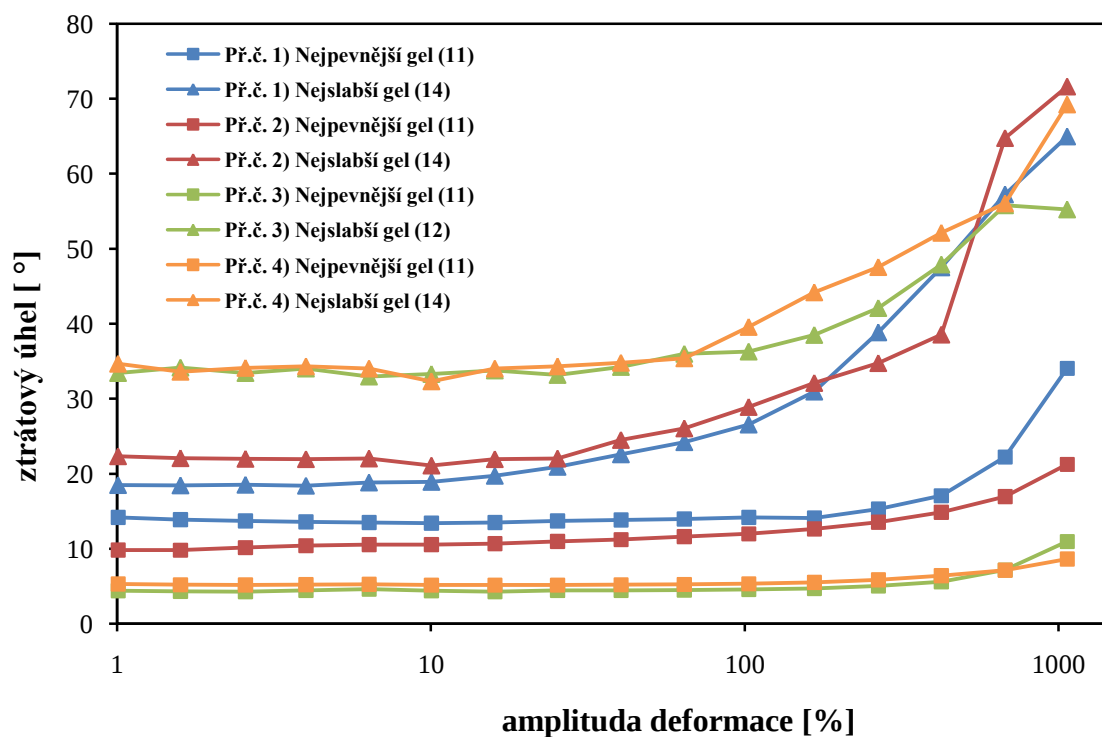
Obr. 31: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na amplitudě deformace – metoda přípravy č. 4

Na **obr. 32** je porovnán vliv přípravy pro dvojici nejpevnější-nejslabší gely na bázi CTAT. Dvojice gelů připravené stejnou metodou jsou označeny stejnou barvou křivky. V případě nejpevnějších vzorků jsou body vyznačeny čtvercovou značkou, pro nejslabší gely naopak trojúhelníkovou. Jak je vidět, použití centrifugy poskytuje nejmarkantnější rozdíly v kvalitě gelů. V případě nejpevnějších vzorků č. 11, kdy má hyaluronan dostatek tenzidu k síťování (200 mM), způsobí pravděpodobně odstředivá síla přídavné stlačení a zhutnění vzorku, kdy tento dosahuje prakticky neměnného chování až do hodnot deformace amplitudy 1000 %. Na druhou stranu u nejslabších vzorků s koncentrací tenzidu 50 mM není ani centrifugování schopno podpořit interakce a zesílit gelovou síť. Velmi podobné gely poskytují metody **přípravy č. 1 a 2**, kdy je vzorkům v případě jejich ponechání k 24 hodinovému stání, darováno dostatek času na relaxaci a dokonalou homogenizaci. I přesto, že v případě **přípravy č. 2** je rozdíl mezi nejsilnějším a nejslabším gelem větší než v případě prvního druhu, vykazují tyto gely větší LVO a tím pádem i lepší mechanickou pevnost. To je zřejmě dáno eliminováním zbytků nerozpuštěného podílu ve vzorcích reakcí již dobře homogenizovaných zásobních roztoků, a tudíž využití veškerého obsahu Hya i tenzidu k tvorbě gelu. Z toho důvody byly gely připravené touto metodou vybrány k prezentaci grafického srovnání, uvedeném na **obr. 33**.

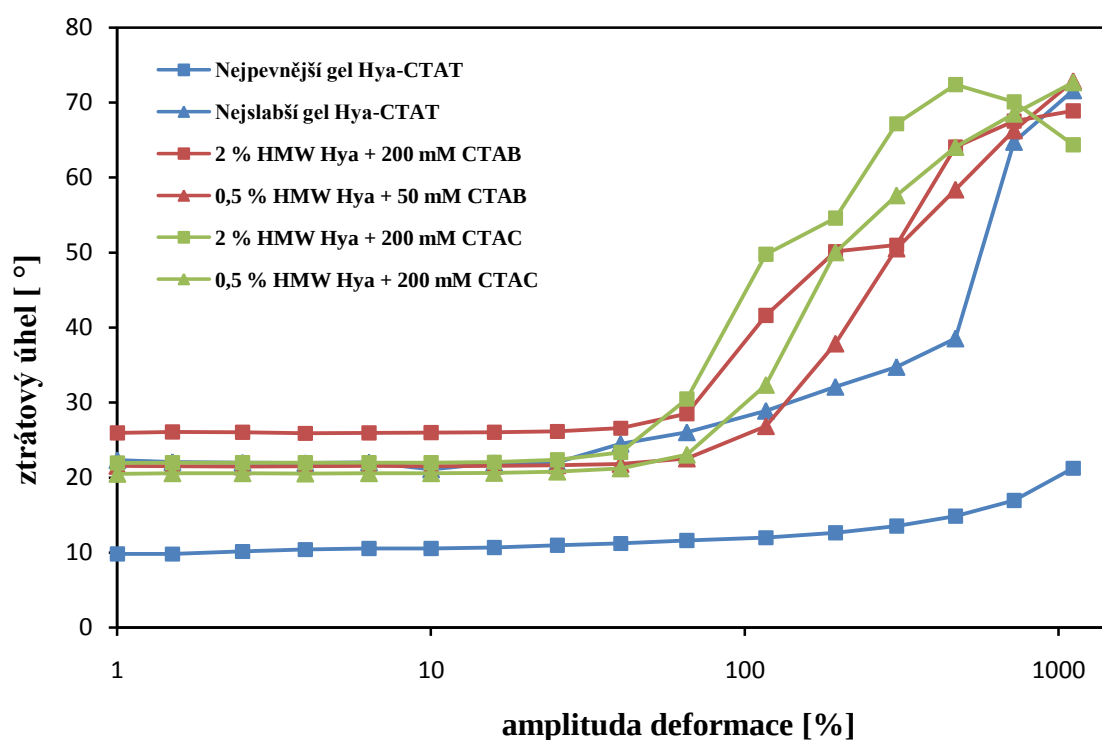
Ten popisuje porovnání nejpevnějšího a nejslabšího gelu na bázi CTAT (vzorek č. 11 – 0,5 % LMW Hya + 200 mM CTAT a vzorek č. 14 – 2 % HMW Hya + 50 mM CTAT) se vzorky typu Hya-CTAB a Hya-CTAC. Koncentrační složení komponent těchto tenzidů bylo vybráno jako 2 % Hya + 200 mM tenzid a 0,5 % Hya + 50 mM tenzid, což představuje dva limitní případy. Pro oba vzorky byla použita vysoká molekulová hmotnost Hya, jelikož dle **tabulky 7** právě tyto vzorky vyjadřují elastické chování oproti svým kolegům používajícím LMW Hya.

Z **obr. 33** je patrné jasné převýšení gelů na bázi Hya-CTAT, co do mechanické pevnosti, nad ostatními gely složené z jiných tenzidů, a to i v případě gelu označeného jako *Nejslabší gel Hya-CTAT*. Ostatní gely vykazují podobné chování s hodnotou amplitudy deformace, při které nastává nevratná deformace, kolem 100 %. Použitím zředěnějšího zásobního roztoku hyaluronanu pak dostáváme gel s nepatrně větší LVO, a tím i větší mechanické pevnosti.

Chování gelů složených z hyaluronanu a CTAT by se mohlo jevit jako ideální, je však třeba vždy zvážit cílenou aplikaci, kdy např. velmi pevné gely nebudou vhodné pro medicínské užití uvolňování léčiv či roztírání po pokožce. Výběr požadovaných vlastností gelů pak bude záviset na té či oné vstupní komponentě při výrobě, nebo přídavku dalších látek na cílené manipulování s viskoelastickými vlastnostmi (viz kapitola 3).

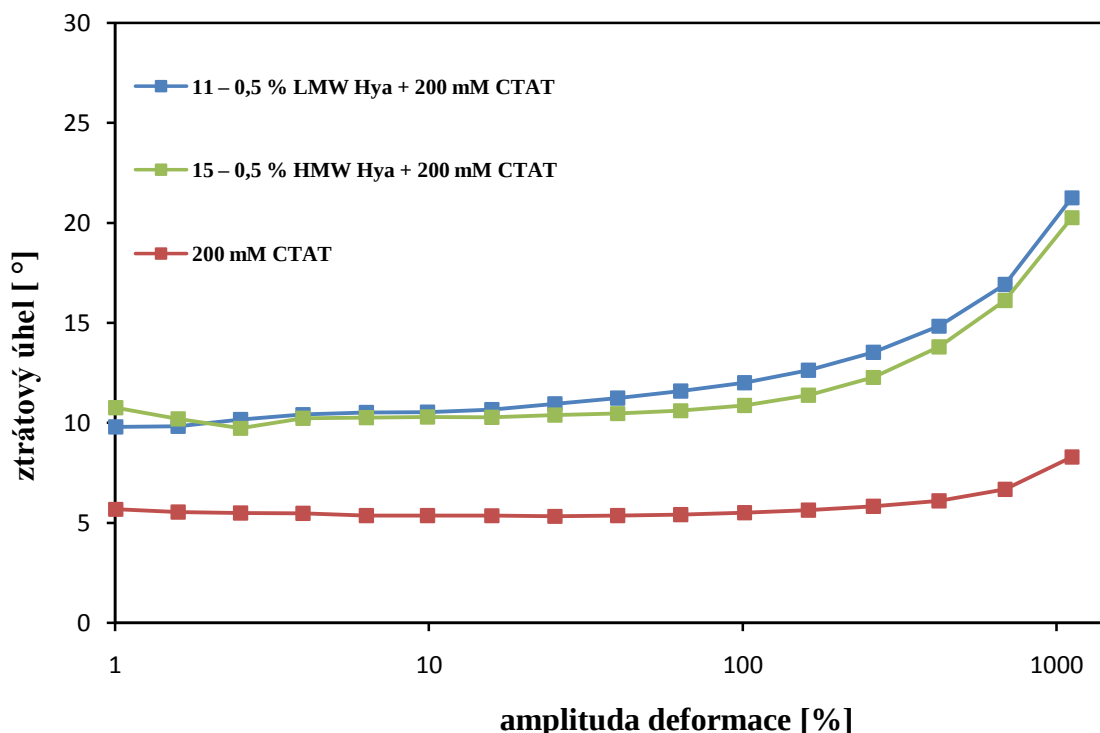


Obr. 32: Srovnání vlivu přípravy na mechanické vlastnosti hydrogelů na bázi Hya-CTAT



Obr. 33: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT s vybranými vzorky ostatních tenzidů

Na závěr kapitoly deformačních testů prezentuje **obr. 34** srovnání dvou vzorků nejpevnějších gelů na bázi Hya-CTAT (**příprava č. 2**) a zásobního roztoku 200 mM CTAT. Ten sám je při této koncentraci již ve formě gelu a jeho mechanické vlastnosti jsou prezentovány červenou křivkou. Jak je z grafu patrné, přidavek Hya do gelu CTAT nepatrně zhoršuje jeho mechanické vlastnosti ve smyslu zvýšení tekutosti vzorku. S ohledem na aplikaci gelu může být tato změna žádoucí či nikoliv. V rámci přihlídnutí k amplitudě deformace jsou však oba gely nezvykle pevné, odolávající hodnotám 200 % a více. Přidavek Hya tak spíše může sloužit jako prostředek zvýšení biokompatibility gelu či aktivního cílení k nádorové tkáni.



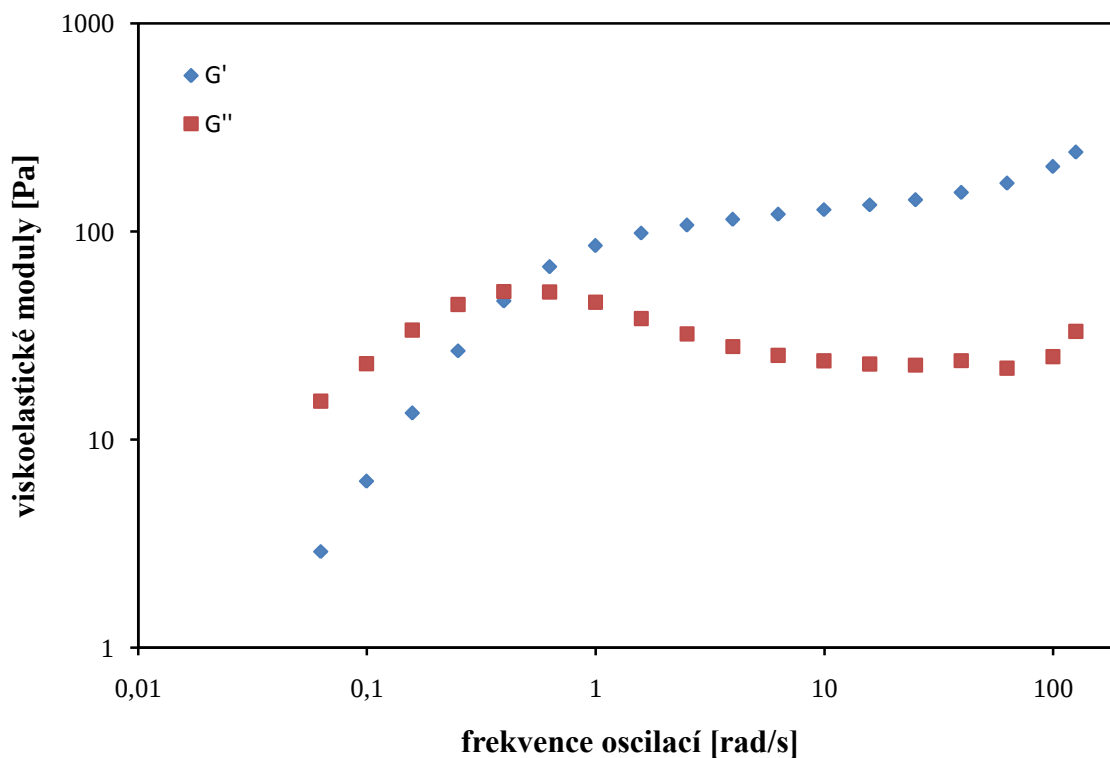
Obr. 34: Srovnání mechanických vlastností nejpevnějších hydrogelů na bázi Hya-CTAT a zásobního roztoku 200 mM CTAT

6.2.1.2 Frekvenční testy

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

Na **obr. 35** je zobrazen typický průběh viskoelastických modulů v závislosti na frekvenci oscilací pro vzorky na bázi Hya-CTAT, zde pro vzorek 2 % HWM Hya + 200 mM CTAT. Všechny gely tohoto typu s použitím tenzidu CTAT vykazovaly více či méně podobné závislosti. Elastický modul buď zcela převažoval v celé škále frekvencí, což vypovídá o dokonalé síťové struktuře gelu, nebo tohoto chování dosahoval při vyšších hodnotách frekvencí oscilací. Gely zde lze tedy opět srovnávat z hlediska elastického či viskozitního chování v závislosti na tom, který modul převažuje. Posunem modulů ve smyslu osy y lze usuzovat na mechanickou tuhost gelu jako celku při vratné deformaci. V případě překřížení modulů (*cross point*) je třeba sledovat a porovnávat jejich posuny vzhledem k ose x. Tím

získáme informaci o viskoelastickém chování gelů v závislosti na době působící síly a frekvenci oscilací. V případě gelu na **obr. 35**, by tedy při posunutí jeho modulu k vyšším hodnotám frekvencí vykazoval tento horší mechanické vlastnosti, jelikož by při nižších frekvencích a tudíž delším čase působící síly převažoval viskózní modul.



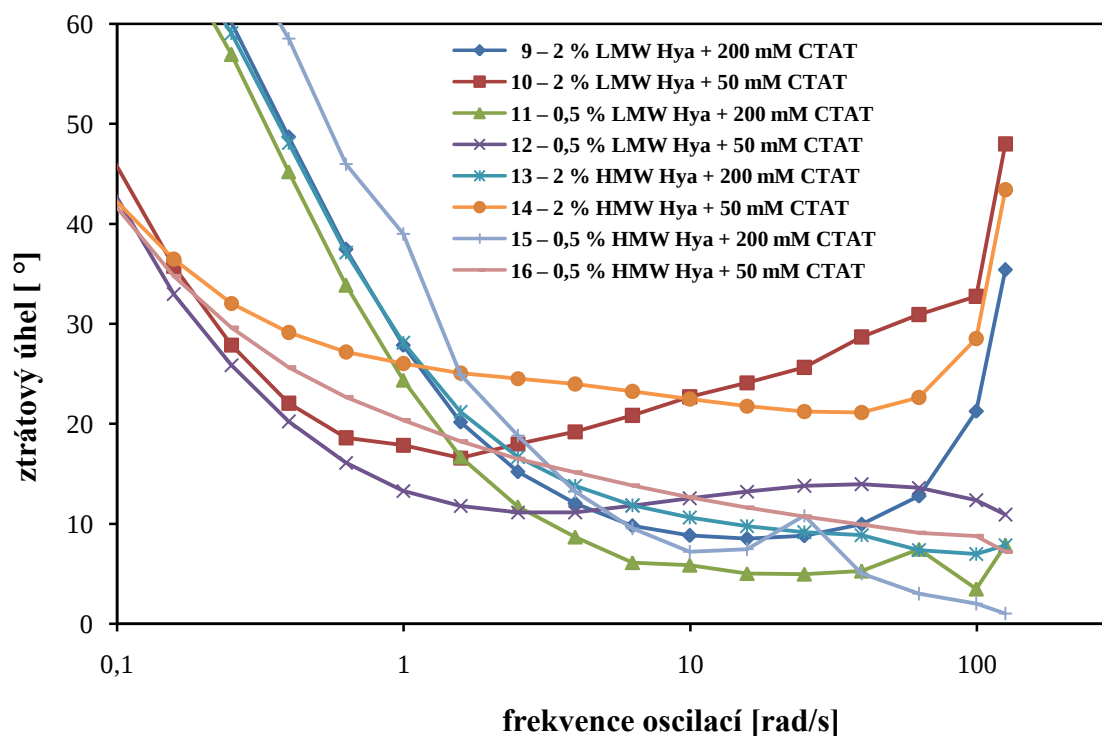
Obr. 35: Typický průběh závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro gely na bázi Hya-CTAT

Pro zjednodušení prezentace dat budou v grafech opět uváděny závislosti ztrátových úhlů na hodnotách frekvencí. I zde, jako v předešlé kapitole, platí, že pokud $\delta > 45^\circ$ vzorek vykazuje viskózní chování a v případě, že $\delta < 45^\circ$ se vzorek chová elasticky. Uspořádání grafů a porovnání viskoelastického chování vzorků je podobné jako v kapitole 6.2.1.1. Číselné označení gelů s použitím tenzidu CTAT zůstává stejné.

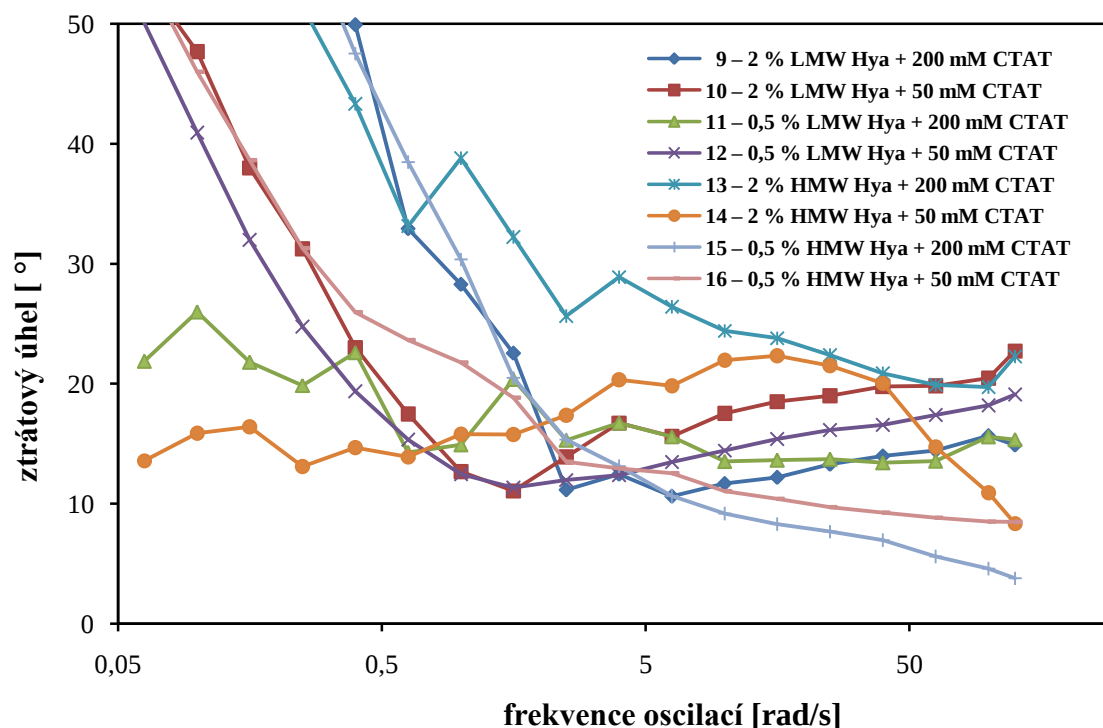
Obr. 36, 37, 38 a 39 srovnává vliv použité molekulové hmotnosti Hya a způsobu přípravy na výsledné mechanické vlastnosti gelů.

Obecně výsledky přibližně korelují s grafy deformačních měření. Opět se dá prohlásit, že vzorky č. 11 a 15 je možno považovat za jedny z nejlepších, co se mechanických vlastností týče. Užitím metody **přípravy č. 2**, která se obecně jevila jako nejvhodnější, kvůli dokonalé homogenizaci vzorků, dokonce vzorek č. 11 vykazuje elastické chování v celé škále frekvencí. Prvenství v rigiditě gelové sítě pak v této sérii testů drží, bez značných výkyvů, vzorek č. 16 vzniklý z nejméně koncentrovaných komponent při použití HMW Hya. Ostatní vzorky mají více či méně tendenci se v nízkých a vysokých limitních hodnotách frekvencí blížit chování viskózní kapaliny, v oblasti frekvencí mezi těmito extrémy vykazují elastický charakter. V grafu viskoelastických modulů bychom tedy našli dva překryvy křivek. Vzorek č. 14 lze v případě **přípravy 1 a 4** vykazuje zvláštní chování. V oblastech okolo 100 rad/s, tedy při velmi nízkých časech, se chová jako viskózní kapalina, při delším působení síly

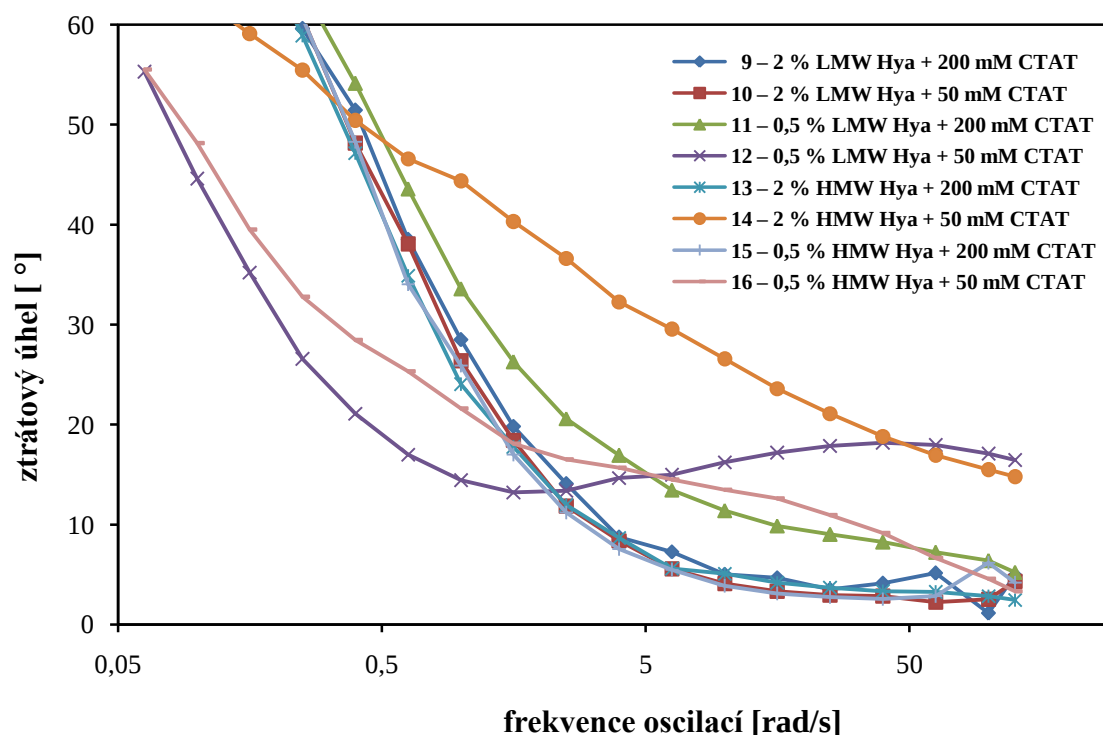
naopak tuhne. Dalo by se zde hovořit o tixotropním chování. Avšak při použití **přípravy č. 2** se tento vzorek chová jako elastický gel skrz celé rozmezí frekvence oscilací. Vzorek č. 13 v případě metody **přípravy č. 2** vykazuje stejně jako v deformačních testech mírně slabší mechanické vlastnosti oproti kolegům. Vliv molekulové hmotnosti Hya nebo použité koncentrace tenzidu není možné jednoznačně určit, jelikož se všechny gely deformují vratně a vykazují velmi podobnou tuhost.



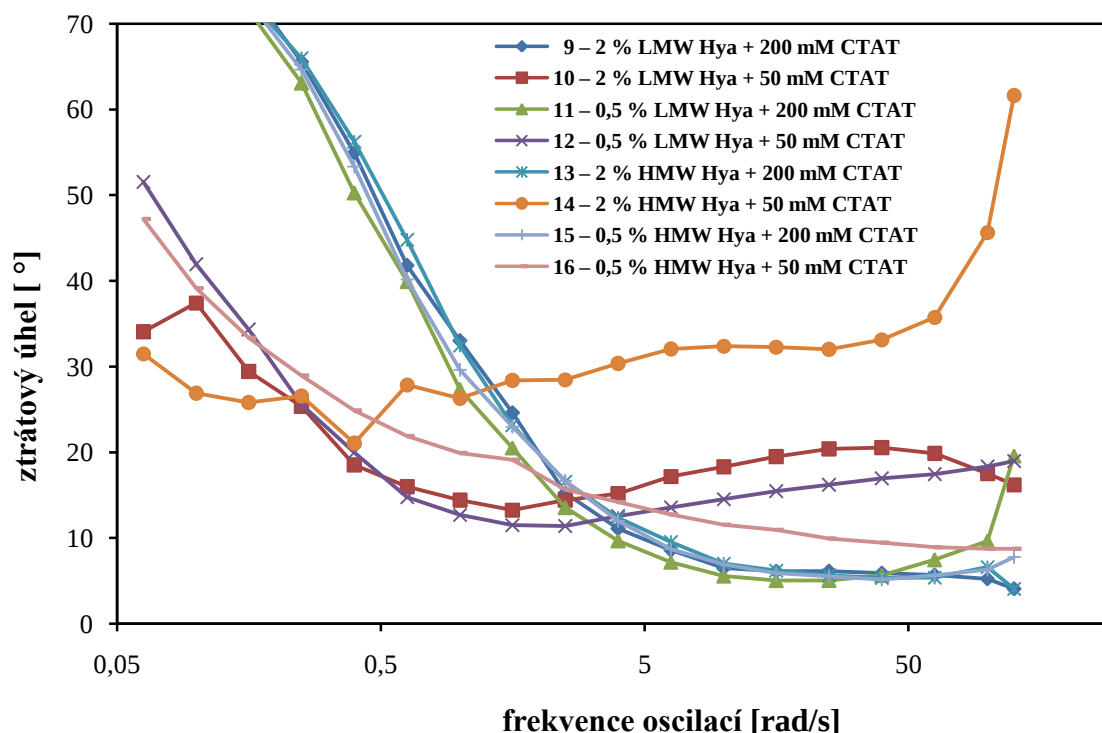
Obr. 36: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací – metoda přípravy č. 1



Obr. 37: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací – metoda přípravy č. 2



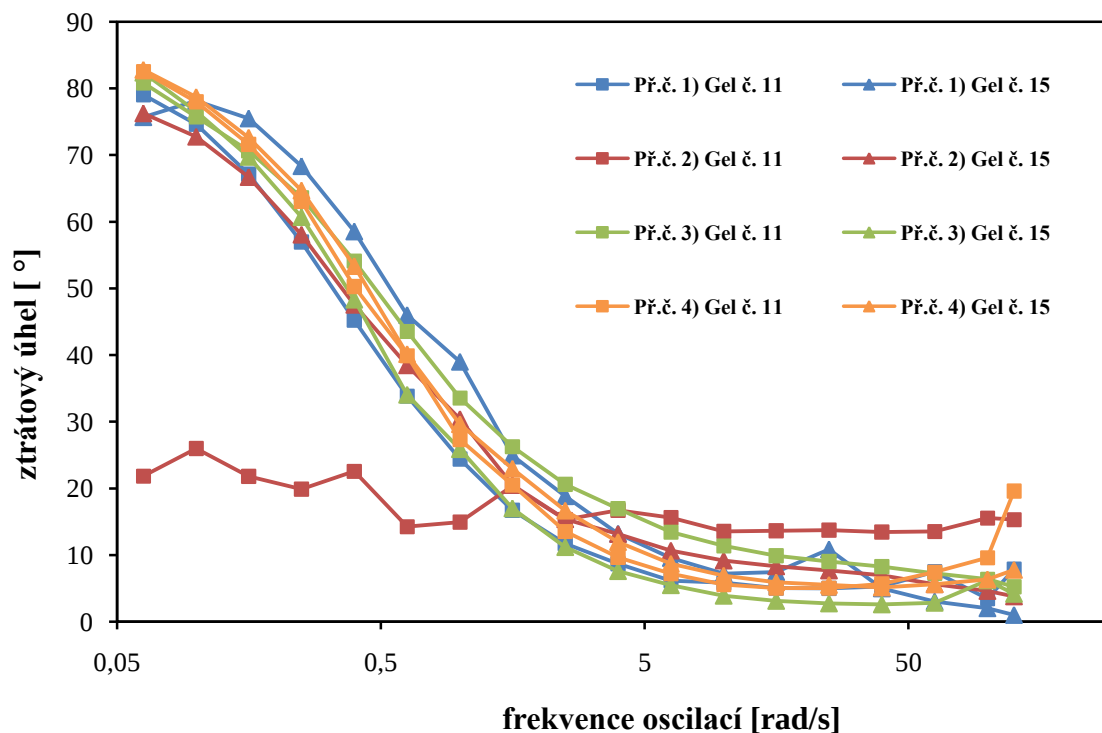
Obr. 38: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací – metoda přípravy č. 3



Obr. 39: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT pomocí závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací – metoda přípravy č. 4

K detailnějšímu rozboru chování gelů na bázi CTAT jsou přiloženy ještě **obr. 40** a **41**. První z nich popisuje vliv přípravy na vybrané vzorky č. 11 a 15. Ty vykazovaly stabilně nejvyšší mechanickou pevnost gelové sítě. Rozdíl ve složení těchto dvou zástupců je pouze v použité molekulové hmotnosti hyaluronanu (0,5 % LMW Hya + 200 mM CTAT pro vzorek č. 11, resp. 0,5 % HMW Hya + 200 mM CTAT pro vzorek č. 15), tudíž jsou ideálními kandidáty na srovnání.

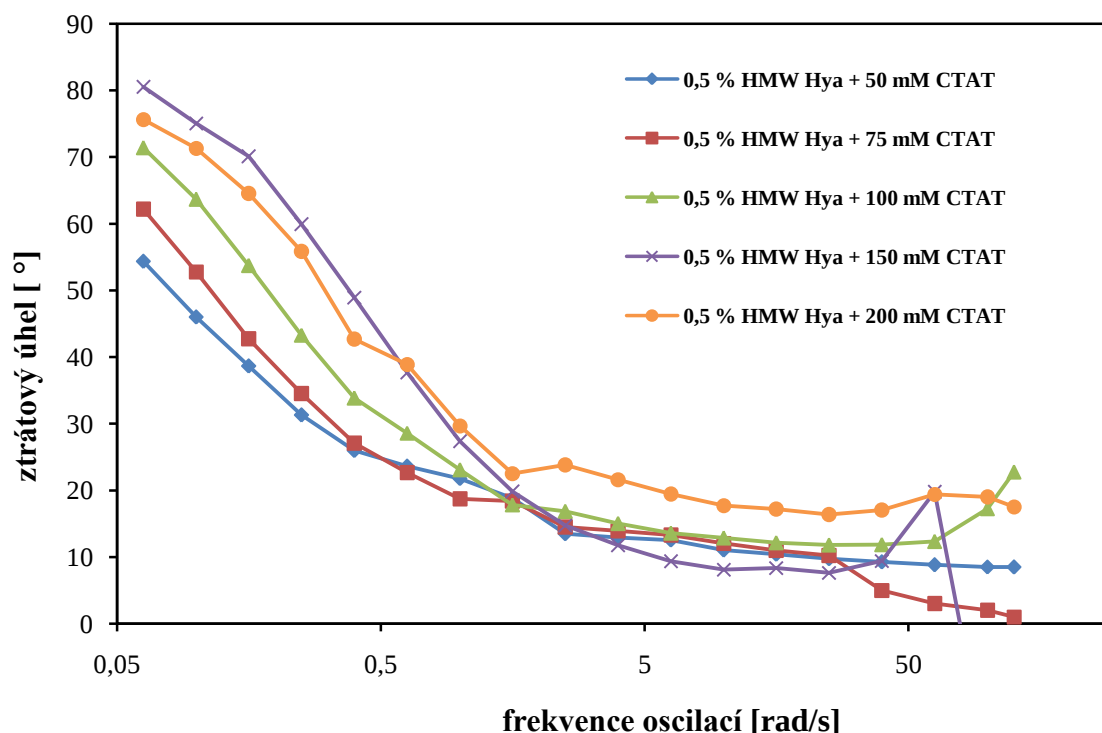
Jak je z **obr. 40** patrné, v případě frekvenčního testu, který zahrnuje elastické deformace s konstantní amplitudou vychýlení, kdy jsou zachovány uzly sítě hydrogelu, nemá způsob přípravy vliv na výsledné mechanické vlastnosti. S výjimkou vzorku č. 11 připraveného **metodou č. 2**, který se v celé škále frekvencí chová elasticky, a křivky viskoelastických modulů v jeho případě nedosáhnou překřížení, se vzorky chovají totožně s převládajícím viskózním charakterem u delších časů působení síly neboli nižších frekvencí oscilací. Zhruba při frekvenci 1 rad/s nastane překřížení jejich elastického a viskózního modulu a látky již vykazují jen elastický charakter typický pro tuhá tělesa. Ani v případě nejvyšších frekvencí nemají vzorky tendenci k opětovnému překřížení a viskóznímu chování, jako tomu bylo např. u vzorků č. 10 a 14 použitím metody **přípravy č. 1**.



Obr. 40: Srovnání vlivu přípravy na mechanické vlastnosti vybraných vzorků hydrogelů č. 11 a 15

Jako druhý v pořadí, srovnává **obr. 41** vzorky gelů založené na použití totožné koncentrace i molekulové hmotnosti Hya reagujícího postupně s koncentrační řadou tenzidu CTAT. Jako hyaluronan je použit zástupce 0,5 % HMW Hya, jelikož je obsažen v obou vzorcích, které vykazovaly nejlepší elastické chování, a to vzorek č. 15 a 16. Ty se vzájemně liší koncentrací tenzidu – 200 mM CTAT, resp. 50 mM CTAT. Vynesením závislosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací také pro vzorky s obsahem CTAT o koncentracích 75, 100 a 150 mM dokonale porovnává vliv koncentrační řady na viskoelastické vlastnosti vzniklých gelů. Jako obvykle je pro srovnání použita metoda **přípravy č. 2**.

Postupné zvyšování koncentrace tenzidu, jakožto reagentu s hyaluronanem, sleduje pravidelný trend. Všechny gely vykazují převahu viskózního modulu v nižších frekvencích oscilací. Při postupném zvyšování frekvence došlo ke gelaci u všech vzorků, nejpozději však do hodnoty cca 1 rad/s. Rozdíl mezi nejrigidnějšími gely oproti těm viskóznějším je zhruba jeden řád. Jako nejkvalitnější se jeví gel složený z nejvíc zředěných komponent – 0,5 % HMW Hya + 50 mM CTAT. Tento fenomén potvrzují i dlouhodobé zkušenosti při práci s gely na školícím pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně. Na podobné chování s použitím tenzidu CTAB pro tvorbu fázově separovaných hydrogelů odkazuje např. práce zmíněná v kapitole 3 [73].

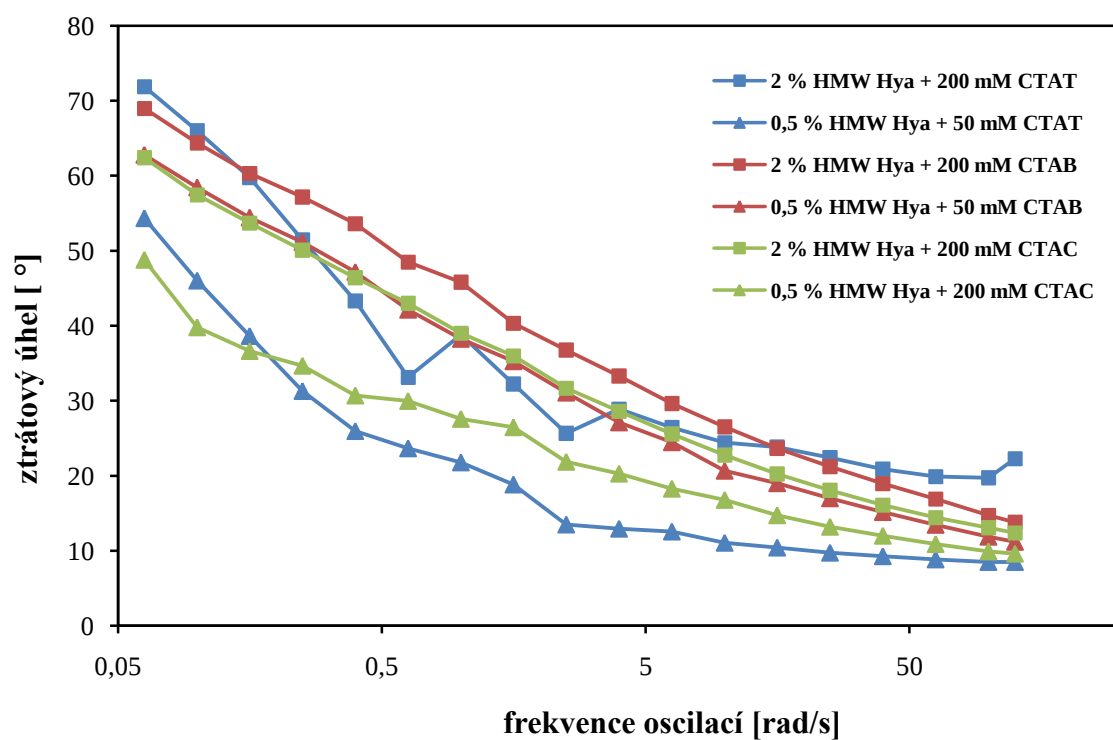


Obr. 41: Srovnání vlivu koncentrační řady tenzidu na mechanické vlastnosti výsledného hydrogelu

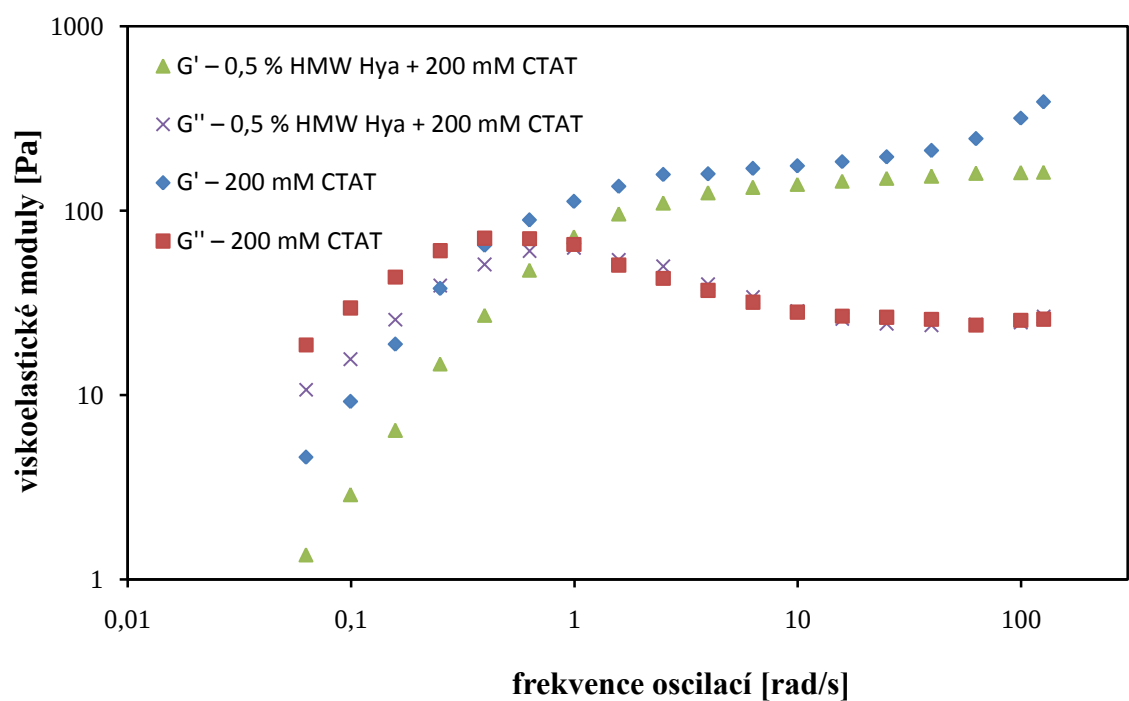
Pro porovnání vlastností vybraných vzorků gelů na bázi Hya-CTAT s ostatními použitými tenzidy v hydrogelech (CTAB, CTAC) je uveden **obr. 42**. Jsou zde vybrány dva limitní koncentrační případy složení, a to 2 HMW Hya + 200 mM tenzid a 0,5 % HMW Hya + 50 mM tenzid, oba pro metodu **přípravy č. 2**. Paradoxně však gely složené z nejzředěnějších komponent vykazovaly nejlepší mechanické vlastnosti.

U všech tenzidů je patrný fakt, popsáný již několikrát na předchozích obrázcích. Zředěnější gely vykazují lepší mechanické vlastnosti než jejich koncentrovanější analogy. Jako nejrigidnější gely vychází vzorky na bázi Hya-tenzid pro koncentrace komponent 0,5 % Hya, resp. 50 mM tenzid, kde se v těsné blízkosti předhánějí CTAC a CTAT. Hodnota překryvu jejich viskoelastických modulů odpovídá zhruba frekvenci 0,1 rad/s. O řád hůře je na tom gel se složením Hya-CTAB. Důvodem těchto odlišných vlastností může být velikost protiiontu – chloridového, resp. bromidového aniontu.

Na závěr této kapitoly je pro úplnost vložen **obr. 43** porovnávací závislosti viskoelastických modulů pro vzorek gelu č. 15 (0,5 % HMW Hya + 200 mM CTAT; **příprava č. 2**) s gelem samotného tenzidu 200 mM CTAT. Vliv přídavku hyaluronanu není tak markantní jako u měření deformačním testem, nicméně rozdíl, odpovídající předchozímu měření, je znát. Přídavek Hya do zásobního roztoku tenzidu CTAT o koncentraci 200 mM posouvá cross point jeho viskoelastických modulů k vyšším frekvencím oscilace. To má za následek mírné zhoršení pevnosti gelové sítě, která se tak stává viskóznější při kratším působení síly než by tomu bylo v případě gelu složeného samotným CTAT. Tento posun však nedosahuje ani jeden řád jednotek, tudíž vliv hyaluronanu na mechanické vlastnosti vzniklých gelů můžeme brát jako zanedbatelný. Daleko více převažují jeho pozitiva spojená s biokompatibilitou vzorku při cílené inkorporaci Hya do gelu.



Obr. 42: Srovnání mechanických vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT s vybranými vzorky ostatních tenzidů



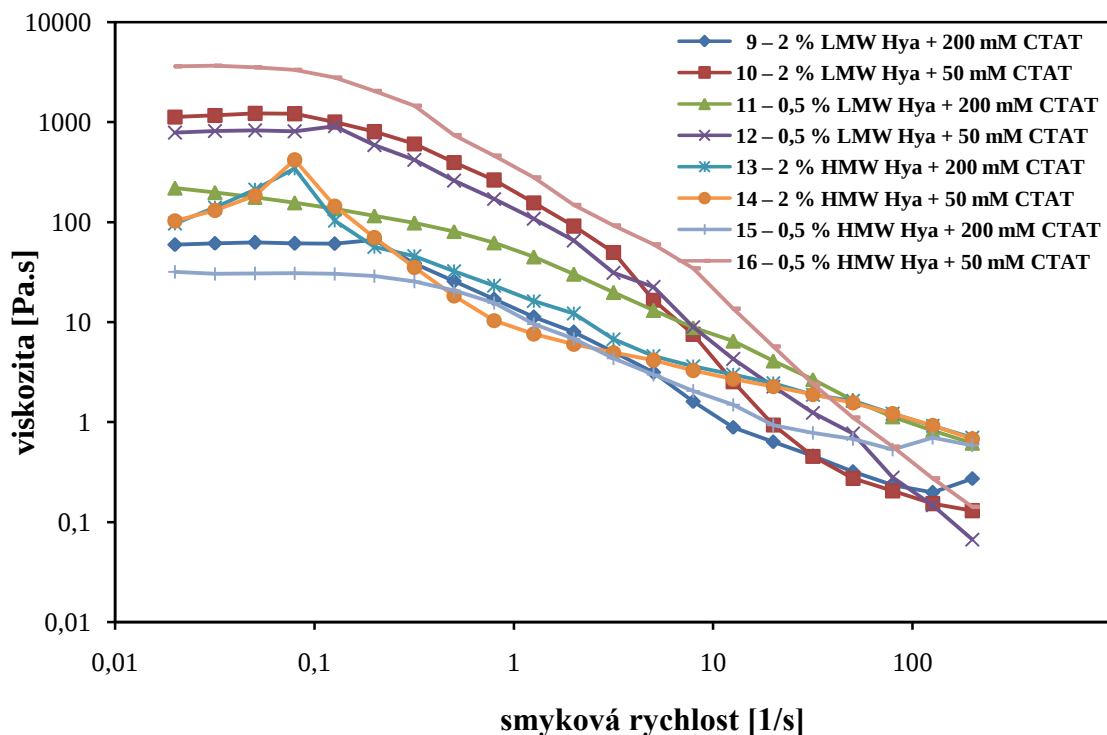
Obr. 43: Srovnání mechanických vlastností vybraného vzorku hydrogelu a zásobního roztoku 200 mM CTAT

6.2.2 Tokové testy

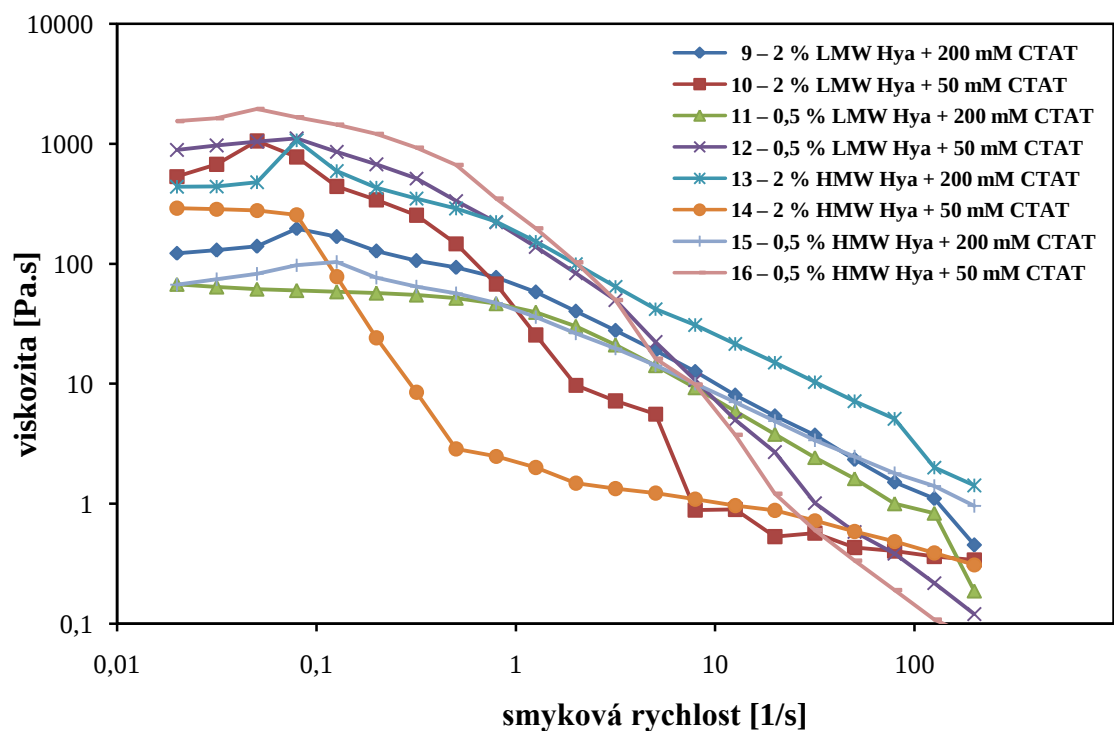
Poslední částí reologického měření byly tokové testy. Závislosti viskozity na smykové rychlosti vzorků jsou důležitým parametrem pro prozkoumání chování hydrogelů a diskutování jejich potenciálních aplikačních možností. Jako maximální smyková rychlost byla zvolena hodnota 200 s^{-1} . Vyšší hodnoty nebyly vhodné pro daný typ vzorků, kdy tyto měly tendenci vylétávat z měřicí aparatury.

Měření i číselné značení vzorků probíhalo ve stejném duchu jako testy uvedené v předchozích kapitolách. Nejprve bylo provedeno srovnání vlivu přípravy a molekulové hmotnosti Hya na tokové vlastnosti vzorků na bázi Hya-CTAT (vzorky č. 9–16), což prezentují **obr. 44, 45, 46 a 47**. Souhrnně je možné si všimnout trendu, kdy všechny vzorky, nehlédě na metodu přípravy, vykazují *newtonské* chování do hodnoty smykové rychlosti cca $0,1 \text{ s}^{-1}$, které je následováno strmějším poklesem viskozity v průběhu ještě stále nižších smykových rychlostí. To plyne ze struktury gelu, který se vlivem jakéhokoliv vnějšího zásahu začne elasticky deformovat, avšak zachovává si vnitřní strukturu. Toto chování se označuje jako *pseudoplastické* a je typické pro *nenewtonovské* látky. Po překročení určité smykové rychlosti je možno pozorovat pozvolnější pokles viskozity. To je dáno tím, že struktura gelu je zde již pravděpodobně porušena nevratně, ale vzorek je dostatečně ustálen.

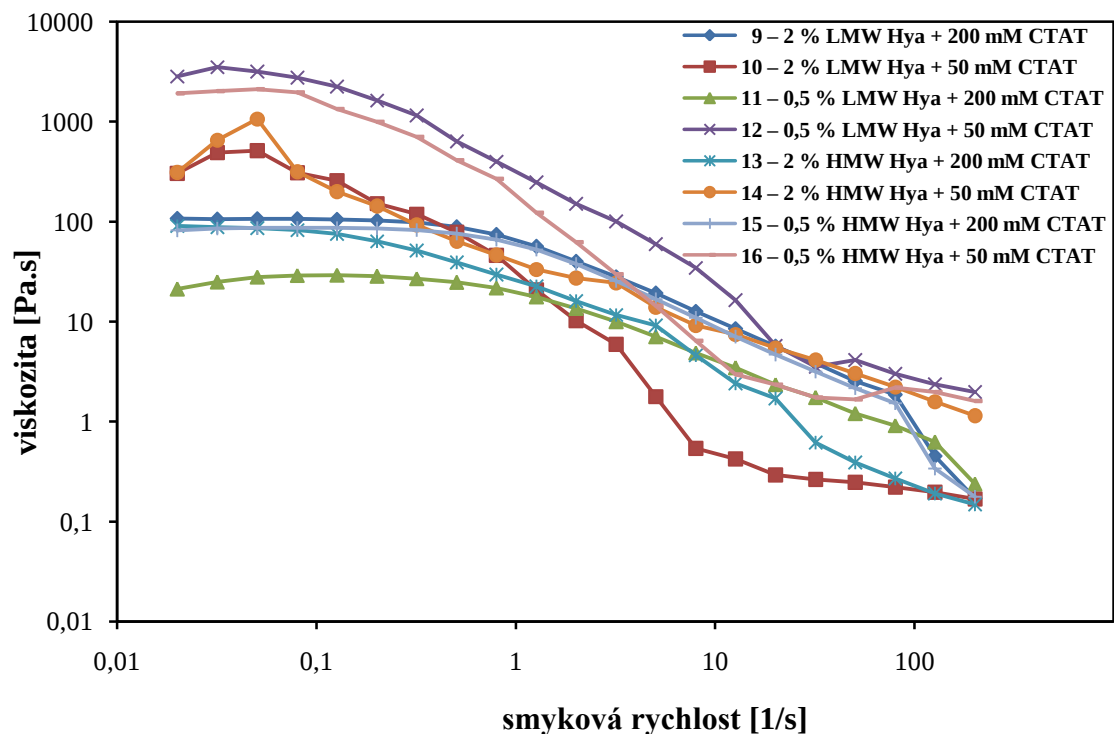
Z porovnání grafů je patrné, že použitím různé metody je možno dosáhnout gelů o rozdílné viskozitě. Při hodnotách smykových rychlostí blízkých se nule je mezi gely patrný rozdíl viskozity někdy až dvou řádů. Jako nejtužší se opět jeví gely připravené z nejvíc zředěných komponent při použití vysoké molekulové hmotnosti Hya (vzorek č. 16), pouze s výjimkou přípravy č. 3, kdy toto prvenství drží gel o stejném složení, ale s použitím LMW Hya (vzorek č. 12). Při vyšších smykových rychlostech se však gely více či méně blíží stejné hodnotě viskozity, z čehož se dá uvážit, že nezávisle na metodě přípravy jsme pro určité aplikační vlastnosti schopni vytvořit konzistentní gely.



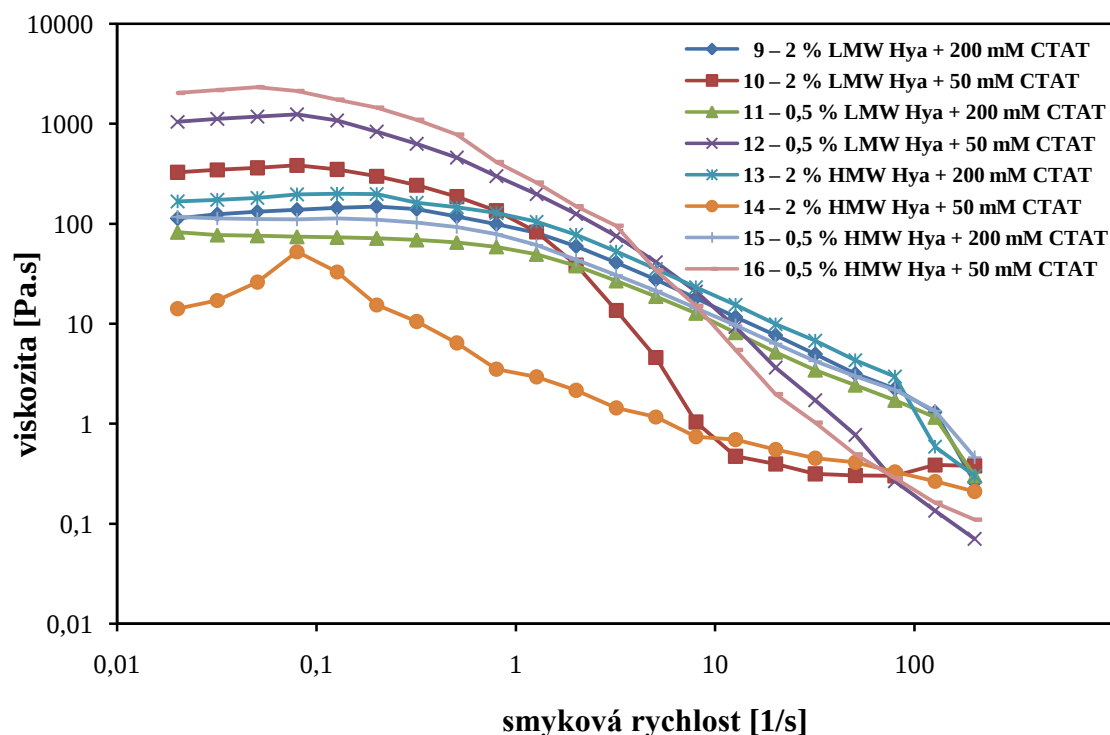
Obr. 44: Srovnání tokových vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT – metoda přípravy č. 1



Obr. 45: Srovnání tokových vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT – metoda přípravy č. 2



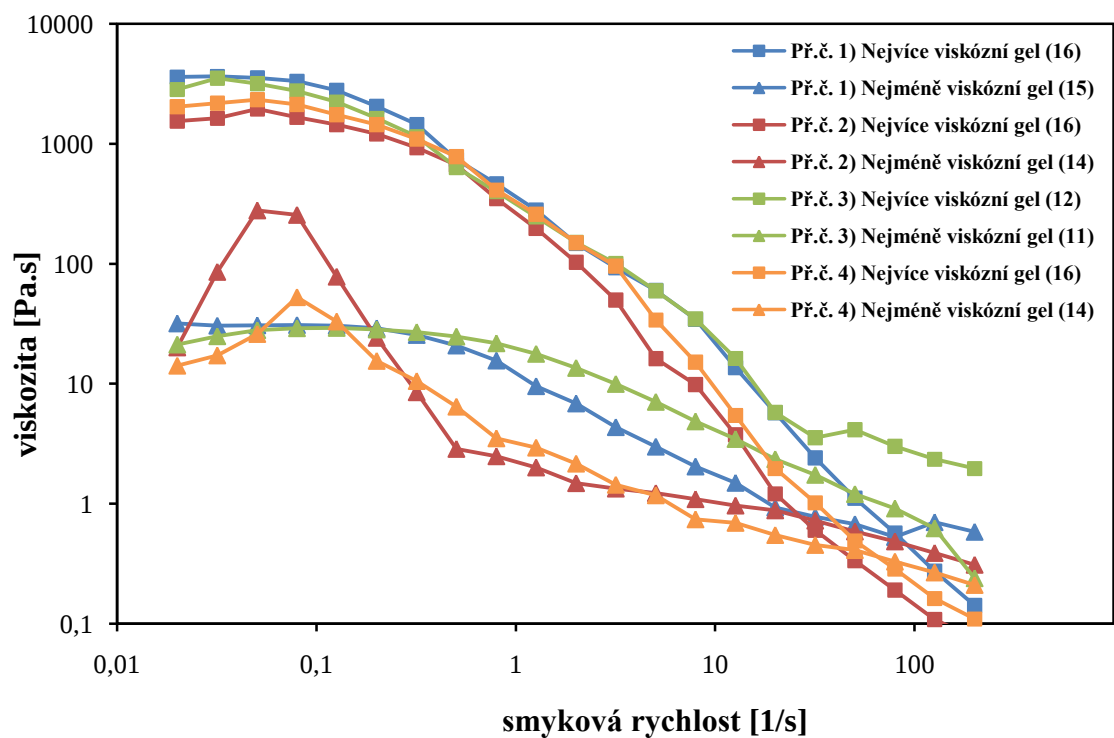
Obr. 46: Srovnání tokových vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT – metoda přípravy č. 3



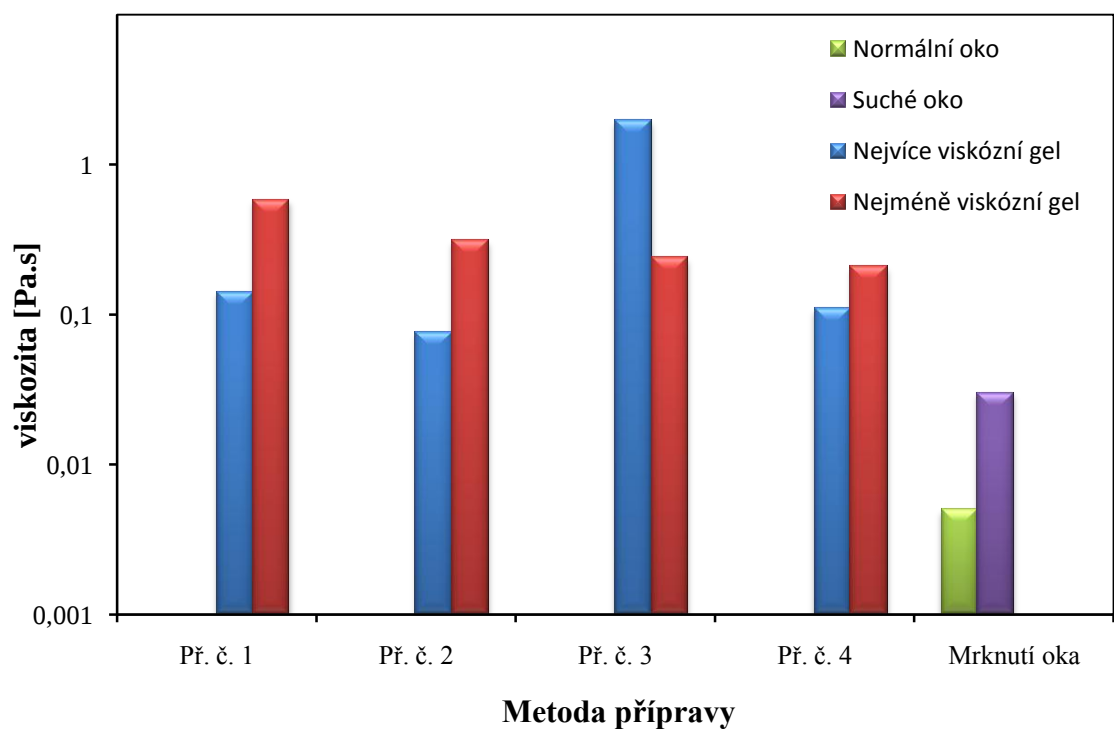
Obr. 47: Srovnání tokových vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT – metoda přípravy č. 4

Obr. č. 48 poskytuje podrobnější srovnání metod přípravy v případě vybraných dvojic gelů na bázi Hya-CTAT s nejvyšší, resp. nejnižší počáteční viskozitou. Jak již bylo použito v kapitole 6.2.1.1, dvojice gelů připravené stejnou metodou jsou označeny stejnou barvou křivky. V případě gelů s nejvyšší hodnotou viskozity ve smykových rychlostech blízkých nule, jsou body vyznačeny čtvercovou značkou, v opačném případě mají značky bodů trojúhelníkový tvar. U nejviskóznějších gelů je pozorován zanedbatelný vliv přípravy i přesto, že v diskuzi mechanických vlastností nebyla *suchá cesta* výroby gelů považována za ideální, zejména kvůli zbytkům nerozpuštěného podílu vstupních komponent na dně reakčních nádob. Z tohoto výsledku se může zdát, že pro přípravu gelů o určité viskozitě nebude až tak směrodatná koncentrace výchozích látek, nýbrž zachování jejich správného poměru při míchání. Průběh viskozit pro nejméně viskózní gely má rozmanitější charakter, avšak počáteční a koncové hodnoty poměrně dobře korelují.

Na **obr. 49** je velmi jednoduše popsán aplikační potenciál vybraných vzorků hydrogelů v oftalmologii. Dle studie reologických vlastností lidských slz [116] byla zjištěna viskozita zdravého a suchého oka. Pro prezentaci na **obr. 49** byly tyto hodnoty přibližně zaokrouhleny na 5 mPa.s pro zdravé, resp. 30 mPa.s pro suché oko. Smyková rychlost mrknutí se přitom pohybuje v rozmezí 5 000–20 000 s⁻¹. Z **obr. 48** je patrný lineární pokles viskozit, přičemž do grafu na **obr. 49** jsou vyneseny námi stanovené limitní viskozity gelů při smykové rychlosti 200 s⁻¹. Z porovnání je patrné, že hodnoty smykových rychlostí se v tomto případě liší přibližně o dva řády, přičemž viskozita gelů a lidských slz pouze o řád. V závěru lze tedy konstatovat, že při vyšších smykových rychlostech by gely měly tendenci dosáhnout potřebné viskozity pro případné rozetření mrknutím oka při použití v aplikaci tohoto typu.



Obr. 48: Srovnání vlivu přípravy na tokové vlastnosti vybraných vzorků nejvíce a nejméně viskózních hydrogelů

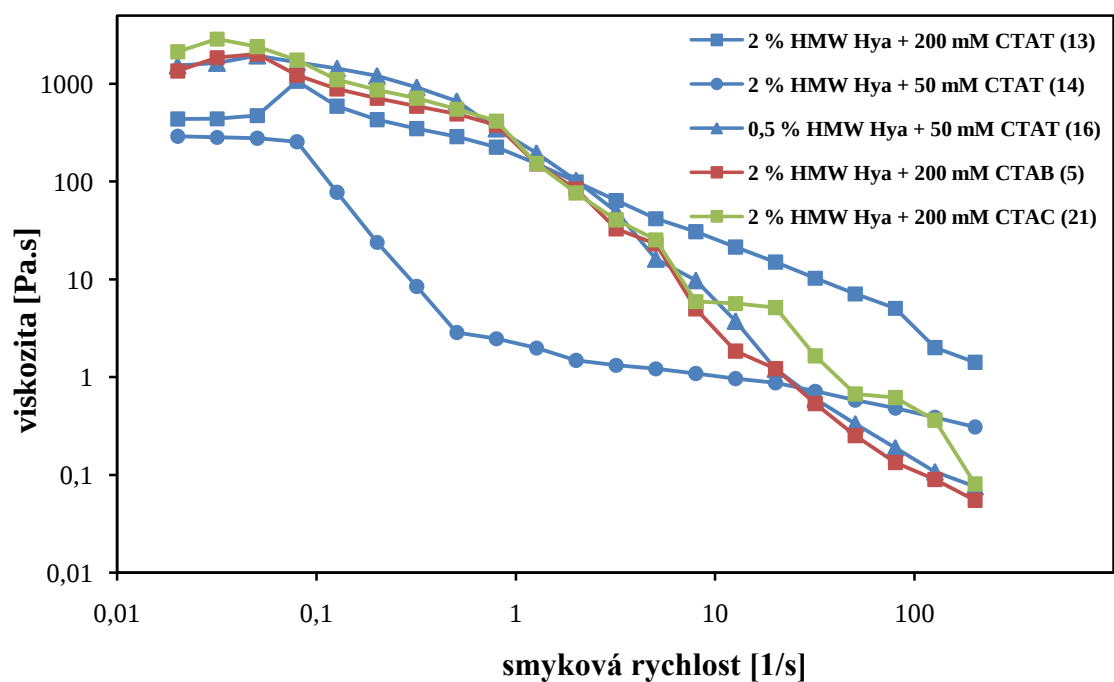


Obr. 49: Srovnání viskozity zdravého a suchého oka s vybranými vzorky nejvíce a nejméně viskózních hydrogelů

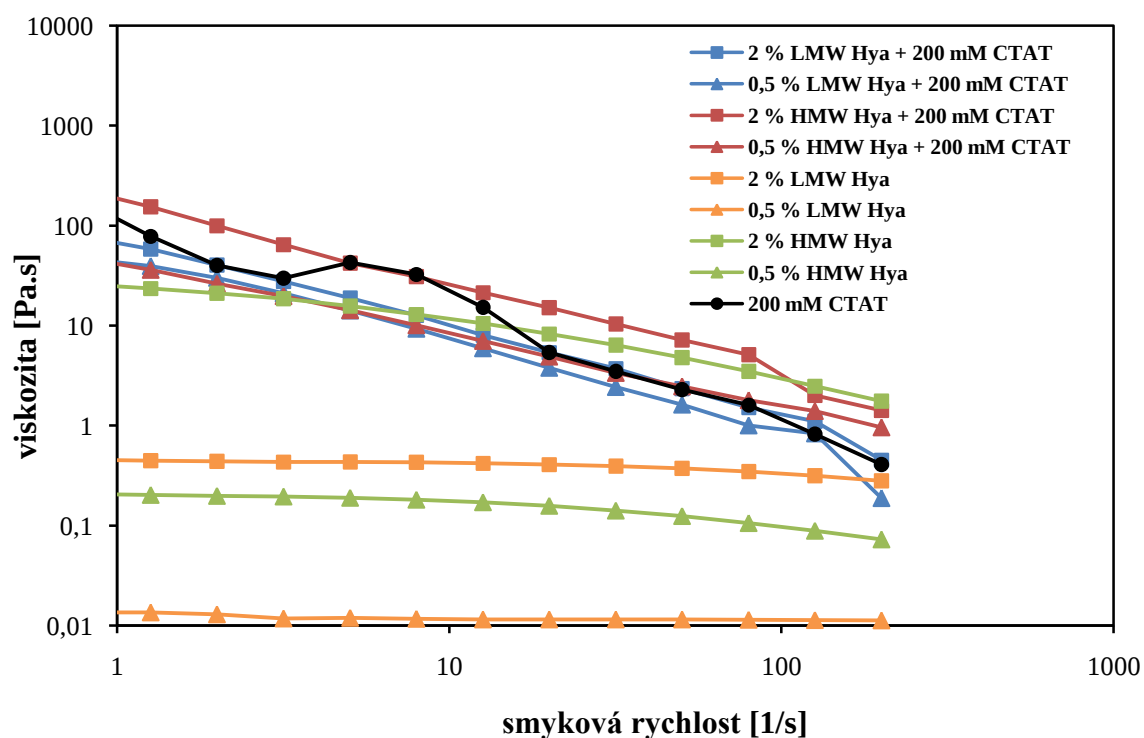
Srovnání vybraných vzorků hydrogelů na bázi Hya-CTAT s jejich alternativami při použití jiných tenzidů je uvedeno na **obr. 50**. Vzorky tvořené stejnými komponentami a připravené **metodou č. 2** jsou označeny křivkou totožné barvy. Pro tenzid CTAT byly vybrány tři zástupci, dle legendy grafu jsou to sestupně vzorek č. 13 tvořený nejkoncentrovanějšími zásobními roztoky, vzorek č. 14 vykazující nejnižší viskozitu a vzorek č. 16 naopak s nejvyšší viskozitou. Při porovnání s nejvíce koncentrovanými gely tenzidů CTAB a CTAC je vidět, že všechny vzorky startují a končí na přibližně stejné hodnotě. Odlišný průběh závislosti viskozity na smykové rychlosti vykazuje pouze vzorek č. 14. V závislosti na tokových vlastnostech jsme tedy schopni vytvořit konkurenceschopné konzistentní gely použitím různých tenzidů v závislosti na jejich vhodnosti či dostupnosti pro požadovaný typ aplikace.

Klasické srovnání vlastností gelů a jejich výchozích komponent je uvedeno na **obr. 51**. Stejně jako v předešlých kapitolách je diskutován vliv přídavku hyaluronanu přípravou *mokrě cestou* do již hotových gelů tvořených tenzidem CTAT (200 mM). Vzorky obsahující 2 % Hya jsou označeny čtvercovými značkami, pro případ 0,5 % Hya naopak trojúhelníkovými. Toto značení koreluje i pro zásobní roztoky Hya. Stejná molekulová hmotnost Hya je označena stejnou barvou, vždy pro případ dvou vzorků gelů či zásobních roztoků.

Jak je vidět na představeném grafu, všechny zásobní roztoky Hya, s výjimkou 2 % roztoku o vysoké molekulové hmotnosti (2 % HMW Hya), vykazují newtonovské chování, kdy se jejich viskozita v průběhu smykových rychlostí nemění. Všechny gely naopak vykazují velmi podobný průběh *pseudoplastického* chování lišících se v hodnotách viskozit maximálně o řád. Samotný gel 200 mM CTAT do této skupiny zapadá také. Hyaluronan byl tedy schopen měnit mechanické vlastnosti takových gelů, jak vyplynulo z kapitoly 6.2.1.1 a 6.2.1.2, na viskozitu ovšem má vliv malý nebo žádný. Zásobní roztok 2 % HMW Hya taktéž vykazuje podobnou křivku průběhu závislosti. S gelem CTAT tedy elektrostaticky interaguje, ale na výsledných tokových vlastnostech komplexu se nic nezmění. V případech těchto gelů je tedy opět cílem inkorporovat Hya z důvodu jeho biologické aktivity.



Obr. 50: Srovnání tokových vlastností hydrogelů na bázi Hya-CTAT s vybranými vzorky ostatních tenzidů



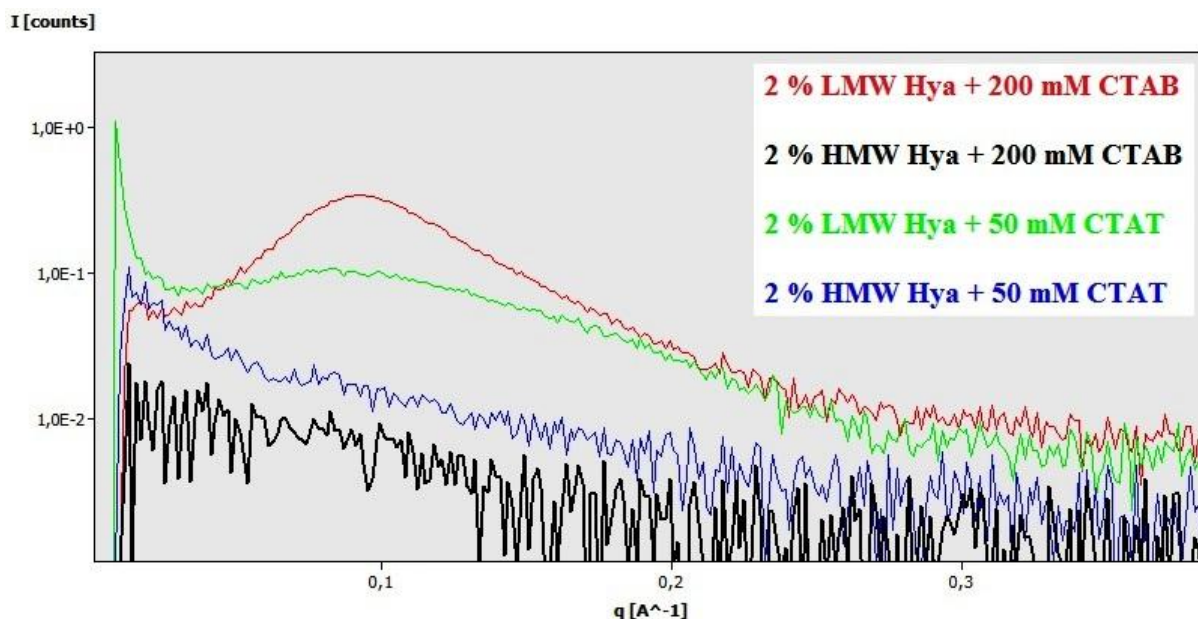
Obr. 51: Srovnání tokových vlastností vybraných vzorků hydrogelů na bázi Hya-CTAT s jejich stavebními komponentami

6.3 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

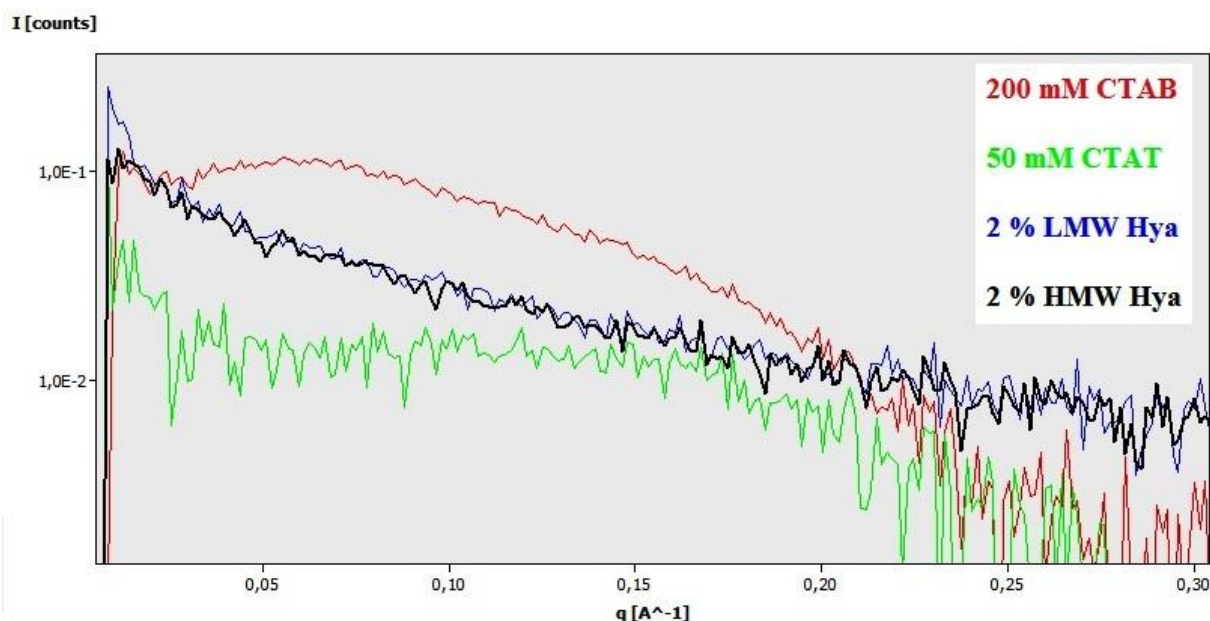
Z kapitoly 3 vyplývá poměrně běžné použití metody SAXS pro stanovení velikosti a tvaru micel obdobných typů vzorků, jež byly použity i pro tvorbu fázově separovaných hydrogelů zkoumaných v této diplomové práci. V následující části jsou proto prezentovány prvotní pokusy o dokázání či vyvrácení použitelnosti této metody pro námi vybrané reprezentativní vzorky hydrogelů. Příprava a dávkování vzorků a následné měření s vyhodnocením dat je podrobně popsáno v kapitole 5.3.3.

Primárním cílem bylo pomocí metody SAXS diferencovat a určit tvar micel při použití různých tenzidů pro tvorbu hydrogelů. Právě tato myšlenka byla klíčová k prohloubení znalostí vnitřní struktury a následného uvažování příkladné inkorporace aktivních látek či léčiv do vnitřního prostředí gelů. **Obr. 52** srovnává závislost intenzity rozptylu rentgenového záření na vlnovém vektoru, jež je v této formě výstupem z analytického nástroje EasySAXS (viz **obr. 19**). Pro srovnání byly vybrány čtyři zástupci gelů, po dvojici lišící se použitým tenzidem (CTAB vs. CTAT) a molekulovou hmotností Hya. Všechny vzorky byly připraveny **metodou č. 2**. V případě tenzidu CTAT byla zvolena jeho počáteční koncentrace jako 50 mM, a to právě kvůli eliminování jevu, kdy by přídavek Hya do hotového gelu 200 mM CTAT neměl žádný efekt. Jak napovídají křivky závislostí, je možné pozorovat rozdíl v intenzitě rozptýleného rentgenového záření u vzorků, kde naprosto předpokládáme odlišnou vnitřní strukturu – sférické micely pro tenzid CTAB, resp. tyčinkové micely v případě CTAT (červená a zelené křivka). Vyšší molekulová hmotnost Hya způsobuje větší šum a celkově velmi málo ideální tvar křivek. Hydrogel složený z LMW Hya + CTAB naopak vykazuje nejvhodnější tvar křivky, co do proložení matematickým modelem, tak ke spočítání distribuční funkce.

Na **obr. 53** je možno srovnat intenzitu rozptylu zásobních roztoků jednotlivých vstupních komponent gelů. Informace zde předložené korelují s předchozím grafem, kdy CTAB, popř. gel z něj tvořený, vykazuje nejvyšší intenzitu rozptylu. Na opačné straně stupnice leží tenzid CTAT. Velmi pozoruhodný je fakt, že nehledě na molekulové hmotnosti Hya, vykazují obě křivky totožné výsledky závislostí. To je zřejmě způsobeno stejným uspořádáním Hya v prostoru bez závislosti na molekulové hmotnosti, jelikož do kapilár byla dávkována vždy stejně silná vrstva vzorku. Zajímavostí však je, že zásobní roztok Hya způsobuje větší rozptyl rentgenového záření než CTAT. Daný jev může mít za následek složitější struktura Hya či jeho snaha ve vyšších koncentracích síťovat (viz kapitola 2.1.2).



Obr. 52: Srovnání intenzit rozptylu rentgenového záření vybraných vzorků hydrogelů



Obr. 53: Srovnání intenzit rozptylu rentgenového záření zásobních roztoků

Provedením analýzy a výpočtu distribučního rozložení poloměrů částic byla pomocí softwaru EasySAXS získána velikost částic vybraných gelů a jejich stavebních komponent. Výsledky jsou uvedeny v **tabulce 8**. Je možné si všimnout, že většina vzorků vykazovala dvojí distribuci velikostí, které také vycházely pro všechny čtyři metody přípravy stejně. V případě zásobních roztoků hyaluronanů převládalo maximum pro velikost 0,8 nm. Naopak velikosti částic tenzidů a gelů jsou si velmi podobné a přibližně 2krát větší než částice hyaluronanu. Z toho se dá usuzovat, že na vnitřní strukturu gelu má zásadní vliv právě druh a koncentrace použitého tenzidu. Pozoruhodné je však zjištění, že všechny gely vykazovaly velmi podobnou velikost částic. Obecně se předpokládalo, že vzorky s obsahem CTAT budou mít, kvůli jinému tvaru micel ve formě tyčinek, mnohonásobně větší velikost.

S vyhodnocením výsledků je však jasné, že metoda SAXS není schopna změřit délku tyčinkových či červovitých micel, ale pouze jejich průměr. Závěry tedy potvrzují fakt, že tyčinkové micely tenzidu CTAT vznikají fúzí sférických micel, které jsou strukturou podobné jako micely CTAB. Jejich velikosti (resp. průměry) poté byly vyhodnoceny jako totožné. Z distribuční funkce tedy určíme pouze průměry micel jak kulatého, tak i tyčinkového tvaru. Pokud ale porovnáme tvary naměřených křivek (viz **obr. 52** – červená a zelená), můžeme si dovolit tvrdit, že dané micely mají jiný tvar. Zelená křivka poukazuje na tyčinkovitý tvar, zatímco červená křivka odpovídá kulatým micelám. Toto tvrzení je podloženo díky zkušenostem s měřením podobných materiálů, kde ostře zaoblená křivky odpovídají kulatým částicím a pozvolně protáhlé odpovídají tyčinkovitým tvarům. Pokud bude délka tyčinek příliš velká, není možné jejich velikost určit pomocí metody SAXS, ale je nutné využít nějakou jinou metodu, např. DLS.

Jelikož jsou v daném systému výsledné velikosti částic tak malé, resp. přístroj téměř dosáhl hranice své měřitelnosti, přihlídnutí k chybovým úsečkám, které obvykle dosahovaly hodnoty 20–50 % je v tomto případě jen málo směrodatné. Pořád se totiž pohybuje v rozmezí velikosti klasické sférické micely.

Tab. 8: Přehled velikostí částic vybraných vzorků změřených metodou SAXS

Složení vzorku	Průměr částic [nm]	Průměr částic [nm]
	1. frakce	2. frakce
2 % LMW Hya + 50 mM CTAT	1,6	4
2 % LMW Hya + 200 mM CTAB	0,8	3,6
2 % HMW Hya + 200 mM CTAT	0,8	2,7
2 % HMW Hya + 200 mM CTAB	0,8	3,4
2 % LMW Hya	0,8	3
2 % HMW Hya	0,8	3
200 mM CTAT	2,6	2,8
50 mM CTAT	2,6	2,8
200 mM CTAB	3	–
50 mM CTAB	3	–

Obecně lze tedy konstatovat, že metoda SAXS dokáže diferencovat tvar micel dle rozdílné závislosti intenzity rozptylu rentgenového záření na vlnovém vektoru. Stanovení tvaru by tak mohlo být možné z hlediska porovnávání knihoven vhodně naměřených standardů. Je však nutno konstatovat, že daný systém je velmi dynamický, kdy micely neustále fúzí nebo se rozpadají a měřicí přístroj není schopen tyto změny zaznamenat. To vyplývá i z určování velikostí částic, které pravděpodobně není dostatečně přesné. Z časových důvodů nemohlo být provedeno více měření, ale v budoucnu je jistě záhodno pokusit se metodu optimalizovat, příp. experimenty srovnat např. s výsledky DLS.

7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma vlastností a charakterizace fázově separovaných hydrogelů vznikajících reakcí polymerů s opačně nabitými tenzidy. Na jejím základě byly navrženy, provedeny a vyhodnoceny experimenty s modelovými vzorky.

Z rešerše je patrné, že jako jeden z vhodných kandidátů pro přípravu hydrogelových matic se jeví hyaluronan. Nesporná výhoda spočívá v jeho biokompatibilitě, a také ve specifické interakci s receptorem CD44, který je hojně exprimován nádorovou tkání. Tento fakt také umožňuje použití hyaluronanu pro aktivní cílení. Z popsaných důvodů je žádoucí snaha inkorporovat hyaluronan do struktury hydrogelů, a proto byl vybrán jako modelový vzorek v této práci.

Pro reakci s hyaluronanem za vzniku kondenzovaných gelových fází byly použity tři vzorky tenzidů, jmenovitě cetyltrimethylamonium bromid, chlorid a *p*-toluensulfonát. Právě poslední zmiňovaný není běžně využíván na školícím pracovišti, tudíž seznámení se s jeho vlastnostmi a chováním bylo základem pro tuto práci.

Pro charakterizaci gelů na bázi Hya-CTAT byla dle rešeršní části vybrána metoda reologie, jejíž výsledky byly posléze srovnány i s gely vzniklými za použití jiných tenzidů (CTAB, CTAC). Při přípravě vzorků na reologická měření byly tyto všechny podrobeny detailní vizuální charakterizaci. Zkoumané vlastnosti jako vzhled, množství a tuhost gelu, či čistota supernatantu jsou přehledně uvedeny do tabulek v kapitole 6.1. Jako první důležité zjištění lze konstatovat, že tvar micel tenzidu nemá vliv na množství vniklého gelu. Důvod, že u zástupců gelů tvořených 200 mM CTAT docházelo ke gelaci v celém objemu reakční nádoby, je dán povahou jeho hydrofobního protiontu, v důsledku čehož tento tenzid geluje samovolně již od koncentrace 100 mM.

Z výsledků pozorování se také potvrdil fakt, že vyšší molekulová hmotnost použitého hyaluronanu a zároveň nejvyšší použité koncentrace vstupních komponent mají vliv na vznik většího objemu gelů. Nejlepší mechanické vlastnosti, které byly posléze potvrzeny i reologickými testy, však vykazovaly vzorky tvořené nejvíce zředěnými komponentami, typicky 0,5 % HMW Hya + 50 mM tenzid.

Při porovnání metod přípravy se obecně jako nejvhodnější jevila *mokrý cesta* s následným *stáním* vzorků. Bylo zde dosaženo dokonalé homogenizace systému a rozpuštění vstupních komponent, čehož při použití *suché cesty* nebylo nikdy ideálně dosaženo. V tomto případě pak výsledné gely, i přestože vznikly, byly tvořeny koncentračně jiným složením, což bylo dokázáno i jejich tekutějším chováním.

V případě vzorků č. 2, 6, 18 a 22 bylo navíc pozorováno neobvyklé chování, kdy i přes použití 2 % Hya, avšak jen 50 mM tenzidu, nevznikal buď vůbec žádný gel, nebo byl výsledný roztok tak zakalený a viskózní, že nebylo možno pozorovat fázové rozhraní.

Podrobné srovnání mechanických vlastností gelů pomocí metody reologie pak bylo představeno v kapitole 6.2. Jako první byl proveden deformační test, dle kterého byly srovnány výsledné LVO připravených gelů. Dle **tabulky 7** je potvrzen fakt, že při použití nízkomolekulárního hyaluronanu vykazují látky spíše chování viskózní kapaliny. V případě vysokomolekulárního hyaluronanu převažuje elastický modul vzorku nad ztrátovým, z čehož lze usuzovat dokonalé zesílení struktury gelů. V případě tenzidu CTAT by se však dalo hovořit o ideálním chování, kdy tento vykazuje elastický charakter u všech vzniklých hydrogelů, nehledě na použité molekulové hmotnosti Hya. Tyto gely také vykazovaly neobvyklou rigiditu sítě, která byla porušena až při hodnotách deformace 100 %. Gel s nejslabší strukturou sítě koreluje s výsledky vizuální charakterizace, kdy této pozice,

nehledě na použitou metodu přípravy, dosáhl vždy vzorek č. 14, tedy 2 % Hya + 50 mM CTAT. Jako nejpevnější se naopak, bez rozdílu metod přípravy, daly považovat vzorky 11, 15 a 16. Jejich procentuální zastoupení vstupních komponent je u prvních dvou jmenovaných stejné, liší se pouze použitá molekulová hmotnost Hya – 0,5 % LMW Hya + 200 mM CTAT (vzorek č. 11), resp. 0,5 % HMW Hya + 200 mM CTAT (vzorek č. 15). V případě vzorku č. 16 je použita koncentrace CTAT 50 mM.

Vliv přípravy opět potvrzuje domněnky z předchozí kapitoly, kdy se jako gely s lepšími mechanickými vlastnostmi jeví ty dokonale homogenizované, připravené metodou *mokrě cesty*. Použití rotační centrifugy způsobuje poměrně markantní rozdíly v mechanické kvalitě gelů, zejména u nejpevnějších vzorků.

Detailnější prozkoumání viskoelastických vlastností v oblasti elastické deformace gelů bylo provedeno pomocí frekvenčních testů. Všechny gely vzniklé s použitím tenzidu CTAT vykazovaly více či méně podobné závislosti. Elastický modul buď zcela převažoval v celé škále frekvencí, což vypovídá o dokonalé síťové struktuře gelu, nebo tohoto chování dosahoval při vyšších rychlostech oscilací. Opět se jako jedny z nejpevnějších jeví vzorky č. 11 a 15, u kterých byl i důkladněji porovnán vliv přípravy. Ten je v oblasti elastické deformace zanedbatelný pro výslednou rigiditu gelů.

Pro porovnání mechanických vlastností vzorků gelů na bázi Hya-CTAT s ostatními použitými tenzidy v hydrogelech (CTAB, CTAC) byly vybrány dva limitní koncentrační případy složení, a to 2 % HMW Hya + 200 mM tenzid a 0,5 % HMW Hya + 50 mM tenzid. Opět byla použita metoda **přípravy č. 2**. U všech tenzidů byl patrný již několikrát pozorovaný fakt, kdy zředěnější gely vykazovaly lepší mechanické vlastnosti než jejich koncentrovanější analogy. Jako nejrigidnější gely byly stanoveny vzorky na bázi Hya-tenzid pro koncentrace komponent 0,5 % Hya, resp. 50 mM tenzid, kde se v těsné blízkosti předháněly CTAC a CTAT. Hodnota překryvu jejich viskoelastických modulů byla stanovena při frekvenci 0,1 rad/s. O řád níže na tom byl gel se složením Hya-CTAB. Důvodem těchto odlišných vlastností může být velikost protiiontu – chloridového, resp. bromidového aniontu.

Posledním testem reologických měření byly tokové závislosti. Nezávisle na metodě přípravy vykazovaly všechny vzorky *pseudoplastické* chování, přičemž při vyšších smykových rychlostech se také všechny, více či méně, blížily stejné hodnotě viskozity. Z popsání výsledku se dá vyvodit, že nezávisle na metodě přípravy jsme pro určité aplikační vlastnosti schopni vytvořit konzistentní gely. Stejněho chování dosahovaly i gely připravené z ostatních tenzidů, což vypovídá o nahraditelnosti jednotlivých tenzidů v rámci dostupnosti či vhodnosti pro požadované aplikace.

Na závěr tokových testů bylo také provedeno jednoduché srovnání hodnot viskozit gelů při limitní smykové rychlosti 200 s^{-1} s viskozitou slz při smykové rychlosti mrknutí oka. Vyšší smykové rychlosti pro testování gelů nebyly vhodné pro daný typ měřicí geometrie. Výsledky však naznačují postupný trend snižování viskozity gelů v závislosti na zvyšující se smykové rychlosti a potenciální dosažení požadovaných hodnot pro oftalmologické aplikace.

Poslední kapitola diplomové práce pojednává o prvotních pokusech aplikovat metodu maloúhlového rozptylu rentgenového záření na stanovení vnitřní struktury hydrogelů. Z výsledků je patrné, že jsme schopni rozlišit tvar micel pomocí hodnot intenzity rozptýleného záření a tvaru výsledných křivek závislosti. Ideální by však bylo srovnávat výsledky vzorků s předem naměřenými standardy. Stanovení velikostí částic touto metodou vykazuje poměrně velkou chybu a nejasný trend průměrů částic. Předmětem dalšího výzkumu

by tak měla být optimalizace této metody a srovnání jejich závěrů s jinou analytickou metodou prokazující velikost částic.

Závěrem této práce vyplynula základní charakteristika hydrogelů na bázi hyaluronanu s opačně nabitými tenzidy. Z výsledků reologických měření můžeme konstatovat, že jsme schopni, změnou koncentrace vstupních komponent, vyrobit potřebný hydrogel tzv. na míru. Inkorporování hyaluronanu do gelů se jeví jako žádoucí s ohledem na jeho bioaktivitu a schopnost cílení do nádorové tkáně. Vliv na mechanické vlastnosti gelů má tento přídavek zanedbatelný. Jako nejvhodnější pro přípravu se jevila **metoda č. 2**, přičemž použití různých tenzidů je do určité míry konkurenceschopné. Výsledky z těchto měření by mohly, alespoň malým dílem, přispět na poli diskuze o nových materiálech pro cílenou distribuci léčiv či jinou medicínskou popř. kosmetickou terapii. Zároveň se provedením základní charakteristiky chování otevírají dveře dalším experimentům, jejichž hlavním cílem bude prohloubení znalostí chemie těchto látek.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Schiraldi, Ch., La Gatta, A., De Rosa, M.: *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*, 2010, kap. 20, s. 387–412, ISBN 978-953-307109-1.
- [2] Nečas, J., Barošíková, L., Brauner, P., Kolář, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*, 2008, roč. 53, č. 8, s. 397–411.
- [3] Meyer, K., Palmer J. W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.*, 1934, č. 107, s. 629–634.
- [4] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 30. 4. 2016], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [5] Lapčík, L., Jr., Lapčík, L. De Smedt, S., Demeester, J., Chabreček, P.: Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, roč. 98, č. 8, s. 2663–2684.
- [6] Scott, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30. 4. 2016], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [7] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, č. 29, s. 17–25.
- [8] Weigel, P. H.: Bacterial Hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 30. 4. 2016], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [9] Patil, K. P., Patil, D. K., Chaudhari, B. L., Chincholkar, S. B.: Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, č. 111, č. 3, s. 286–288.
- [10] Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* [online], 2011, roč. 10, č. 1, s. 99, [cit. 30. 4. 2016], ISSN 1475-2859.
- [11] Stern, R.: Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie*, 2005, roč. 53, č. 7, s. 372–382. ISSN 03698114.
- [12] Lebel, L.: Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, roč. 7, č. 2, s. 221–235, ISSN 0169409x.
- [13] Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R., Ghatak, S.: Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*, 2011, roč. 278, č. 9, s. 1429–1443, ISSN 1742464X.

- [14] Stern, R.: *Hyaluronan in Cancer Biology*, 1. vyd. Oxford: Elsevier, 2009, 426 s, ISBN 978-0-12-374178-3.
- [15] Rah, M.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry*, 2011, roč. 82, č. 1, s. 38–43.
- [16] Hira, M.: What is the best way to use hyaluronic acid on the face?. *EHow: how to do just about everything* [online], 1999 [cit.30. 4.2016], <http://www.ehow.com/>.
- [17] Puhl, W. Scharf, P.: Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1997, č. 56, s. 637–640.
- [18] Kolarz, G., Kotz, R., Hochmayer, I.: Long-term benefits and repeated treatment cycles of intra-articular sodium hyaluronate (Hyalgan) in patients with osteoarthritis of the knee. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2003, roč. 32, č. 5, s. 310-319.
- [19] Iris, K., Mauck, R. L., Burdick, J. A.: Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, 2011, roč. 32, č. 34, s. 8771–8782.
- [20] Collins, M. N., Birkinshaw, C.: Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydrate Polymers*, 2013, roč. 92, č. 2, s. 1262–1279, ISSN 01448617.
- [21] Yu-Jin, J., Termsarasab U., Daek-Duk, K.: Hyaluronic acid in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2010, č. 40, s. 33–43.
- [22] Šmidrkal, J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*, 1999, s. 421–427.
- [23] Bartovská, L., Šišková, M.: *Fyzikální chemie povrchu a koloidních soustav*, 4. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2005, ISBN 80-7080-475-0.
- [24] Pouchlý, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2001, ISBN 80-7080-422-X.
- [25] Holmberg, K.: *Surfactants and polymers in aqueous solution*, 2. vyd. Chichester: John Wiley, 2003, 545 s, ISBN 04-714-9883-1.
- [26] Steber, J., Berger, H.: Biodegradability of anionic surfactants. *Biodegradability of surfactants*, 1995, s. 134–182.
- [27] Salanger, J-L.: *Surfactants: Types and Uses*. Mérida – Venezuela, Universidad de Los Andes, 2002.
- [28] Manojlovic, J.: The Krafft temperature of surfactant solutions. *Thermal Science*, 2012, roč. 16, č. 2, s. 631–640.

- [29] Strnadová, H., Kvítek, L.: Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. *Chemické listy*, 2009, 315–319.
- [30] Thalberg, K., Van Stam, J., Lindblad, C., Almgren, M., Lindman, B.: Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *The Journal of Physical Chemistry*, 1991, roč. 95, č. 22.
- [31] Kvítek, L., Panáček, A.: *Základy koloidní chemie*, 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, ISBN 978-80-244-1669-4.
- [32] Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. *Malvern.com* [online], 2006 [cit. 24.2.2013], <http://quimica.udea.edu.co/~coloides/Anexo1.pdf>.
- [33] Jackson, K.: Dynamický rozptyl světla – Co, jak a proč?. *CHEMmagazín*, 2007, roč. 17, č. 1.
- [34] Pabst, W., Gregorová, E.: *Charakterizace částic a částicových soustav*, Praha: VŠCHT Praha, 2007.
- [35] Atkins, P., de Paula, J.: *Atkins' physical chemistry*, 7. vyd., Oxford University Press, 2002, Micelle formation, s. 755, ISBN 0-19-879285-9.
- [36] Israelachvili, J. N., Marčelja, S., Horn, R. G.: Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1980, roč. 13, č. 2, s. 121, ISSN 0033-5835.
- [37] Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., Marangoni, D. G.: Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, 2003, roč. 99, s. 3, ISSN 0260-1826.
- [38] Sagalowicz, L., Leser, M. E.: Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid*, 2010, roč. 15, s. 61–72, ISSN 13590294.
- [39] Mayers, D.: *Surfactant Science And Technology*, 2006, s. 191–205, ISBN 13 978-0-471-68024-6.
- [40] Rosen M. J., Kunjappu J.T.: *Surfactants and interfacial phenomena*, 4. vyd., New Jersey, 2012, ISBN 978-0-470-54194-4.
- [41] Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., Gao, J.: Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery: Expert review. *Pharmaceutical Research*, 2007, č. 24.
- [42] Jones, M., Leroux, J.: Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1999, č. 48, s. 101–111.

- [43] Ray, P. Ch., Yu, H., Fu, P. P.: Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2009, roč. 27, č. 1, s. 1–35.
- [44] *Material safety data shield*. Cetyltrimethylammonium bromide MSDS, [online], [cit. 30. 4. 2016], <http://www.sciencelab.com>.
- [45] SIGMA ALDRICH: *Hexadecyltrimethylammonium bromide*, [online], [cit. 30. 4. 2016], <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [46] Smith, D. K., Korgel, B. A.: The Importance of the CTAB Surfactant on the Colloidal Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods. *Langmuir*, 2008, č. 24, s. 644–649.
- [47] SIGMA ALDRICH: *Hexadecyltrimethylammonium chloride*, [online], [cit. 30. 4. 2016], <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [48] Abdel-Rahem, R.: The influence of hydrophobic counterions on micellar growth of ionic surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2008, roč. 141, č. 1–2, s. 24–36.
- [49] Patel, V., Chavda, S., Aswal, V. K., Bahadur, P.: Effect of a Hydrophilic PEO-PPO-PEO Copolymer on Cetyltrimethyl Ammonium Tosylate Solutions in Water. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2012, roč. 15, č. 3, s. 377–385.
- [50] Bandyopadhyay, R., Sood, A. K.: Effect of silica colloids on the rheology of viscoelastic gels formed by the surfactant cetyl trimethylammonium tosylate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, roč. 283, č. 2, s. 585–591.
- [51] Rojas, M. R., Müller, A. J., Sáez, A. E.: Shear rheology and porous media flow of wormlike micelle solutions formed by mixtures of surfactants of opposite charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, roč. 326, č. 1, s. 221–226.
- [52] SIGMA ALDRICH: *Hexadecyltrimethylammonium p-toluenesulfonate*, [online], [cit. 30. 4. 2016], <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [53] Nagarajan, R., Kalpakci, B.: Viscometric investigation of complexes between polyethylene oxide and surfactant micelles. *Microdomains in Polymer Solutions*, 1985, roč. 4, s. 369–381.
- [54] 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.
- [55] Petzold, G., Dutschk, V., Mende, M., Miller, R.: Interaction of cationic surfactant and anionic polyelectrolytes in mixed aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, roč. 319, č. 1–3, s. 43–50.

- [56] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase Behavior of Systems of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: Influence of Surfactant Chain Length and Polyelectrolyte Molecular Weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370–3376.
- [57] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*, 1990, roč. 94, č. 10.
- [58] Bjoerling, M., Hersloef-Bjoerling, A., Stilbs, A.: NMR selfdiffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 1995, roč. 28, č. 20, s. 6970–6975.
- [59] Hersloef, A., Sundeloef, L. O., Edsman, K.: Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *The Journal of Physical Chemistry*, 1992, roč. 96, č. 5, s. 2345–2348.
- [60] Klouda, P.: *Fyzikální chemie*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002, ISBN 80-86369-06-4.
- [61] Křížek, T., Coufal, P., Bosáková, Z., Tesášová, E., Sobotníková-Suchánková, J.: Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*, 2009, č. 103, s. 130–135.
- [62] Park, K., Shalaby, W. S., Park, H.: *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, Lancaster, PA: Technomic Pub., 1993, 252 s. ISBN 15-667-6004-6.
- [63] Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward J. H., Zhang, J.: Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, roč. 2, s. 9–29.
- [64] Okay, O.: General properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical sensors and Biosensors*, 2009, roč. 6, s. 1–14.
- [65] Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S.: *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*, Wrexham United Kingdom, Glyndwr University, 2011.
- [66] Zaino, C., Zambito, Y., Mollica, G., Geppi, M., Serafini, M.F., Carelli, V.: A Novel Polyelectrolyte Complex (PEC) Hydrogel for Controlled Drug Delivery to the Distal Intestin. *The Open Drug Delivery Journal*, 2007, roč. 1, s. 68–75.
- [67] HOFFMAN, A. S.: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, roč. 54, č. 1, s. 3–12.

- [68] Rosiak, J.M., Yoshii, F.: Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1999, roč. 151, č. 1–4, s. 56–64.
- [69] Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A.: Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials*, 2009, roč. 21, č. 32–33, s. 3307–3329.
- [70] Macosko, Ch. W.: *Rheology: Principles, measurements, and applications*. Wileyvch, 1994, ISBN I-56081-579-5.
- [71] Brummer, R.: *Rheology Esentials of Cosmetic and Food Emulsions*, Berlin: Birkhäuser; 2006.
- [72] Hofmann, J., Urbanová, M.: *Fyzika I*. 1. vyd., Praha: VŠCHT Praha, 2005, ISBN: 978-80-7080-777-4.
- [73] 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..
- [74] Wein, O.: *Úvod do reologie*. 1. vyd., Brno: Malé centrum, 1996.
- [75] Chen, D. T. N., Wen, Q., Janmey, P. A., Crocker, J. C., Yodh, A. G.: Rheology of Soft Materials. *Matter Physics*, 2010, roč. 1, s. 301–320.
- [76] Mezger, T.: *The Rheology Handbook*. Germany, Hanover, 2011, ISBN 978-3-86630-864-0.
- [77] Barnes, H. A., Walters, H., Walters, K.: *An Introduction to Rheology*. Elsevier, 1989.
- [78] Štětina, A.: *Fyzikální vlastnosti potravin*. Praha: VŠCHT Praha 2006, 9 s.
- [79] Measurement aparatus: Rotational methods, [online], [cit. 30. 4. 2016], <http://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>.
- [80] Hrubý, M., Kučka, J., Kozempel, J., Lebeda, O.: Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, s. 10–16.
- [81] Haley, B., Frenkel, E.: Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminar and Original Investigations*, 2008, č. 26, s. 57–64.
- [82] Kwon, G. S., Okano, T.: Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, č. 21, s. 107–116.

- [83] Lukyanov, A. N., Torchilin, V., Abadi, F., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs: evaluation of self-aggregation. *Journal of Molecular Liquids*, 2009, roč. 149, s. 1–8.
- [84] Henni, W., Deyme, M., Stchakovsky, M., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Aggregation of hydrophobically modified polysaccharides in solution and at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, roč. 281, č. 2, s. 316–324.
- [85] Sezgin, Z., Yuksel, N., Baykara, T., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, roč. 64, č. 3, s. 261–268.
- [86] Ardakani, B., Karimi, M., Abadi, F., Lecerf, D., Picton, L., Rosilio, V.: Effects of hydrophobically modified polymer on nano-structure micelles. *Journal of Molecular Liquids*, 2009, roč. 149, č. 1–2, s. 1–8.
- [87] Quan, D., Gang-Biao, J., Kairong, L., Haihua, W.: Preparation of polymeric micelles based on chitosan bearing a small amount of highly hydrophobic Gross. *Carbohydrate polymers*, 2006, roč. 66, č. 4, s. 514–520.
- [88] Brown, T.: The development of hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, roč. 9, č. 4, s. 253–260.
- [89] Prestwich, G. D.: Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2001, [cit. 30. 4. 2016], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [90] Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T., Hennink, W. E.: Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 161, č. 2, s. 680–692.
- [91] Tao, Y., Xu, J., Chen, M., Bai, H., Liu, X.: Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*, 2012, roč. 88, č. 1, s. 118–124.
- [92] Li, J., Huo, M., Wang, J., Zhou, J., Mohammad, J., Zhang, Y., Zhu, Q., Waddad, A., Zhang, Q.: Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, 2012, roč. 33, č. 7, s. 2310–2320.
- [93] Yoon, H. Y., Koo, H., Choi, K. Y., Kwon, I. Ch., Choi, K., Park, J. H., Kim, K.: Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for invivo tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2013, roč. 34, č. 21, s. 5273–5280.

- [94] 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.
- [95] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant. *The Journal of physical chemistry*, 1989, č. 93, s. 1478–1483.
- [96] 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.
- [97] Hoare, T., R., Kohane, D., S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, č. 49, s. 1993–2007.
- [98] Thalberg, K., Lindman, B.: Gel Formation in Aqueous Systems of a Polyanion and an Oppositely Charged Surfactant. *Langmuir*, 1991, č. 7, s. 277–283.
- [99] Barbucci, R., Rappuoli, R., Borzatschiello, A., Ambrosio, L.: Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *J. Biomater. Sci.*, 2000, roč. 11, č. 4, s. 383–399.
- [100] Bulpitt, P., Aeschlimann, D.: New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res*, 1999, roč. 47, s. 152–169.
- [101] Bajaj, G., Kim, M. R., Mohammed, S. I., Yeo, Y.: Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 158, č. 3, s. 368–392.
- [102] 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.
- [103] Pal, A., Mary, R., Raghunathan, V. A.: Phase behavior of the cetyltrimethylammonium tosylate (CTAT)-water system. *Journal of Molecular Liquids*, 2012, roč. 174, s. 48–51.
- [104] Macías, E. R., Bautista, F., Pérez-Lopéz, J. H., Schulz, P. C., Gradzielski, M., Manero, O., Puiq, J. E.: Effect of ionic strength on rheological behavior of polymer-like cetyltrimethylammonium tosylate micellar solutions. *Soft Matter*, 2011, roč. 7, s. 2094–2102.

- [105] Torres, M. F., González, J. M., Rojas, M. R., Müller, A. J., Sáez, A. E., Löf, D., Schillén, K.: Effect of ionic strength on the rheological behavior of aqueous cetyltrimethylammonium p-toluene sulfonate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, roč. 307, č. 1, s. 221–228.
- [106] Rojas, M. R., Müller, A. J., Sáez, A. E.: Effect of ionic environment on the rheology of wormlike micelle solutions of mixtures of surfactants with opposite charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, roč. 342, č. 1, s. 103–109.
- [107] Calderón, M., Velasco, M. I., Strumia, M. C., Lorenzo, A. T., Müller, A. J., Rojas, M. R., Sáez, A. E.: Synthesis of amphiphilic dendrons and their interactions in aqueous solutions with cetyltrimethylammonium p-toluenesulfonate (CTAT). *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, roč. 336, č. 2, s. 4621–469.
- [108] Cuggino, J. C., Calderón, M., Alvarez, C. I., Strumia, M. C., Silva, K. N., Penott-Chang, E. K., Müller, A. J.: New dendronized polymers from acrylate Behera amine and their ability to produce visco-elastic structured fluids when mixed with CTAT worm-like micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, roč. 357, č. 1, s. 147–156.
- [109] Narayanan, J., Manohar, C., Langevin, D., Urbach, W.: Growth of Cetyltrimethylammonium Tosylate Micelles – A Frapp Study. *Langmuir*, 1997, č. 13, s. 398–401.
- [110] Ezrahi, S., Tuval, E., Aserin, A.: Properties, main applications and perspectives of worm micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, roč. 128–130, s. 77–102.
- [111] Lin, Z., Cai, J. J., Scriven, L. E., Davis, H. T.: Spherical-to-Wormlike Micelle Transition in CTAB Solutions. *J. Phys. Chem*, 1994, roč. 98, s. 5984–5993.
- [112] Das, N. Ch., Cao, H., Kaiser, H., Warren, G. T., Gladden, J. R., Sokol, P. E.: Shape and Size of Highly Concentrated Micelles in CTAB/NaSal Solutions by Small Angle Neutron Scattering (SANS). *Langmuir*, 2012, roč. 28, s. 11962–11968.
- [113] Feitosa, E., Brazolin, M. R., Naal, R. M., Del Lama, M. P., Lopes, J. R., Loh, W., Vasilescu, M.: Structural organization of cetyltrimethylammonium sulfate in aqueous solution: The effect of Na₂SO₄. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, roč. 299, s. 883–889.
- [114] Li, D., Li, H., Fu, Y., Zhang, J.-L., Li, W.: Critical micelle concentrations of cetyltrimethylammonium chloride and their influence on the periodic structure of mesoporous silica. *Colloid Journal*, 2008, roč. 70, č. 6, s. 747–752.

- [115] Almgren, M., Löfroth. J.-E., Rydholm, R.: Co-existence of rod-like and globular micelles in the CTAB-CTAC-H₂O system. Evidence from the fluorescence of solubilized pyrene. *Chemical Physics Letters*, 1979, roč. 63, č. 2, s. 265–268.
- [116] Tiffany, J. M.: The viscosity of human tears. *Int Ophtalmol*, 1991, roč. 6, s. 371–376.

9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Seznam zkratek

<u>Zkratka</u>	<u>Význam</u>
CAC	kritická agregační koncentrace
cca	cirka
CD 44	specifický receptor pro hyaluronan
CEC	kritická koncentrace elektrolytu
CMC	kritická micelární koncentrace
CRC	kritická koncentrace vzniku tyčinkových micel
cryo-TEM	transmisní elektronové mikroskopie se zmražením vzorku
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTAC	cetyltrimethylamonium chlorid
CTAS	cetyltrimethylamonium síran
CTAT	cetyltrimethylamonium <i>p</i> -toluensulfonát
DLS	dynamický rozptyl světla
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FRAPP	speciální fluorescenční zobrazovací technika, která počítá difúzní koeficienty micel pomocí zhášení fluorescence sondy
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAG	glykosaminoglykany
GPC	gelová permeační chromatografie
HAS1, HAS2, HAS3	hyaluronansyntázy
Hya	hyaluronan
HMW Hya	hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti
ICAM-1	specifický receptor pro hyaluronan
ITC	izotermální titrační kalorimetrie
LMW Hya	hyaluronan o nízké molekulové hmotnosti
LVO	lineární viskoelastická oblast
M_w	molekulová hmotnost
NaSal	salicylát sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
ot/min	otáčky za minutu
PAL	povrchově aktivní látka
PEC	hydrogely vzniklé elektrostatickou interakcí mezi polyelektrolytem a tenzidem
PEG	polyethylenglykol
PTX	paclitaxel
RHAMM	specifický receptor pro hyaluronan
SANS	maloúhlový rozptyl neutronů
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SDS	dodecylsíran sodný
SLS	statický rozptyl světla
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TRFQ	fluorescenční spektroskopie s časově rozlišeným zhášením

9.2 Seznam symbolů

<u>Symbol</u>	<u>Význam</u>
$\text{\AA}$	Ångström
A	plocha
a_0	účinný průřez polární hlavou
δ	ztrátový úhel
D_v	distribuční parametr
ε	relativní prodloužení (deformace)
F	síla
γ_{xy}	smyková rychlost
G_E	Youngův (elastický) modul pružnosti
G'	elastický (paměťový) modul
G''	viskozitní (ztrátový) modul
G^*	komplexní smykový modul
l_c	efektivní délka uhlovodíkového řetězce
I	hodnota intenzity rozptýleného rentgenového záření
p	kritický parametr uspořádání
q	vlnový vektor
R	poloměr částice
R_S	rozsah botnění hydrogelů
σ	smykové (tečné) napětí
η_0	zdánlivá viskozita
η	dynamická viskozita
V	molekulární objem hydrofobní části molekuly
W_D	hmotnost vysušeného hydrogelu
W_S	hmotnost nabotnaného hydrogelu